



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Licenciatura en Ciencias Biológicas

MICA como blanco farmacológico para la inmunoterapia del cáncer

Tesis de Licenciatura
María Eugenia Gaillardou

Director: Dr. Norberto Walter Zwirner
Laboratorio de Fisiopatología de la Inmunidad Innata
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) - CONICET
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Marzo 2025

Ma. Eugenia Gaillardou

Dr. Norberto W. Zwirner

A mi familia. No hay palabras suficientes para agradecerle el apoyo incondicional, tanto en forma material como en espíritu. Gracias inmensas por permitirme cultivar una inagotable curiosidad, por enseñarme e inspirarme a ser mejor persona, por mostrarme lo valioso de aprender de los errores y por no dejarme nunca bajar los brazos.

A la familia que elegí: Amigas, amigos... sin ustedes jamás podría haber llegado tan lejos.

A Luchito por ser mi amoroso e incansable compañero en esta vida, haciéndola más linda todos los días.

Gracias a todos los integrantes del laboratorio por el apoyo, y la infinita paciencia y confianza. Gracias Norberto por abrirme las puertas y permitirme aportar un granito de arena en este proyecto. Fue un sueño hecho realidad.

A Pri. No sé si dimienda lo importante que fue para mí tenerla a mi lado estos últimos tiempos.

Un cálido agradecimiento a Fabio que confío en una Euge inexperta, pero con mucho entusiasmo y me aportó el empujoncito inicial que todo estudiante necesita.

No puedo dejar de agradecer inmensamente a mi tan amada Universidad de Buenos Aires, que me nutre y enseña desde el secundario hasta el día de hoy. La considero mi segunda casa. Brindo por su excelencia, comparto su lucha diaria y anhelo profundamente que se siga apostando por ella, para mejor siempre.

Finalmente, aunque para nada menos significativo, se lo dedico muy especialmente a ellos que, incluso sin saberlo, me inspiraron profundamente a seguir este camino: Lucho, Perla, Nena y Pepe; abuelos queridos los tengo presentes en mi memoria y corazón.

Índice

RESUMEN.....	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN.....	7
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
I) PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS Y STOCK BACTERIANO.....	12
II) CULTIVOS CELULARES.....	14
<i>Protocolo de descongelado para las líneas celulares utilizadas.....</i>	14
<i>Protocolo de repique para las líneas celulares utilizadas</i>	14
<i>Producción de partículas pseudo-lentivirales.....</i>	15
Transfección de HEK293FT por el método de fosfato de calcio	15
Concentración de partículas pseudo-lentivirales	16
<i>Transducción de líneas celulares blanco.....</i>	17
III) DETECCIÓN DE MICA POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	18
<i>Marcación de MICA de superficie.....</i>	18
<i>Marcación de MICA intracitoplasmática</i>	18
IV) DETECCIÓN MICA SOLUBLE	19
<i>ELISA.....</i>	19
<i>Inmunoensayo en fase heterogénea basado en FRET</i>	20
RESULTADOS.....	21
TRANSFECCIÓN CON PLÁSMIDOS PREVIAMENTE EXISTENTES EN EL LABORATORIO Y PURIFICACIÓN DE UN NUEVO LOTE DE PLÁSMIDOS	21
TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS RENCA CON SOBRENADANTE VIRAL SIN CONCENTRAR	23
TRANSDUCCIÓN DE LÍNEAS CELULARES MURINAS CON SOBRENADANTE VIRAL CONCENTRADO	26
<i>Células 4T1.....</i>	26
<i>Células Renca.....</i>	28
<i>Células EL4</i>	30
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

Resumen

MICA (*MHC class I chain related protein A*) es una proteína humana de membrana inducida por estrés que funciona como ligando del receptor activador NKG2D (CD314), expresado en las células NK y los linfocitos T CD8. La proteína MICA se expresa de forma selectiva en casi todos los tipos de tumores, pero no en tejidos sanos, lo que facilita su eliminación por las células del sistema inmune. Sin embargo, se ha descrito clivaje proteolítico y el desprendimiento del ectodominio de MICA como molécula soluble (sMICA), la que promueve la inmunoevasión debido a que bloquea a NKG2D en células NK infiltrantes del tumor e impiden su correcta activación y función.

En nuestro laboratorio se desarrolló un anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-MICA no bloqueante (denominado D7) que demostró tener potencial terapéutico, ya que retrasa el crecimiento tumoral en modelos preclínicos. Sin embargo, aún se desconoce con precisión su mecanismo de acción *in vivo*, especialmente si es efectivo contra tumores que expresan MICA en superficie porque promueve la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC o *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) por células NK y la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP o *antibody dependent cell-mediated phagocytosis*) por macrófagos, y/o porque promueve la depuración (*scavenging*) de sMICA por macrófagos. Elucidar estas cuestiones contribuirá a mapear el panorama competitivo del AcMo D7. Con el fin de producir las herramientas indispensables para conocer si D7 es efectivo contra tumores que expresan MICA en superficie o contra tumores que producen sMICA, se propuso como objetivo de esta Tesis de Licenciatura la generación de líneas murinas que expresen una variante de MICA que no pueda secretarse (MICA*001-SD o *shedding disabled*) y líneas que expresen otra variante que solamente sea secretada (MICA*001-SO o *shedding only*), empleando el sistema de tercera generación de vectores lentivirales. Los plásmidos de expresión codifican además para eGFP. Se produjo y utilizó sobrenadante con partículas pseudo-lentivirales para transducir células murinas Renca (carcinoma renal de células claras), 4T1 (carcinoma mamario triple negativo) y EL4 (linfoma). El éxito de la transducción lentiviral, y la expresión de sMICA y MICA de membrana fue evaluado mediante microscopía de epifluorescencia, citometría de flujo, ELISA y mediante un inmunoensayo en fase heterogénea basado en FRET.

Se afrontaron diversas dificultades para alcanzar el objetivo propuesto. En primer lugar, se detectó la linealización o la presencia de conformaciones defectuosas en los plásmidos accesorios utilizados. Por ello, fue necesario producir un nuevo lote de plásmidos. Una vez purificados todos los plásmidos nuevamente, se produjo sobrenadante viral fresco y se repitió el protocolo en

reiteradas ocasiones, utilizando sobrenadante viral concentrado y sin concentrar. Se obtuvieron células 4T1-MICA*001 y EL4-MICA*001 para ambas variantes, y Renca-MICA*001-SO resistentes al antibiótico de selección, pero sin detectar eGFP al microscopio de fluorescencia. Para el caso de 4T1-MICA*001-SO, y EL4-MICA*001-SO y SD se encontraron poblaciones positivas para eGFP con el protocolo de marcación intracitoplasmática en citometría de flujo. Solamente se detectó la presencia de MICA intracitoplasmática en las líneas EL4-MICA*001-SO y EL4-MICA*001-SD.

A pesar de los sucesivos intentos con las tres líneas murinas propuestas, solo se obtuvieron exitosamente dos líneas estables expresando el gen de interés: EL4-MICA*001-SO y EL4-MICA*001-SD, aunque estos resultados deben validarse. Se destaca el aporte experimental en cuanto a la generación de las mismas, ya que este trabajo contribuye con herramientas experimentales que son el punto inicial de un proyecto de investigación traslacional en desarrollo en el laboratorio, que tiene como objetivo final dilucidar los mecanismos terapéuticos *in vivo* de nuestro AcMo anti-MICA.

Abstract

MICA as a pharmacological target in cancer

MICA (MHC class I chain-related protein A) is a key stress-induced human protein that is often overexpressed in tumor cells but typically absent in healthy tissues. It serves as an activating ligand for NKG2D, a receptor expressed on NK (natural killer) and CD8⁺ T lymphocytes. The recognition of MICA by NKG2D triggers cytotoxicity and IFN- γ production, thereby promoting tumor elimination (immunosurveillance). However, proteolytic cleavage generates a soluble form of MICA (sMICA) that can bind to NKG2D and blocking NK cell effector functions, facilitating tumor immune escape (immunoevasion).

Our laboratory previously developed a non-blocking anti-MICA monoclonal antibody (mAb), called D7, that has shown therapeutic efficiency in preclinical models. Administration of D7 delays the growth of MICA-expressing tumors via antibody-dependent-cell-mediated cytotoxicity (ADCC) by NK cells, antibody- dependent-cell-mediated phagocytosis (ADCP) and/or scavenging of sMICA by tumor-associated macrophages (TAM). However, the *in vivo* mechanism of action of D7 remains poorly understood. It is crucial to elucidate the contribution of each mechanism to assess D7 competitive landscape and to properly design potential clinical trials with our mAb. To address these issues, the main objective of this thesis was to produce stable tumor murine cell lines expressing two variants of MICA: a shedding-disabled version

(MICA*001-SD) and a shedding-only version (MICA*001-SO), using third generation lentiviral particles that also encode eGFP. Lentiviral particles encoding cDNA MICA variants were produced and they were used to transduce Renca (mouse clear cell renal cell carcinoma), 4T1 (mouse triple-negative mammary adenocarcinoma) and EL4 (mouse lymphoma) cell lines. Flow cytometry, ELISA, heterogeneous FRET-based fluorescent immunoassay and epifluorescence microscopy were used to evaluate cell surface expression of MICA and sMICA production in cell supernatants.

Several challenges had to be overcome to achieve the proposed objectives. First, linearization or defective conformations of the accessory plasmids used was detected. Therefore, it was necessary to produce a new batch of these plasmids. So, fresh viral supernatants were produced, and they were used in new transduction attempts. Once the concentrated supernatant was used, 4T1 and EL4 both MICA*001-SO and MICA*001-SD cells, as well as Renca-MICA*001-SO cells resistant to the selection antibiotic puromycin were obtained. However, no eGFP was observed by fluorescence microscopy. Positive populations for eGFP in 4T1-MICA*001-SO and both modified EL4 cell lines were detected by intracellular staining flow cytometry. The presence of intracellular MICA was only detected in EL4-MICA*001-SO and EL4-MICA*001-SD cell lines.

Several experiments were carried out to obtain stable modified cell lines from Renca, 4T1 and EL4. However, only two stable cell lines expressing the gene of interest were successfully generated: EL4-MICA*001-SO and EL4-MICA*001-SD; these results must be validated though. These cell lines expressing both MICA variants are the starting point of a broader project aimed at elucidating the *in vivo* therapeutic mechanisms of our anti-MICA mAb. Hence, it is important to emphasize that this work provides experimental tools that are crucial for the development of the ongoing translational research project in our laboratory.

Introducción

Las células NK son la tercera población de células linfoides en la sangre y poseen una fuerte actividad antitumoral citotóxica y producción de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias que contribuyen a la polarización de la respuesta inmune adaptativa. Su actividad citotóxica es ejercida a través de la vía secretora y la expresión de receptores de muerte, mientras que su actividad inflamatoria se ejerce gracias a la secreción de citoquinas, especialmente IFN- γ y TNF, y quimiocinas tales como CCL5, XCL1 y XCL2 (Cantoni et al., 2020; Barry et al., 2018; Böttcher et al., 2018; Martín-Fontecha et al., 2004; Mailliard et al., 2005; Wong et al., 2013; Ferlazzo et al., 2004a, 2004b). Existe evidencia que muestra que su actividad citotóxica se asocia con un riesgo reducido de padecer cáncer (Imai et al., 2000). Asimismo, estudios más recientes indican que la frecuencia, infiltrado y función de las células NK están asociadas con una mejor sobrevida de pacientes oncológicos (Cursons et al., 2019; Li et al., 2020; Lee et al., 2019; Gil and Kim, 2019). Por lo tanto, las células NK cumplen un rol crucial en la respuesta inmune antitumoral.

La activación de estas células está finamente regulada por un repertorio de receptores de superficie inhibidores y activadores que reconocen a sus ligandos en las células blanco. Las células NK también pueden activarse en respuesta a citoquinas, por lo que pueden integrar múltiples señales del entorno y calibrar así sus funciones efectoras (Mujal et al., 2021; Björkström et al., 2022; Zwirner and Ziblat, 2017). Entre los receptores activadores utilizados por las células NK para detectar células tumorales, se destacan CD16a (FcRIIIa) y NKG2D (CD314). CD16a reconoce la fracción Fc de los Ac de tipo IgG (principalmente IgG1 e IgG4) y es responsable de desencadenar la ADCC, por lo que contribuyen a la eficacia de varios AcMo terapéuticos contra moléculas expresadas en la superficie de las células tumorales (Wang, 2015). NKG2D es un receptor crítico en la inmunidad antitumoral (Guerra et al., 2008). Se ha observado que el bloqueo de NKG2D en modelos in vivo o ratones *knock out* para este receptor incrementa la susceptibilidad al desarrollo espontáneo de tumores y la progresión tumoral (Smyth et al., 2005; Guerra et al., 2008). En humanos, se le conocen 8 ligandos (NKG2DL) dentro de los que se destacan MICA y MICB (*MHC class I chain related protein A y B*) (Zhang et al., 2015). Éstos se expresan de forma selectiva en casi todos los tipos de tumores, pero no en tejidos sanos (Madjd et al., 2007; Watson et al., 2006; Groh et al., 1999). A pesar de ello, se han detectado transcritos de MICA y MICB en la mayoría de los tejidos con excepción del sistema nervioso central (Schrambach et al., 2007). Sin embargo, debido a que los NKG2DL sufren modificaciones post-traduccionales que regulan su expresión en superficie (Ashiru et al., 2013; Mellergaard et al., 2014; Fang et al., 2014), su presencia en la superficie de tejidos sanos suele ser baja o nula. Adicionalmente, se ha reportado

un pool intracelular de MICA/B en muchos tipos tumorales y en algunos epitelios sanos (Ghadially et al., 2017). En nuestro laboratorio, hemos observado que MICA es el NKG2DL expresado con mayor intensidad en la superficie de células tumorales de pacientes con carcinomas renales de células claras (*clear cell renal cell carcinoma*, ccRCC) (Secchiari et al., 2022)

MICA es codificada por un gen polimórfico. La gran mayoría de los alelos de la población codifican para una proteína que posee tres dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ (exones 2 a 4), un dominio transmembrana (exón 5) y una cola citoplasmática (exón 6) (Stephens, 2001; Zwirner et al., 2000). MICA tiene una muy baja tasa mutacional (<https://portal.gdc.cancer.gov/>).

Aunque la expresión de los ligandos de NKG2D en la superficie de células tumorales promueve su eliminación por el sistema inmune, los tumores presentan estrategias de escape que subvierten la función biológica de dicho receptor y facilitan la inmunoevasión debido a la liberación de sMICA. Ésta es producida por clivaje proteolítico y el desprendimiento de su ectodomínio por acción de metaloproteinasas de matriz (*matrix metalloproteinases*, MMP) y es detectable en suero de pacientes con tumores (Waldhauer et al., 2008; Groh et al., 2002; Salih et al., 2002). La función dual descripta se representa gráficamente en la Figura 1. Datos recientes indican que la actividad inmunoevasora de sMICA en las células NK se debe mayoritariamente al bloqueo de NKG2D por sMICA (Du et al., 2019) y, en menor medida, por la regulación negativa y degradación de NKG2D debido a la unión de sMICA (Salih et al., 2003; Groh et al., 2002; Salih et al., 2002). Se ha descrito un motivo de 6 aminoácidos en el dominio $\alpha 3$ de MICA/B responsable de la interacción con la proteína chaperona ERp5, lo que hace a MICA/B permisivas a la acción proteolítica de las MMPs (Kaiser et al., 2007) y su posterior *shedding*. Mutaciones en este motivo previenen el *shedding* sin interferir con el reconocimiento por parte de NKG2D (Wang et al., 2009).

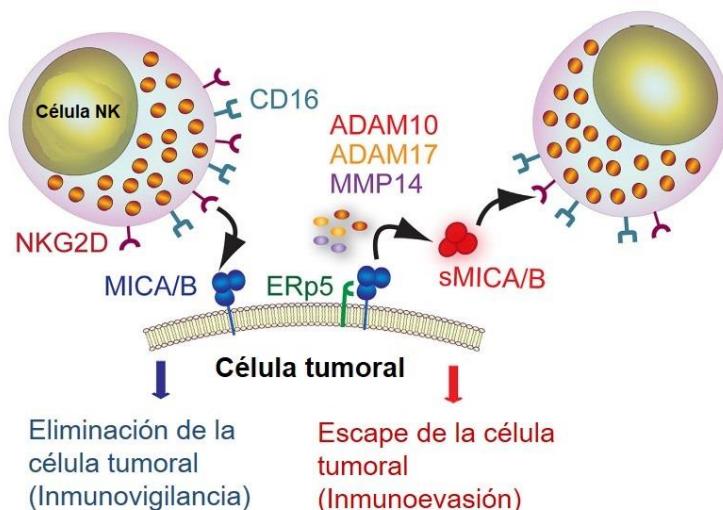


Figura 1. MICA y MICB como moléculas blanco para la inmunovigilancia por células NK y como mediadoras del escape tumoral. A través de NKG2D, las células NK pueden reconocer a MICA/B expresadas en la superficie de las células tumorales y promover su eliminación (inmunovigilancia). Sin embargo, MICA/B, a través de la asociación con ERp5, puede experimentar un clivaje proteolítico mediada por MMP (ADAM10, ADAM17 y MMP14) y generar sMICA/B que interfieren con la función de NKG2D, lo que facilita la inmunoevasión. (Fuertes M.B. et al. *Front Immunol*, 2021)

A pesar de que los bloqueadores de puntos de control inmunológico (*immune checkpoint blockers*, ICB) han revolucionado la inmunooncología (IO) y la inmunoterapia del cáncer, en los casos más favorables sólo un 40% de los pacientes que reciben terapia combinada con AcMo anti-CTLA4 y anti-PD-1 o PD-L1 sobreviven más de 5 años (Klemen et al., 2020). En cambio, el resto no responde, presentan efectos adversos o muestran hiperprogresión (Kalbasi and Ribas, 2020; Champiat et al., 2018). Hacer blanco en MICA empleando Ac emerge como una estrategia de vanguardia con el fin de eliminar células tumorales debido a que tales Ac podrían promover la ADCC (vía CD16) y la ADCP contra células tumorales y, simultáneamente, promover la depuración de sMICA por formación de complejos inmunes captados por macrófagos de bazo (por reconocimiento a través de receptores CD16, CD32 y CD64). Adicionalmente, el desarrollo y uso de AcMo no bloqueantes de la unión de NKG2D con MICA/B también permitiría desencadenar las funciones efectoras de las células NK dependientes de NKG2D, contribuyendo a la eliminación de células tumorales. Así, se han desarrollado AcMo anti-MICA que exhibieron actividad terapéutica (Jinushi et al., 2006; Zhang et al., 2017; Du et al., 2019; Ferrari De Andrade et al., 2018; Powderly et al., 2022; Wang et al., 2023). En nuestro laboratorio, empleando una estrategia de vacunación con una proteína químérica altamente inmunogénica (BLS-MICA) hemos demostrado que los Ac polyclonales anti-MICA son terapéuticos debido a que inducen ADCC por células NK y la depuración de sMICA, lo que resulta en un remodelado del microentorno tumoral (*tumor microenvironment*, TME) caracterizado por un mayor infiltrado de macrófagos M1 (macrófagos proinflamatorios) intratumorales y reclutamiento de linfocitos T CD8 que experimentaron contacto con antígeno (Torres et al., 2020). Estos resultados motorizaron el estudio de la potencial utilidad terapéutica de un AcMo anti-MICA no bloqueante de tipo IgG2bκ (denominado D7) desarrollado previamente en nuestro laboratorio (Fuertes, 2003), que también reconoce la molécula estrechamente relacionada MICB (Molinero et al., 2004). Mediante un convenio entre el CONICET y el laboratorio biofarmacéutico GSK (12/2017- 12/2022) se demostró que D7 ejerce un marcado efecto terapéutico contra tumores que expresan MICA y se mapeó su epitope. Además, modelos preclínicos in vitro con versiones humanizadas del AcMo D7

han permitido demostrar que éstos inducen ADCC por células NK humanas, ADCP por macrófagos humanos y facilitan la fagocitosis de sMICA por macrófagos humanos, lo que condujo al licenciamiento de este AcMo a GSK para el desarrollo de una potencial nueva medicina para el tratamiento de pacientes con cáncer. Adicionalmente, se observó que el AcMo D7 también fue terapéutico contra tumores humanos que expresan naturalmente MICA en un modelo xenogeneico de ratones *nude* (Regge, 2024). Por otro lado, en un estudio clínico en pacientes con un AcMo contra MICA de otra empresa, se demostró que otro AcMo que reconoce el mismo blanco tiene un perfil de seguridad aceptable (Powderly et al., 2022; Wang et al., 2023) lo que valida a MICA como nuevo blanco molecular en IO.

Establecer con precisión el mecanismo de acción *in vivo* del AcMo D7, es decir, si es efectivo contra tumores que expresan MICA en superficie, tumores productores de sMICA o ambos, es fundamental para poder realizar una selección racional de pacientes a ser enrolados en los futuros estudios clínicos planeados con el candidato líder humanizado derivado de nuestro AcMo, basándonos en la expresión de MICA en las células tumorales y en el análisis de la presencia de sMICA en suero o plasma de los pacientes (panorama competitivo terapéutico del AcMo).

Hipótesis

El AcMo D7 desarrollado por nuestro laboratorio posee efectos terapéuticos contra tumores que expresan MICA en superficie a través del mecanismo de ADCC y ADCP, pero no contra tumores que sólo producen sMICA, o bien contra tumores que producen sMICA por depuración de sMICA, pero no contra tumores que expresan MICA en superficie, o bien contra tumores que expresan MICA en superficie y que también producen sMICA, a través de ADCC, ADCP y la depuración de sMICA.

Objetivo general

En este contexto, el objetivo general del presente trabajo de Tesis de Licenciatura fue generar líneas celulares tumorales murinas que sólo pueden expresar MICA en superficie y líneas celulares tumorales murinas que sólo producen sMICA, con el fin de utilizarlas en modelos preclínicos destinados a elucidar el mecanismo de acción del AcMo D7 y establecer si es efectivo contra tumores que expresan MICA en superficie porque promueve ADCC y ADCP, y si es efectivo contra tumores que principalmente producen sMICA porque promueve la depuración de sMICA.

Objetivos específicos

- Generar partículas pseudo-lentivirales que codifiquen una variante de MICA mutada en el dominio $\alpha 3$ por la cual están deshabilitados para producir sMICA (*shedding-disabled*, MICA*001-SD), y partículas pseudo-lentivirales que codifiquen una variante de MICA truncada que sólo puede ser secretada (*shedding-only*, MICA*001-SO).
- Emplear estos lentivirus no replicativos para generar líneas celulares murinas que expresen MICA*001-SD o MICA*001-SO como herramienta destinada a un proyecto subsiguiente cuyo objetivo es elucidar el mecanismo de acción in vivo del AcMo anti-MICA desarrollado en el laboratorio.

Materiales y métodos

Se utilizó el sistema de tercera generación de vectores lentivirales que consiste en la utilización de cuatro plásmidos totales: tres accesorios, pLVSV-g (envoltura), pLRRE (codificante de genes Gag y Pol) y pLRev; y el plásmido codificante del gen de interés. Para la presente tesis se diseñaron y adquirieron (VectorBuilder) los dos plásmidos de expresión con las variantes de MICA de interés (Figura 2).

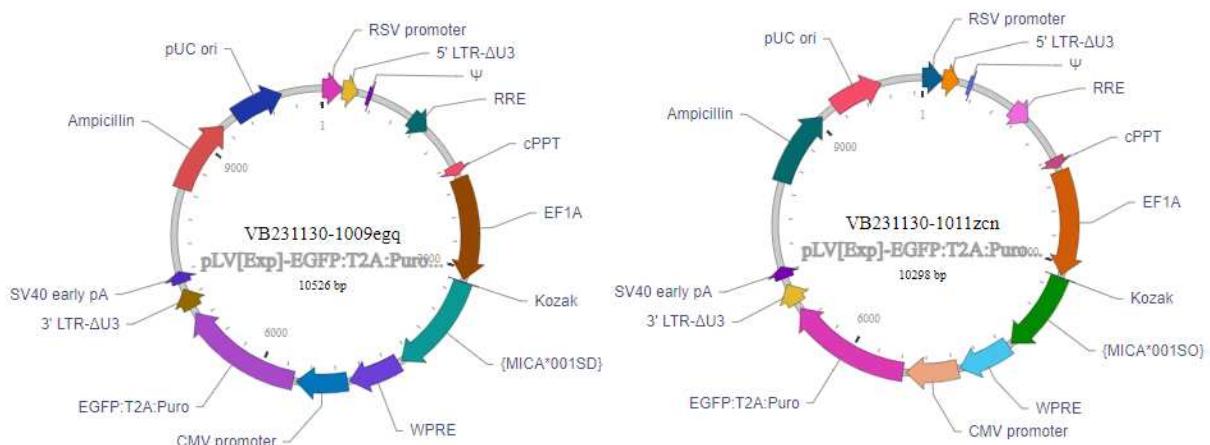


Figura 2. Mapa de los plásmidos que codifican las variantes MICA*001-SD y MICA*001-SO.
Contienen un *cassette* bicistrónico para la resistencia a puromicina y eGFP, unidos por la secuencia “autoclivable” T2A.

Para generar la variante de MICA*001-SD (cDNA) se diseñó una secuencia de MICA con reemplazo en el hexapéptido natural (aminoácidos 215 a 274) de su dominio $\alpha 3$ (exón 4) por una secuencia similar presente en las moléculas de CMH-I que impide la producción de sMICA (Wang

et al., 2009). Para producir la variante MICA*001-SO se introdujo un codón de terminación al final del dominio α3 (exón 4) de MICA, generando una variante solamente con el ectodomnio.

Respecto a todo lo mencionado en la presente sección es pertinente aclarar que se trabajó siempre en condiciones de esterilidad en flujo laminar en Cabina de Bioseguridad de tipo 2 (BSL2) y con materiales previamente esterilizados. Además, donde corresponda se menciona pertinente condición de seguridad adicional.

I) Purificación de plásmidos y stock bacteriano

Se adquirieron ambos plásmidos MICA*001-SD y MICA*001-SO a la empresa VectorBuilder, la que los remitió adsorbidos en papel. Se eluyeron los plásmidos mediante resuspensión en 100 µl de agua libre de DNAsas y RNAsas, incubando 30 min y tomando el volumen de líquido restante en un tubo eppendorf. De esta forma se obtuvieron alícuotas de plásmidos de baja concentración (medidas con Nanodrop). Posteriormente se preparó el stock de bacterias transformadas (*E. coli* cepa JM109) para cada plásmido y se purificaron éstos según se detalla en la sección siguiente. En relación con los plásmidos accesorios, el laboratorio contaba con pequeñas alícuotas purificadas congeladas a -20°C.

En todos los casos se trabajó con ampicilina a concentración final de 100 µg/ml como agente de selección. Para cada uno de los plásmidos se transformaron las bacterias con el método de shock térmico y cloruro de calcio (CaCl₂). Para ello se descongelaron 100 µl de bacterias con buffer con CaCl₂, se homogeneizó su contenido suavemente y se agregó 1 µg de ADN plasmídico correspondiente. Esta mezcla se incubó en hielo durante 20 min, se la sometió a shock térmico de 42°C durante 90 seg sin agitación (en bloque térmico) y se colocó inmediatamente en hielo durante 2 min. Se agregaron 500 µl de medio Luria Bertani (LB) sin antibióticos y finalmente se incubó 1 h a 37°C en agitador a 180 rpm. Se plaquearon 50 y 100 µl en sendas placas de Petri para bacterias con medio LB semisólido (con agar, LB-agar 1,5%) con ampicilina. Se utilizaron dos volúmenes de inoculación distintos ya que se desconocía la eficiencia de transformación para cada caso en particular. Además, se preparó un control negativo (5 µl de las bacterias competentes sin transformar en 200 µl de LB sin antibiótico) inoculando también 100 µl en placas LB-agar con ampicilina, esperando que no haya crecimiento bacteriano ya que las bacterias no poseen plásmido de resistencia al antibiótico. Las placas de LB-agar con ampicilina fueron preparadas el día anterior a la transformación y conservadas invertidas y selladas con Parafilm en heladera.

Todas las placas se incubaron en estufa a 37°C durante 18 h con el fin de permitir el crecimiento de colonias aisladas. Se eligió la placa donde éstas fueran más visibles, se tomó una

al azar y se resuspendieron las bacterias en 5 ml de medio LB con ampicilina en un tubo cónico de 50 ml. Se incubó con agitación a 250 rpm a 37 °C durante 8 h, se realizó una dilución 1/500 tomando 100 µl y llevándolo a un volumen de 50 ml de LB con ampicilina en un Erlenmeyer de 500 ml estéril. Este cultivo fue incubado durante 18 h a 37°C en agitador a 250 rpm.

A partir del cultivo bacteriano se siguió el protocolo de lisis y purificación de cada plásmido utilizando el kit “*Qiagen Plasmid Midi Kit*”, siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. Luego se procedió a evaluar la concentración y pureza aproximadas del ADN plasmídico en un equipo Nanodrop (ThermoFisher), registrando las absorbancias a 260 nm y 280 nm. Estos pasos se realizaron en mesada, en condiciones no estériles. Los plásmidos purificados se guardaron a -20°C y se utilizaron para transfectar células HEK293FT con el objetivo de producir los lentivirus.

Con el objeto de preservar las bacterias transformadas con los plásmidos de interés se realizó el stock de glicerol correspondiente colocando en un criotubo 500 µl de cultivo bacteriano con 500 µl de glicerol 50% previamente filtrado. Se homogeneizó suavemente y se congeló a 70°C.

Con el objeto de evaluar la integridad de los plásmidos se corrieron geles de agarosa al 1% (Inbio Highway), preparada en buffer TAE 1X (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA) durante 90 min a 50 V. Se sembraron 10 µl de marcadores de peso molecular 1Kb (New England Biolabs) y 15 µl de la mezcla de cada muestra que se preparó con 3 µl de buffer de siembra (Inbio Highway) en 16 µl de TAE 1X y 1 µl de ADN; las concentraciones de los plásmidos se detallan en la Tabla 1. Se reveló utilizando el intercalante SYBR (Thermofisher, 10000X) en un equipo GBox (Syngene), utilizando el software GeneSnap.

Plásmido (pL)	Concentración (µg/µl)
RRE I	1,70
RRE II	1,078
VSV-g I	5,87
VSV-g II	3
Rev I	3
Rev II	2

Tabla 1. Alícuotas de plásmidos accesorios preexistentes en el laboratorio

II) Cultivos celulares

Para la presente tesis se utilizaron líneas celulares tumorales murinas Renca, 4T1 y EL4, y la línea celular humana HEK293FT. Según se detalla más adelante, se las mantuvo en DMEM completo (DMEMc) o RPMI completo (RPMIc) consistentes en DMEM base (Thermofisher) o RPMI base (Gibco) con 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor), 0,292 mg/ml de glutamina (Invitrogen,), 54 ng/ml de piruvato sódico (Invitrogen) y 40 µg/ml de gentamicina (Richet). Para las líneas Renca y HEK293FT el medio completo fue suplementado con aminoácidos no esenciales (NEAA) 1X (Gibco).

Protocolo de descongelado para las líneas celulares utilizadas

Todas las líneas celulares se encontraban preservadas en criotubos en nitrógeno líquido (N_2) en medio de cultivo completo (el que correspondiere) con 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) y 10% SFB. El contenido de cada criotubo de 1 ml fue descongelado resuspendiéndolo inmediatamente en solución fisiológica estéril a temperatura ambiente (TA) y centrifugando a 400 g durante 5 min. Las células fueron resuspendidas en 5 ml de medio completo precalentado a 37°C y transferidas a una botella de cultivo celular T25 y cultivadas en una estufa a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂.

Protocolo de repique para las líneas celulares utilizadas

Cuando las células alcanzaron una confluencia del 90%, se descartó el medio de cultivo, se lavó con 2 ml de solución fisiológica y se incubó 5 min a 37°C con 500 µl de TripLEx (Gibco) (para cultivos en botella T25) o 1500 µl (para cultivos en botella T75). Se agregaron 4 ml de solución fisiológica con el fin de diluir el TripLEx, se cosechó la suspensión celular y se centrifugó a 400 g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de medio completo. Finalmente se tomó el volumen correspondiente según la dilución sugerida para repicar cada línea celular y se lo llevó a volumen final de 5 ml con medio de cultivo completo (para cultivar en botella T25) o de 15 ml (para cultivar en botella T75). Se realizó el seguimiento y registro del número de pasajes correspondientes.

En el caso de EL4 (células en suspensión) el medio de cultivo fue reemplazado una vez virado de color. Para ello, fue centrifugado a 400 g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de medio completo. Se tomó el volumen correspondiente a la dilución sugerida y se lo llevó a 5 ml de medio completo en botellas T25.

Cada línea celular fue monitoreada cada dos días mediante el uso de un microscopio invertido (Olympus CKX41) con aumentos de 40X, 100X y 200X. Para células adherentes, el medio de cultivo fue renovado también cada dos días.

Cuando fue necesario se realizó el recuento de células en cámara de Neubauer.

Producción de partículas pseudo-lentivirales

Transfección de HEK293FT por el método de fosfato de calcio

Se utilizó la línea celular HEK293FT como línea empaquetadora de partículas pseudo-lentivirales. Luego del primer repique, se cultivaron en presencia del antibiótico de selección genética G418 (InVivoGen) en una concentración final de 500 µg/ml. Las células fueron mantenidas con DMEMc suplementado con NEAA junto con G418 durante 5 días antes de realizar la transfección con los plásmidos. Su monitoreo y repique se realizaron de la forma descrita con anterioridad. Con el objeto de realizar la transfección se emplearon células con pasaje menor a 20. Se utilizó CaCl₂ 1,25M y buffer HEPES (HSB) 0,5M.

El día anterior a la producción de las partículas virales se sembraron en una placa p100 2,5 millones de células HEK293FT en un volumen final de 10 ml de DMEMc suplementado con NEAA junto con genética. Al día siguiente y dos horas antes del experimento, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco precalentado a 37°C sin antibiótico. Una vez re-adheridas todas las células se prepararon por separado dos tubos con las siguientes mezclas:

- Tubo 1: 20 µg plásmido de interés, 10 µg de plásmido pLRRE, 5 µg de plásmido pLRev, 5 µg de plásmido pLVSV-g, (relación 4:2:1:1), 84 µl CaCl₂ y se llevó a volumen final de 840 µl con H₂O estéril (aproximadamente 740 µl de agua). Se preparó un tubo para cada plásmido de interés.
- Tubo 2: 840 µl de buffer HSB (2X) a TA.

Se agregó el contenido del tubo 1, gota a gota, al tubo 2, mientras éste se burbujeaba constantemente, de manera que las soluciones se mezclaran correctamente. La mezcla se incubó durante 15 min a TA. Luego se transfirió la solución de plásmidos, también gota a gota, a la placa con las células HEK293FT. Cada placa fue homogeneizada suavemente para luego ser cultivada en la estufa. El medio de cultivo conteniendo las partículas virales (de acá en adelante mencionado como sobrenadante viral o Sv) fue recolectado a las 24, 48 y 72 h con pipeta descartable de 10 ml en un tubo cónico de 15 ml. Se centrifugó a 600 g durante 5 min y se filtró con filtro de PES de 0,45 µm. Este proceso se realizó para cada tipo de Sv (uno por cada plásmido de interés). A las 24

y 48 h, a cada placa de células HEK293FT se les renovó 10 ml de medio fresco sin antibiótico precalentado a 37°C. Luego, las células fueron cultivadas en estufa. Los sobrenadantes virales fueron conservados a -20°C para su concentración y congelado a -70°C al día 5 (último día de recolección de Sv), o congelados sin concentrar a -70°C.

Los materiales fueron sometidos a luz UV inmediatamente luego de su uso, previos a ser retirados de la cabina de bioseguridad. Finalmente, todo el material utilizado que tuvo contacto con el Sv fue inactivado con lavandina 10% durante, al menos, 24 h, antes de ser descartado.

Se produjeron tres tipos de Sv, correspondientes a los tres plásmidos de interés utilizados: MICA*001-SD, MICA*001-SO y MICA*001-WT. El plásmido pL-MICA*001-WT (1,8 µg/µl), codificador para la proteína MICA*001 *wild type*, fue adquirido ya purificado (VectorBuilder); posee la misma selección eucariota que los plásmidos codificantes para MICA*001-SO y MICA*001-SD (resistencia a puromicina).

Las células HEK293FT fueron monitoreadas por observación en un microscopio de epifluorescencia tomando imágenes representativas (cámara Olympus Q-Color 5™) de los pocillos en fluorescencia en el canal verde utilizando el microscopio invertido (Olympus CKX41). Las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ.

Concentración de partículas pseudo-lentivirales

Se utilizaron tubos de filtración Amicon® Ultra-15 100K (Sigma Aldrich) estériles con el objeto de concentrar los Sv de los tres días de producción. Las centrifugaciones fueron realizadas en centrífuga con rotor oscilante a 4°C (IEC Centra GP8R, Thermo Electron Corporation). Con el fin de esterilizar los tubos de filtración, se los sumergió en etanol 70% durante 20 min y luego se enjuagaron con agua MiliQ estéril. La concentración de los Sv se realizó centrifugando a 1000 g a 4°C durante media hora. Se tomó ese Sv concentrado (SvC) y se lo utilizó inmediatamente o se lo congeló a -70°C en alícuotas de 100 µl para su posterior uso. Se concentró en un factor de aproximadamente 40X (30 ml volumen inicial a 750 µl volumen final). Adicionalmente, se tomó 3 µl de SvC colocándolo en 500 µl de medio LB estéril para testear contaminación; se lo incubó 18 h en agitación a 250 rpm junto con un control de LB estéril.

Al finalizar su uso, los filtros fueron enjuagados con solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N y luego con agua miliQ estéril (centrifugación 1500 g por 5 min) con el fin de ser reutilizados.

Transducción de líneas celulares blanco

Previo a la transducción se realizó una curva de efectividad de puromicina (antibiótico de selección) de 48 h para cada línea celular, con el objetivo de calcular la concentración letal 50 (CL_{50}). Se sembraron diferentes números de células de acuerdo con el tipo de placa empleado (Tabla 2)

Línea celular	Medio de cultivo	CL_{50} de puromicina ($\mu\text{g/ml}$)	Número de células sembradas en p96 fondo plano	Número de células sembradas en p24	Número de células sembradas en p6
Renca	RPMIc con NEAA	0,4	20 mil	80 mil	300 mil
4T1	RPMIc	2	13 mil	-	-
EL4	DMEMc	2	25 mil	-	-

Tabla 2. Información de manipuleo para cada línea celular murina utilizada.

Para aumentar la eficiencia de transducción se empleó bromuro de hexadimetrina / Polybrene (Sigma Aldrich) en una concentración final de 8 $\mu\text{g/ml}$.

El día previo a la transducción se sembraron las células en placa p96 de fondo plano con 100 μl de medio completo, en p24 con 500 μl de medio, o p6 en 2 ml. Al día siguiente, se descongelaron los Sv correspondientes, se descartó el medio de cultivo de las células y se les colocó, cuando se usarán los Sv sin concentrar de 24 y 48 h post transfección, 500 μl o 2 ml /pocillo de cada uno, según la placa donde se estuviera realizando la infección, junto con polybrene. Además, se dejó un pocillo control con las células en DMEMc con NEAA (el mismo utilizado para la recolección de partículas virales) y polybrene. Se colocó la placa durante una hora en la heladera y finalmente se dejó en estufa de cultivo durante 18 h. Al cabo de un día se les reemplazó el medio contenido a las partículas pseudo-lentivirales por medio de cultivo fresco junto con puromicina a la CL_{50} calculada previamente (Tabla 2). Al control de células (es decir, al control negativo) se le agregó solo medio fresco con el antibiótico de selección.

Las células fueron mantenidas en medio de cultivo con el agregado de antibiótico correspondiente, monitoreadas y amplificadas. Se evaluó la expresión de MICA en superficie, sMICA y la señal de eGFP.

El mismo procedimiento fue realizado cuando se utilizara Sv concentrado (SvC) para líneas celulares Renca, 4T1 y EL4. El volumen de SvC colocado en p96 fue de 100 µl con polybrene, o diluyendo 50 µl de SvC correspondiente junto con 50 µl de medio de cultivo y polybrene 2X (16 µg/ml).

Para el caso de la línea celular Renca, se realizaron infecciones con los tres tipos de Sv o SvC, mientras que para EL4 y 4T1 sólo con los correspondientes a las variantes MICA*001-SO y MICA*001-SD, ya que se disponía previamente de la línea estable expresando MICA*001-WT.

III) Detección de MICA por citometría de flujo

Marcación de MICA de superficie

Con el fin de realizar la marcación de MICA de superficie, las células fueron cosechadas, pasadas a una placa p96 fondo V y lavadas con solución fisiológica. Luego fueron incubadas con 20 µl de AcMo anti-MICA/B (listados a final de sección) diluido en solución fisiológica en la proporción correspondiente; a los controles de autofluorescencia se les agregó 20 µl de solución fisiológica en este paso. Se realizaron también controles de marcación simple y FMO cuando correspondiere, agregando sólo solución fisiológica en el paso pertinente. La incubación del Ac se realizó a 4°C en oscuridad durante media hora. Finalmente, las células fueron lavadas con 100 µl de solución fisiológica, y resuspendidas nuevamente en ésta para ser pasadas por el citómetro de flujo. Los lavados se realizaron por centrifugación a 600 g durante 5 min. Cuando correspondiere para la autofluorescencia se preparó un pocillo con un *pool* de todas las condiciones de células tratadas.

Marcación de MICA intracitoplasmática

Para la marcación de MICA intracitoplasmática se plaquearon a las células en placas p96 de fondo en V, se las lavó y realizó la fijación y permeabilización con el kit *FOXP3 Fix/Perm* (BioLegend). En algunos casos, previamente se incubó a las células durante 5 h con Brefeldina A (BioLegend, 5 µg/ml, diluido en medio completo correspondiente) y Monensina (BioLegend, 2 µM, diluido en medio correspondiente), con el fin de bloquear la vía secretora de proteínas. Luego, las células se resuspendieron en 80 µl del buffer 1 (*Fix/perm*) incubando a TA durante 20 min en oscuridad, se lavaron y resuspendieron en 80 µl del buffer 2 (*Perm*) durante 15 min a TA en oscuridad. Finalmente, se realizó un lavado y se marcaron las células con 20 µl del AcMo anti-MICA/B correspondiente (ver listado a final de sección). La dilución del AcMo se realizó en buffer

Perm 1X. Se incluyó una condición donde las células fueron incubadas solamente con 20 µl de buffer *Perm* 1X para ser empleadas como controles de autofluorescencia, FMO o de marcación simple. Se utilizó PBS 1X para las diluciones de ambos buffers y para los lavados; las centrifugaciones se realizaron a 300 g durante 5 min.

Con el fin de analizar la viabilidad, las células fueron incubadas con la sonda Zombie Aqua (BioLegend), en dilución 1/600 en solución fisiológica, durante 20 min a TA antes de realizar el protocolo de marcación.

En todos los casos, las células marcadas se analizaron en un citómetro de flujo MASQuant16 (Miltenyi Biotec). El análisis de los datos se realizó utilizando el software FlowJo vX.0.7 (BD Biosciences), realizando la compensación de colores necesaria en cada caso. En todos los análisis se descartaron los desechos o fragmentos celulares detectados como eventos con bajos valores de FSC y SSC, y se excluyeron dobletes por FSC A vs FSC H. Los ejes se ajustaron en escala biexponencial. Los resultados se graficaron como histogramas normalizando el eje y según la cantidad de eventos, o como gráficos de pseudocolor (doble marcación).

Se listan los AcMo utilizados en ambas marcaciones

- AcMo anti-MICA/B conjugado con el fluorocromo PE, clon 6D4 (BioLegend).
- AcMo anti-MICA conjugado con fluorocromo APC, clon 159227 (RyD systems).
- AcMo anti-MICA/B conjugado con el fluorocromo APC, clon 6D4 (BioLegend)

IV) Detección MICA soluble

ELISA

Se llevó a cabo un ELISA de captura mediante el uso del kit “Human MICA DuoSet ELISA” (R&D Systems-DY1300) para evaluar la presencia de sMICA en sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares 4T1 y Renca modificadas para producir MICA*001-SO. Estos sobrenadantes provenían de fosas p24 o p6 con un 60% de confluencia, los que fueron congelados a -20°C hasta el momento del análisis. Las muestras fueron centrifugadas a 14000 g durante 2 min y se utilizaron sin diluir. Se empleó un AcMo anti-MICA clon 159233 (R&D systems, 2 µg/ml) como Ac de captura, inmovilizado en placas de ELISA de marca COSTAR de alto pegado. MICA capturada fue detectada usando un Ac polyclonal anti-MICA biotinilado (R&D systems, 0,4 µg/ml) y estreptavidina marcada con HRP (BioLegend), revelándose luego con Tetrametilbencidina (TMB, Sigma). Se obtuvo en paralelo una curva de calibración empleando MICA recombinante

(MICAr - alelo MICA*008) producida y purificada en el laboratorio según protocolo publicado (Zwirner et al., 2000). Se midieron las absorbancias 450 nm y 550 nm utilizando un lector ELISA Multiskan FC (ThermoFisher Scientific).

Inmunoensayo en fase heterogénea basado en FRET

Como parte de otro proyecto del laboratorio, se está optimizando un método mejorado para detectar sMICA tanto en muestras de pacientes oncológicos como en sobrenadantes de líneas celulares en cultivo. Este método consiste en un inmunoensayo en fase heterogénea basado en FRET y su diseño se esquematiza en la Figura 3. Empleando esta metodología, también se evaluaron los mismos sobrenadantes medidos utilizando el ELISA comercial. Se realizó en paralelo una curva de calibración. Se emplearon placas negras fondo plano de 96 fosas para luminiscencia (Jet Biofil LTP-021-896). El Ac de captura utilizado fue el AcMo anti-MICA clon 159233 y el de detección empleado fue el Ac polyclonal anti-MICA biotinilado, ambos anteriormente mencionados. Asimismo, para la detección se utilizó Estreptavidina-Europio (Eu) (Abcam ab270228), en conjunto con APC (aloficocianina) soluble en el buffer de revelado. Se registró la lectura de la fluorescencia derivada de APC en un fluorómetro SPARK (TECAN) con filtro de excitación de 320-340 nm (excitación de Eu) y filtro de detección de 660-670 nm (emisión de APC).

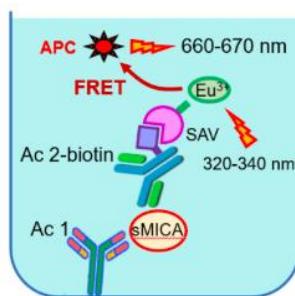


Figura 3. Esquema del inmunoensayo basado en FRET. El anticuerpo de detección está acoplado con Biotina. Para el revelado se utilizó Estreptavidina-Europio y buffer adicionado con APC soluble para detectar la emisión del mismo a 660-670 nm.

Resultados

Transfección con plásmidos previamente existentes en el laboratorio y purificación de un nuevo lote de plásmidos

Debido a que ya se disponía de varias alícuotas de los plásmidos accesorios (pLRRE, pLVSV-g y pLRev), purificadas anteriormente en el laboratorio, en un primer momento se produjo Sv utilizando éstas, y los plásmidos de interés MICA*001-WT, SO y SD. Se detectó fluorescencia de eGFP en las placas de células HEK293FT a partir de las 24 h luego de la transfección con cloruro de calcio (Figura 4). Con los Sv obtenidos se realizó un primer intento de transducción de células Renca en placas p6. Luego de dos días del agregado del antibiótico de selección no se encontraron células vivas (es decir, ninguna resistió el agregado de puromicina), por lo que la transducción no fue exitosa.

Se procedió entonces a evaluar la integridad de los plásmidos. Por siembra y corrida en gel de agarosa al 1%, se encontró que al menos uno de los plásmidos accesorios utilizados para la producción de Sv no estaba en la conformación correcta, presentando diversas formas, presumiblemente debido a la acción de DNAsas presentes en las alícuotas (Figura 5, destacados con flechas naranjas); adicionalmente se evidenció el mismo problema para las demás alícuotas del laboratorio. Este hecho puede impactar negativamente en la correcta producción de partículas lentivirales. Si hubiere fragmentos de degradación de pocas pares de bases (pb) no pudieron ser visualizados en este gel, ya que habrían migrado conjuntamente con el frente de corrida, el cual se pierde en los tiempos de corrida que se evaluaron.

Frente a esta situación se intentó preparar un nuevo lote de plásmidos a partir de bacterias donadas gentilmente por otro laboratorio, que habían sido anteriormente transformadas con los plásmidos accesorios. Sin embargo, no se obtuvieron purificaciones exitosas ya que la relación absorbancia 260/280 dio muy baja (datos no mostrados). Se decidió entonces tomar una alícuota de cada plásmido accesorio pLRRE, pLVSV-g y pLRev (RRE I, VSV-g I y Rev I en la Figura 5) del laboratorio, y con ellas transformar bacterias competentes *E. coli* JM109 por shock térmico para luego proceder a la purificación del nuevo lote de dichos plásmidos (Tabla 3). Paralelamente se purificaron, a partir de bacterias transformadas, los plásmidos MICA*001-SO y MICA*001-SD (Tabla 3). Una vez obtenidas las nuevas alícuotas, se corrió otro gel para evaluar su estado. Los resultados de la Figura 5 corresponden a una corrida en gel de agarosa conjunta con todas las muestras de plásmidos.

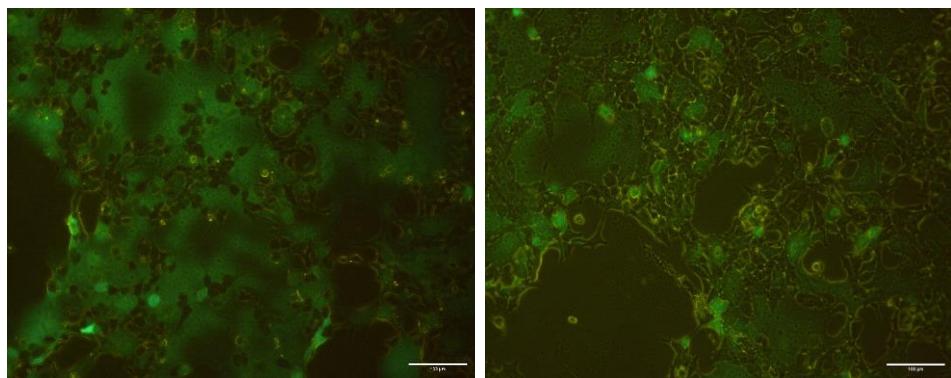


Figura 4. Células HEK293FT luego de 24 h de co-transfección con los plásmidos accesorios y el plásmido codificador para MICA*001-SO o MICA*001-SD y eGFP. Vistas al microscopio de epifluorescencia (Excitación con luz azul). **Izquierda:** MICA*001-SO. **Derecha:** MICA*001-SD. Las células HEK293FT transfectadas con MICA*001-WT no se muestran ya que no codifican para eGFP. Barra blanca: 100 μ m.

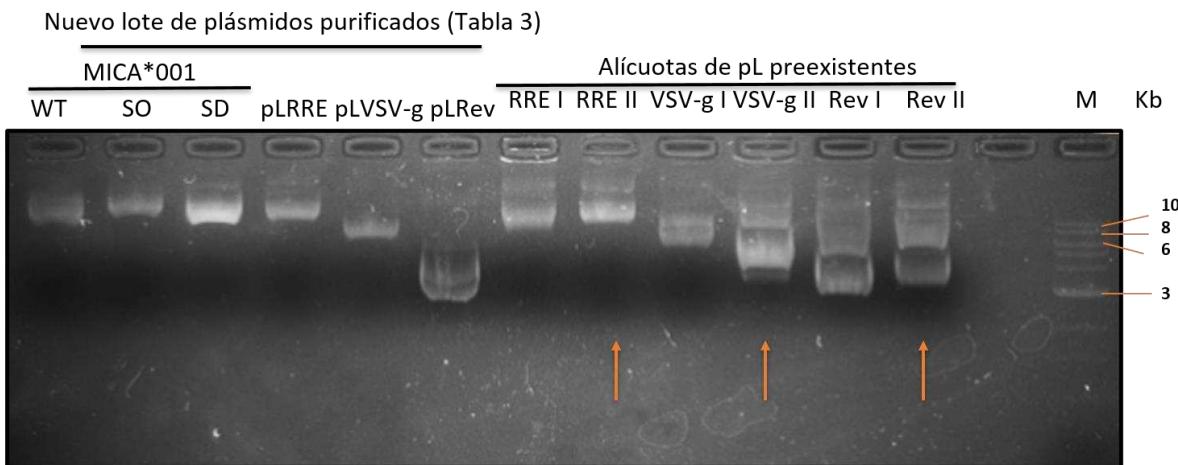


Figura 5. Gel de agarosa 1% de alícuotas de ADN plasmídico. De izquierda a derecha: las tres primeras calles corresponden a los plásmidos de interés codificando MICA*001. pLRRE, pLVSV-g y pLRev corresponden al nuevo lote de plásmidos accesorios purificados, utilizadas para las últimas transducciones (Tabla 3); últimas 6 calles con alícuotas de plásmidos preexistentes en el laboratorio (Tabla 1). M corresponde al marcador de peso molecular. El plásmido pLRev es de menor tamaño y por eso migra más que los demás. Los plásmidos marcados con flechas naranjas fueron los utilizados para la primera producción de Sv. Como se evidencia, los patrones de corrida de las alícuotas conservadas en el laboratorio difieren con los nuevos lotes de plásmidos purificados. Las alícuotas RRE I, VSV-g I y Rev I fueron las usadas para transformar a las bacterias competentes.

Plásmido (pL)	Concentración (μ g/ μ l)	Abs(260 nm/ 280 nm)
---------------	-----------------------------------	---------------------

VSV-g	1,31	1,92
Rev	1,68	1,91
RRE	1,53	1,92
MICA*001-SO	0,84	1,92
MICA*001-SD	1,29	1,94

Tabla 3. Plásmidos del nuevo lote obtenidos por purificación con *Qiagen Plasmid Midi Kit*, medidos con el equipo Nanodrop.

Transducción de células Renca con sobrenadante viral sin concentrar

A partir de la transfección de células HEK293FT con los plásmidos, se procedió a realizar otra producción de Sv. Se observó abundante señal de fluorescencia para eGFP por microscopía en las células HEK293FT (no mostrado). En esta oportunidad se decidió hacer la transducción viral con el Sv fresco de 24 y 48 h sin concentrar, ya que así se había realizado con anterioridad en el laboratorio de forma exitosa. El Sv fresco fue almacenado en heladera durante un día hasta su uso. Células Renca fueron sembradas en placas p6 y p24, y se infectaron con Sv MICA*001-WT, Sv MICA*001-SO y Sv MICA*001-SD de 24 h y de 48 h respectivamente. Al día siguiente se repitió el protocolo de transducción con el mismo tipo de Sv utilizado el día anterior (24 o 48 h) y finalmente, un día después se agregó a cada pocillo el antibiótico de selección. A pesar de no observar células resistentes a puromicina en el microscopio ni tampoco encontrar rastros de eGFP con el microscopio de epifluorescencia, se renovó cuidadosamente el medio con antibiótico y al cuarto día se procedió a evaluar la expresión de MICA en las células por citometría de flujo. Se las marcó con sonda de viabilidad Zombie Aqua (ZA) para excluir a las células no viables del análisis. La estrategia de *gate* que se utilizó para las células evaluadas marcadas con ZA se detalla en la Figura 6. Los primeros pasos del análisis siempre incluyeron descartar los eventos menos granulares y más pequeños (los cercanos al inicio de ambos ejes) que corresponde a desechos o fragmentos celulares, y luego seleccionar los eventos únicos, determinados por una línea diagonal bien delimitada del gráfico FSC-A vs FSC-H. Seguidamente, se realizó la selección de las células viables que consisten en los eventos con baja marca para ZA. Por el contrario, los eventos con alta marca para ZA fueron descartados del análisis subsiguiente, ya que corresponde a células no viables. Se estudió la expresión de MICA en superficie trazando histogramas para el fluorocromo PE acoplado a AcMo anti-MICA/B. En ninguna de las condiciones experimentales se detectó

marcación positiva para MICA (Figura 7 y Figura 8). Para los tres casos, la cantidad total de células evaluadas fue baja (no más de 1500), por lo que pueden apreciarse ciertos desvíos propios del error de analizar tan pocos eventos, especialmente en MICA*001-SO (Figura 7). En el caso de células Renca-MICA*001-SO no se espera marca positiva de MICA en superficie, pero para éstas tampoco se observó señal verde en el microscopio de fluorescencia.

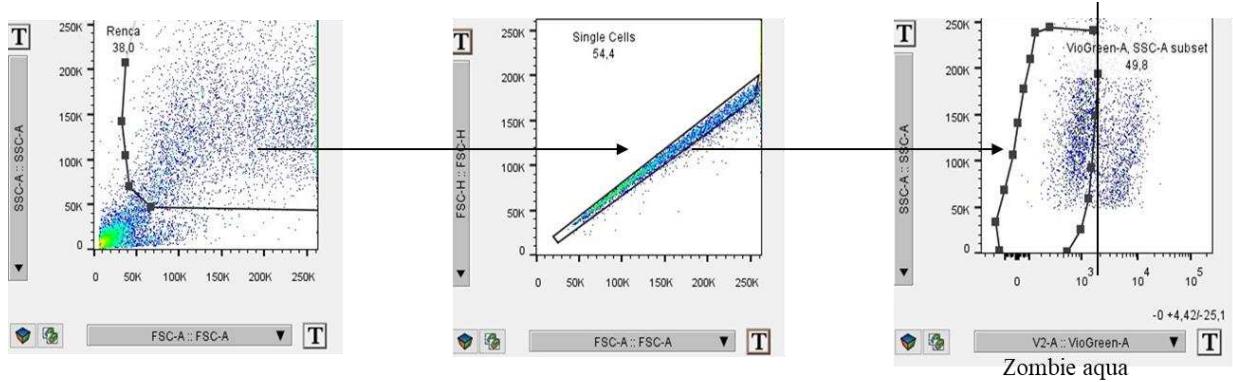


Figura 6. Estrategia de gate de los análisis de citometría. Como primer paso siempre se descartaron los desechos o fragmentos celulares, luego seleccionando los eventos únicos y posteriormente, en algunos casos, seleccionando los eventos con baja marca de ZA que corresponden a las células viables. Los eventos con alta marca para ZA son células no viables.

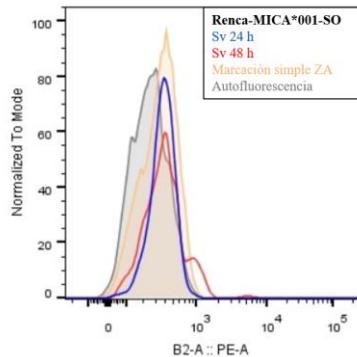


Figura 7. Análisis de la expresión de MICA en superficie de células Renca-MICA*001-SO generadas empleando Sv de 24 (azul) y Sv 48 h (rojo) sin concentrar. La marcación se realizó con el AcMo anti-MICA/B-PE, clon 6D4. Se representó en naranja claro el control de marcación simple para ZA, es decir, células Renca-MICA*001-SD y Renca-MICA*001-SO (*pool*) marcadas sólo con ZA; en gris se representó la autofluorescencia sin ninguna marca para células Renca-MICA*001-SD y Renca-MICA*001-SO (*pool*).

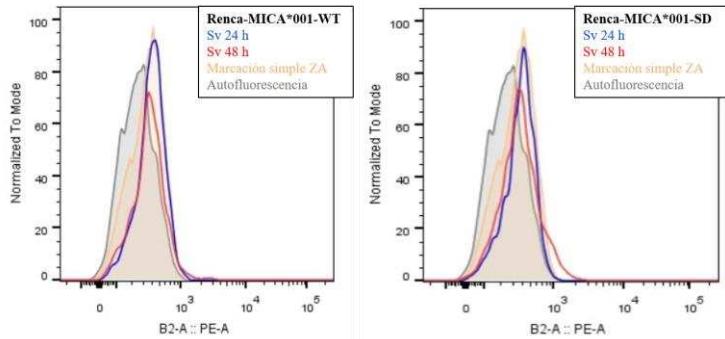


Figura 8. Análisis de la expresión de MICA en superficie. Izquierda: células Renca-MICA*001-WT. Derecha: células Renca-MICA*001-SD, para Sv de 24 (azul) y 48 h (rojo) sin concentrar. La marcación se realizó con el AcMo anti-MICA/B-PE clon 6D4. Se representó en naranja claro el control de marcación simple para ZA, es decir, células Renca-MICA*001-SD y Renca-MICA*001-SO (*pool*) marcadas sólo con ZA; en gris se representó la autofluorescencia sin ninguna marca para células Renca-MICA*001-SD y Renca-MICA*001-SO (*pool*).

Las células restantes en cultivo no sobrevivieron los días subsiguientes a la selección con puromicina, por lo que se infirió que la transducción viral no fue exitosa.

Así, se decidió realizar las posteriores transducciones virales con SvC. Dado que el Sv producido anteriormente se congeló a -70°C sin concentrar, y es sabido que el título viral decae de manera importante en cada ciclo de congelación-descongelación, se resolvió producir una vez más Sv y concentrarlo fresco. De esta forma, se produjo nuevamente Sv con los nuevos lotes de plásmidos purificados. Las células empaquetadoras mostraron una vez más señal de eGFP en el microscopio de fluorescencia, tanto a las 24 como a las 48 y a las 72 h post transfección. Además, fue notoria la diferencia de fluorescencia entre Svs, la cual fue mayor para MICA*001-SO (Figura 9) que para MICA*001-SD (Figura 10) a pesar de que la producción se realizó simultáneamente y en iguales condiciones.

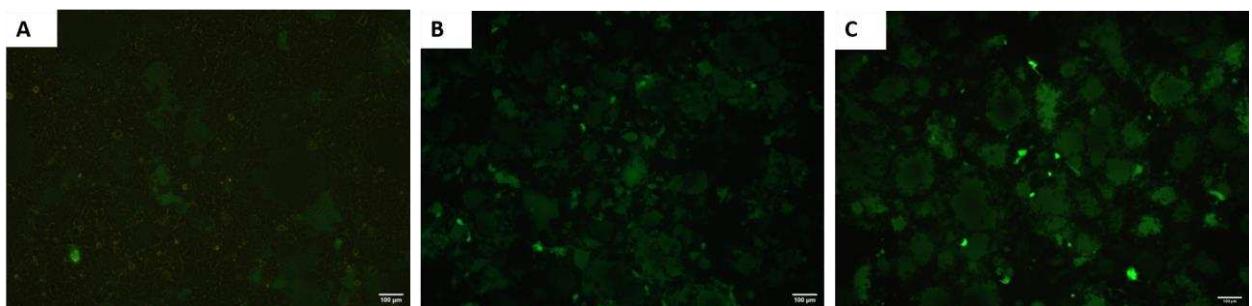


Figura 9. Células HEK293FT post co-transfección con los plásmidos accesorios y pL-MICA*001-SO. **A:** Células HEK293FT luego de 24 h de co-transfección. **B:** Células HEK293FT luego de 48 h de

co-transfección. C: Células HEK293FT luego de 72 h de co-transfección. Las células HEK293FT transfectadas con MICA*001-WT no se muestran ya que no codifican para eGFP. Barra blanca: 100 μ m

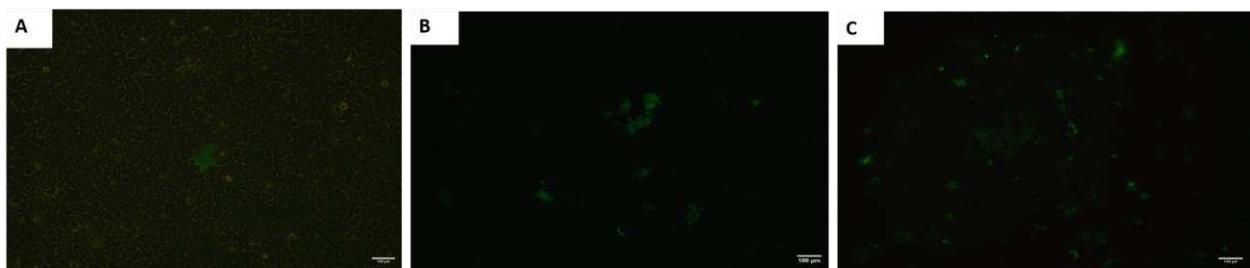


Figura 10. Células HEK293FT post co-transfección con los plásmidos accesorios y pL-MICA*001-SD. A: Células HEK293FT luego de 24 h de co-transfección. B: Células HEK293FT luego de 48 h de co-transfección. C: Células HEK293FT luego de 72 h de co-transfección. Barra blanca: 100 μ m

Transducción de líneas celulares murinas con sobrenadante viral concentrado

Los nuevos SvC producidos se emplearon para infectar células 4T1, Renca y EL4, tal como se describió en Materiales y Métodos. Debido a que se desconocían las condiciones óptimas, se ensayaron dos condiciones empleando 100 μ l (SvC sin diluir) y 50 μ l de volumen de SvC (SvC diluido a la mitad) en un volumen final de 100 μ l por fosa. Al día siguiente de la transducción se reemplazó el medio por medio fresco con antibiótico de selección y se mantuvieron las células en cultivo con antibiótico, siendo renovado cada dos días.

Se evaluó la fluorescencia de eGFP junto con la expresión de MICA en superficie y MICA intracitoplasmática por citometría de flujo. Se evaluaron solamente aquellas células que fueron resistentes a puromicina durante más de dos semanas. En simultáneo, también se analizó la línea celular sin marcar con el fin de realizar la comparación en el canal de FITC y así evaluar la fluorescencia en las células modificadas.

Células 4T1

Debido a que en este caso no se realizaron marcaciones con ZA, solamente se aplicaron los primeros dos pasos de la estrategia de *gating* mostrada en la figura 6 para evaluar la presencia de MICA y eGFP.

La marcación de superficie de células 4T1-MICA*001-SD no mostró señal para MICA ni para eGFP en ninguna condición ensayada (Figura 11).

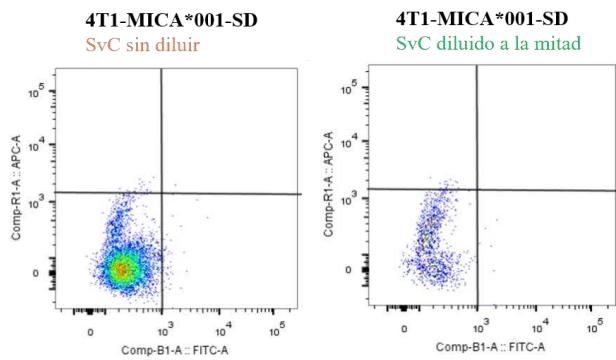


Figura 11. Análisis de la expresión de MICA en superficie y eGFP en células 4T1-MICA*001-SD generadas a partir de dos condiciones de infección ensayadas (naranja SvC sin diluir, verde SvC diluido a la mitad). La marcación se realizó con el AcMo anti-MICA-APC clon 159227.

Para 4T1-MICA*001-SO se estudió la presencia de MICA intracitoplasmática. En primer lugar, se observó un corrimiento de la señal de eGFP (en el canal para FITC) en la fluorescencia de células 4T1-MICA*001-SO (sin marca) en comparación con la autofluorescencia de la línea 4T1 (Figura 12). Sin embargo, no se detectó expresión de MICA, aunque se destacan las poblaciones positivas para la señal de eGFP en la marcación intracitoplasmática (Figura 13).

Cuando se analizó la presencia de sMICA en el sobrenadante de cultivo de 4T1-MICA*001-SO por ELISA y el inmunoensayo desarrollado en el laboratorio basado en FRET, tampoco se detectó a esta proteína (datos no mostrados).

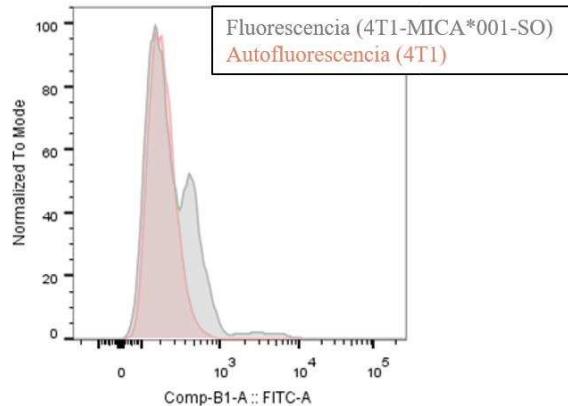


Figura 12. Autofluorescencia en marcación intracitoplasmática de la señal de eGFP en células 4T1-MICA*001-SO y 4T1. Se representó en rojo claro la autofluorescencia de la línea 4T1 y en gris se representó la fluorescencia sin ninguna marca para células 4T1-MICA*001-SO (*pool* de las dos condiciones ensayadas).

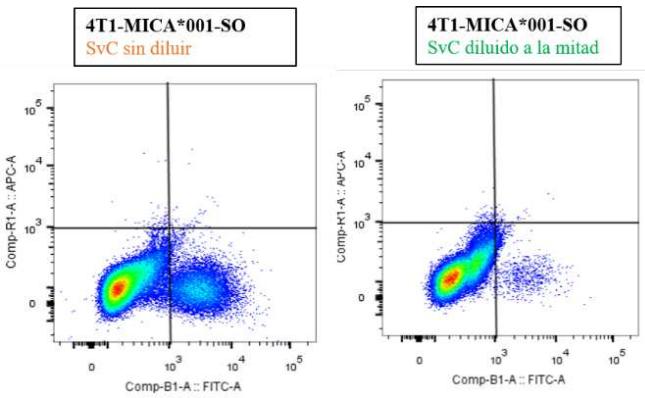


Figura 13. Análisis de la expresión de MICA y eGFP en marcación intracitoplasmática de células 4T1-MICA*001-SO generadas a partir de dos condiciones de infección ensayadas (naranja SvC sin diluir, verde SvC diluido a la mitad). La marcación se realizó con el AcMo anti-MICA-APC clon 159227.

Posteriormente a estos resultados las células 4T1 se contaminaron por lo que tuvieron que ser descartadas.

Células Renca

Tal como fue el caso con células 4T1, con células Renca tampoco se realizaron marcaciones con ZA, por lo que solamente se aplicaron los primeros dos pasos de la estrategia de *gating* mostrada en la figura 6 para evaluar la presencia de MICA y eGFP.

Se observó que no fue posible evaluar la expresión de eGFP por citometría de flujo en células Renca-MICA*001-SO debido a su baja fluorescencia en comparación con las células Renca, situación observada en ambas marcaciones (Figura 14), lo que podría deberse a un elevado porcentaje de muerte para la línea celular

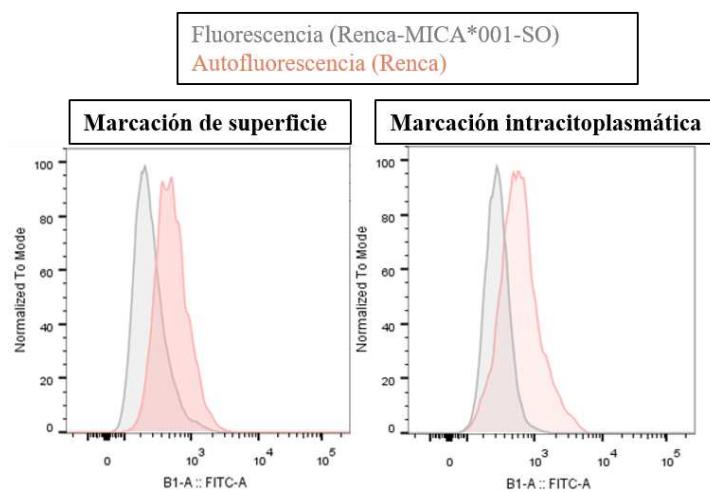


Figura 14. Autofluorescencia de la señal de eGFP de células Renca-MICA*001-SO y Renca Se representó en rojo claro la autofluorescencia de la línea Renca y en gris se representó la fluorescencia para células Renca-MICA*001-SO, sin marca. A diferencia de lo esperado, se detecta mayor autofluorescencia en el canal de FITC para Renca que para las células modificadas.

Cuando se evaluó la expresión de MICA en superficie (Figura 15) e intracitoplasmática con previo tratamiento con Brefeldina/Monensina (Figura 16) en células Renca-MICA*001-SO, no se observó señal (expresión de MICA). En el caso de la marcación de superficie el resultado esperado para esta línea celular es negativo. Cuando analizamos la presencia de sMICA en el sobrenadante de cultivo por ELISA y por el inmunoensayo basado en FRET empleando sobrenadantes del respectivo cultivo celular, tampoco observamos la presencia de MICA (datos no mostrados).

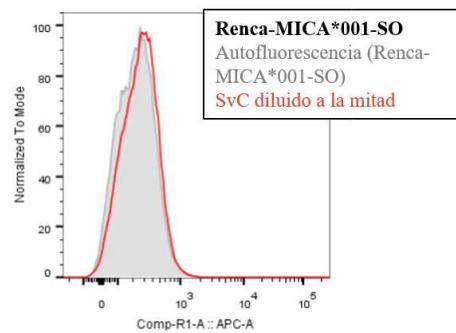


Figura 15. Análisis de la expresión de MICA en superficie de células Renca-MICA*001-SO generadas a partir Svc diluido a la mitad (rojo); en gris se representó la autofluorescencia de estas mismas células. Se utilizó el Ac anti MICA/B-APC, clon 6D4.

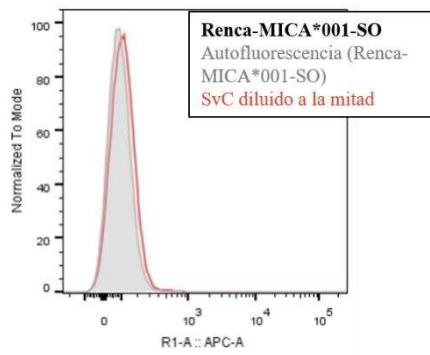


Figura 16. Análisis de la expresión de MICA intracitoplasmática de células Renca-MICA*001-SO generadas a partir Svc diluido a la mitad (rojo); en gris se representó la autofluorescencia de estas mismas células. Se utilizó el Ac anti MICA/B-APC, clon 6D4.

Las células modificadas Renca-MICA*001-WT y Renca-MICA*001-SD no crecieron en presencia del antibiótico de selección, para ninguna condición de infección ensayada.

Células EL4

Tal como se hizo con las líneas celulares infectadas Renca y 4T1, se analizó la expresión de MICA y de eGFP por citometría de flujo en las células EL4 modificadas, realizando también la marcación de viabilidad con ZA. Tanto para EL4-MICA*001-SO y EL4-MICA*001-SD no se detectó señal de MICA en superficie, así como tampoco eGFP. (Figura 17); para EL4-MICA*001-SO no encontrar señal positiva de MICA es lo esperado.

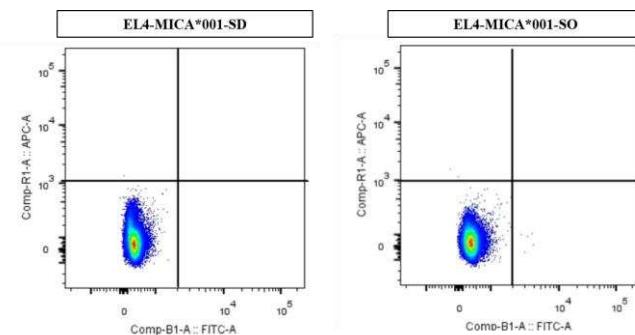


Figura 17. Análisis de la expresión de MICA en superficie y eGFP de células EL4 modificadas con SvC diluido a la mitad. Izquierda: células EL4-MICA*001-SD. Derecha: células EL4-MICA*001-SO. Se utilizó un AcMo anti-MICA/B-APC clon 6D4.

Por otro lado, se analizó la expresión de MICA intracitoplasmática en células EL4-MICA*001-SO y EL4-MICA*001-SD, con previo tratamiento de Brefeldina A/Monensina, evaluando también la expresión de eGFP. Se observó un corrimiento de la señal de MICA (Figura 18) y expresión de eGFP (Figura 19). Los sobrenadantes de las células EL4-MICA*001-SO fueron congelados para analizar la presencia de sMICA por ELISA y por el inmunoensayo basado en FRET.

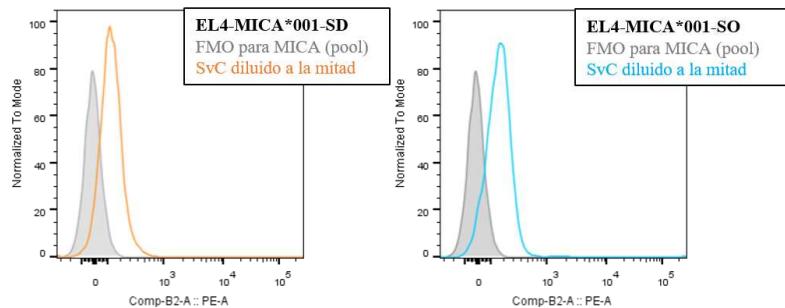


Figura 18. Análisis de la expresión de MICA intracitoplasmática de células EL4 modificadas con SvC diluido a la mitad. Izquierda: células EL4-MICA*001-SD. Derecha: células EL4-MICA*001-SO. Se utilizó un AcMo anti-MICA/B-PE, clon 6D4. En gris se representó el FMO, que corresponde a un pool de células EL4-MICA*001-SD y EL4-MICA*001-SO marcadas solo con ZA.

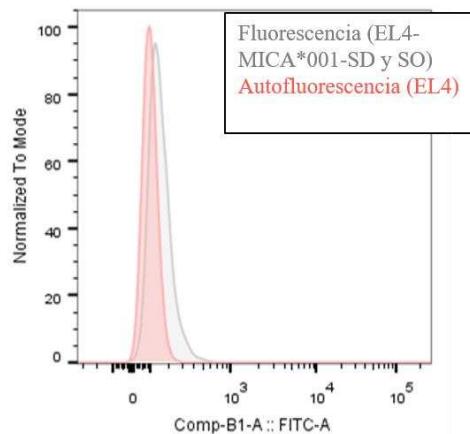


Figura 19. Autofluorescencia de la señal de eGFP de las células EL4-MICA*001-SD y EL4-MICA*001-SO. En gris se representa la fluorescencia de un *pool* de dichas células sin marcar, en rojo la autofluorescencia de la línea EL4.

Discusión y conclusiones

En el contexto de un proyecto de investigación translacional que se está desarrollando hace años en el laboratorio, resulta de relevancia dilucidar cuál es la contribución de la ADCC mediada por células NK y la ADCP mediadas por macrófagos vs la depuración de sMICA mediada por macrófagos al efecto terapéutico antitumoral del AcMo anti-MICA D7. Con este fin se propuso el objetivo de la presente Tesis, planteando la generación de líneas estables murinas que expresen una variante de MICA*001 que esté deshabilitada para hacer *shedding* (MICA*001-SD), y otra variante que sólo pueda ser secretada (MICA*001-SO). Estas líneas serán utilizadas para ensayos preclínicos que permitirán estudiar con precisión el efecto terapéutico *in vivo* del AcMo desarrollado en el laboratorio.

La utilización de partículas pseudo-lentivirales es una herramienta molecular ampliamente utilizada para producir líneas celulares estables en los laboratorios de investigación. El primer paso en esta tecnología es la producción de las partículas lentivirales a partir de células empaquetadoras, etapa que depende de la co-transfección simultánea de 4 plásmidos. Si al menos uno de los plásmidos no se encuentra en su conformación óptima, o si su integridad está comprometida, la

producción no será del todo eficiente y podrían obtenerse Svs de bajos títulos, o directamente fallar sin producir las partículas de interés.

En el caso del presente trabajo se cuenta con la ventaja que dos (MICA*001-SO y MICA*001-SD) de los tres plásmidos con los genes de interés codifican para eGFP, lo que conlleva la posibilidad de poder monitorear tanto el proceso de producción de lentivirus como la transducción posterior. Al visualizar eGFP en las células HEK293FT desde la primera transfección se asumieron dos condiciones: que la producción de partículas pseudo-lentivirales se estaba llevando a cabo correctamente, y que esa misma fluorescencia intensa íbamos a poder verla y utilizarla a modo de selección rápida con las células blanco. Para la primera, esa presunción resultó ser parcialmente correcta ya que se encontró como obstáculo inicial que los plásmidos accesorios no se encontraban en su conformación óptima. Luego, con Svs producidos a partir de nuevos lotes de estos plásmidos se obtuvieron resultados dispares: inicialmente no obtuvimos células resistentes a puromicina, pero posteriormente y luego de sucesivos intentos con SvC, sí se obtuvieron células resistentes al antibiótico. De esta forma se pudo descartar como paso problemático la transfección y producción de pseudo-lentivirus, ya que la resistencia indica indirectamente la presencia de éstos en el Sv.

Por otro lado, surgió otro inconveniente respecto a la segunda condición asumida. Para ninguna infección realizada se observó fluorescencia debida a eGFP al microscopio de fluorescencia en las células blanco. Por ello, y por lo menos durante los primeros días post-infección, la mejor forma de realizar el seguimiento de las células que incorporaron el gen de interés fue evaluar la resistencia al antibiótico de selección, junto a una citometría de flujo con previa fijación y permeabilización celular (protocolo de marcación intracitoplasmática). Esto se debe a que se pudo detectar la señal de eGFP sólo en estas condiciones, pero no cuando se realizaron marcaciones de superficie para detectar MICA.

Respecto a las técnicas empleadas para la detección de MICA, la citometría de flujo es altamente efectiva, y además rutinaria en nuestro laboratorio, para detectar a esta proteína tanto internamente como en superficie celular. Con esta técnica, sólo se evidenció la presencia de MICA intracitoplasmática en células EL4-MICA*001-SD y EL4-MICA*001-SO. Respecto a sMICA, no se detectó su presencia en ningún sobrenadante celular evaluado, aunque resta estudiar por el inmunoensayo basado en FRET y ELISA al sobrenadante de EL4-MICA*001-SO. Adicionalmente, considerando que se encontró MICA intracelular en células EL4-MICA*001-SD, es importante descartar su *shedding*, empleando los ensayos utilizados en la presente tesis, que detectan sMICA en sobrenadantes. Es destacable el hecho de haber detectado la presencia de MICA interna, pero no en superficie, para EL4-MICA*001-SD. En contraste, no haber obtenido

señales positivas ni para sMICA, MICA de superficie o intracitoplasmática en las líneas 4T1 y Renca puede deberse a múltiples motivos. Entre ellos podemos mencionar que haya un silenciamiento parcial del gen por el sitio de inserción, que existan mecanismos de regulación transcripcional y/o traduccional, y estos problemas se potencian por estar trabajando con células no clonadas. En las células resistentes a puromicina, y más aún en las positivas para eGFP es posible que haya una muy baja expresión de MICA que aún no se llega a detectar. Una posibilidad a considerar es realizar sucesivas selecciones de células presumiblemente MICA⁺ por *cell sorting* de las células eGFP positivas, para luego allí evaluar la expresión de MICA.

Es relevante mencionar, como puede verse en la Figura 2, que el gen codificante para eGFP se encuentra bajo un promotor distinto al de MICA, y, por ende, no es posible garantizar la presencia de MICA solamente evaluando eGFP, ni viceversa; aunque en principio siempre se esperan los dobles positivos. No obstante, resulta más complejo explicar por qué se detectó resistencia al antibiótico de selección sin encontrar señal de eGFP, cuando ambos genes (resistencia a puromicina y eGFP) están en el mismo *cassette* policistrónico. Por ello, es necesario realizar experimentos adicionales para responder a estas preguntas, de manera de contribuir con el desarrollo de un protocolo de producción y transducción lentiviral más eficiente que facilite tanto la generación de estas líneas estables como su selección y clonado, con el fin de conseguir clones con alta expresión de MICA*001-SD y MICA*001-SO.

Asimismo, se explorará la presencia de MICA en células EL4-MICA*001-SD y EL4-MICA*001-SO por técnicas de biología molecular, tales como la PCR y/o la PCR en tiempo real, e inmunofluorescencia mediante la utilización de *chamber slides*.

Finalmente, a pesar de afrontar diversos contratiempos, en la presente Tesis de Licenciatura pudieron generarse dos líneas positivas, EL4-MICA*001-SO y EL4-MICA*001-SD, aunque se deberán validar estos resultados. Se realizaron sucesivos intentos para las otras dos líneas propuestas, 4T1 y Renca, pero sin éxito. No obstante, se adquirieron amplios conocimientos experimentales y teóricos a lo largo del trabajo realizado, además de los aportes realizados al grupo de trabajo.

Referencias bibliográficas

- Ashiru, O., López-Cobo, S., Fernández-Messina, L., Pontes-Quero, S., Pandolfi, R., Reyburn, H.T., Valés-Gómez, M., 2013. A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA*008. *Biochemical Journal* 454, 295–302. <https://doi.org/10.1042/BJ20130194>
- Barry, K.C., Hsu, J., Broz, M.L., Cueto, F.J., Binnewies, M., Combes, A.J., Nelson, A.E., Loo, K., Kumar, R., Rosenblum, M.D., Alvarado, M.D., Wolf, D.M., Bogunovic, D., Bhardwaj, N., Daud, A.I., Ha, P.K., Ryan, W.R., Pollack, J.L., Samad, B., Asthana, S., Chan, V., Krummel, M.F., 2018. A natural killer–dendritic cell axis defines checkpoint therapy–responsive tumor microenvironments. *Nat Med* 24, 1178–1191. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0085-8>
- Björkström, N.K., Strunz, B., Ljunggren, H.-G., 2022. Natural killer cells in antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 22, 112–123. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00558-3>
- Böttcher, J.P., Bonavita, E., Chakravarty, P., Blees, H., Cabeza-Cabrerozo, M., Sammicheli, S., Rogers, N.C., Sahai, E., Zelenay, S., Reis E Sousa, C., 2018. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell* 172, 1022-1037.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.004>
- Cantoni, C., Wurzer, H., Thomas, C., Vitale, M., 2020. Escape of tumor cells from the NK cell cytotoxic activity. *Journal of Leukocyte Biology* 108, 1339–1360. <https://doi.org/10.1002/JLB.2MR0820-652R>
- Champiat, S., Ferrara, R., Massard, C., Besse, B., Marabelle, A., Soria, J.-C., Ferté, C., 2018. Hyperprogressive disease: recognizing a novel pattern to improve patient management. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 748–762. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0111-2>
- Cursons, J., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Foroutan, M., Anderson, A., Hollande, F., Hediye-Zadeh, S., Behren, A., Huntington, N.D., Davis, M.J., 2019. A Gene Signature Predicting Natural Killer Cell Infiltration and Improved Survival in Melanoma Patients. *Cancer Immunology Research* 7, 1162–1174. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0500>
- Du, C., Bevers, J., Cook, R., Lombana, T.N., Rajasekaran, K., Matsumoto, M., Spiess, C., Kim, J.M., Ye, Z., 2019. MICA immune complex formed with alpha 3 domain-specific antibody activates human NK cells in a Fc-dependent manner. *j. immunotherapy cancer* 7, 207. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0687-9>
- Fang, L., Gong, J., Wang, Y., Liu, R., Li, Z., Wang, Z., Zhang, Y., Zhang, C., Song, C., Yang, A., Ting, J.P.-Y., Jin, B., Chen, L., 2014. MICA/B expression is inhibited by unfolded protein

- response and associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 33, 76. <https://doi.org/10.1186/s13046-014-0076-7>
- Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W.A., Moretta, L., Münz, C., 2004a. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 16606–16611. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407522101>
- Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S.-L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W.A., Moretta, A., Münz, C., 2004b. The Abundant NK Cells in Human Secondary Lymphoid Tissues Require Activation to Express Killer Cell Ig-Like Receptors and Become Cytolytic. *The Journal of Immunology* 172, 1455–1462. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.3.1455>
- Ferrari De Andrade, L., Tay, R.E., Pan, D., Luoma, A.M., Ito, Y., Badrinath, S., Tsoucas, D., Franz, B., May, K.F., Harvey, C.J., Kobold, S., Pyrdol, J.W., Yoon, C., Yuan, G.-C., Hodi, F.S., Dranoff, G., Wucherpfennig, K.W., 2018. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell–driven tumor immunity. *Science* 359, 1537–1542. <https://doi.org/10.1126/science.aao0505>
- Fuertes, M.B., 2003. Anticuerpos monoclonales aplicados al estudio de MICA y su contribución a la citotoxicidad de melanomas mediada por células NK. Universidad de Buenos Aires.
- Ghadially, H., Brown, L., Lloyd, C., Lewis, L., Lewis, A., Dillon, J., Sainson, R., Jovanovic, J., Tigue, N.J., Bannister, D., Bamber, L., Valge-Archer, V., Wilkinson, R.W., 2017. MHC class I chain-related protein A and B (MICA and MICB) are predominantly expressed intracellularly in tumour and normal tissue. *Br J Cancer* 116, 1208–1217. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.79>
- Gil, M., Kim, K.E., 2019. Interleukin-18 Is a Prognostic Biomarker Correlated with CD8+ T Cell and Natural Killer Cell Infiltration in Skin Cutaneous Melanoma. *JCM* 8, 1993. <https://doi.org/10.3390/jcm8111993>
- Groh, V., Rhinehart, R., Sechrist, H., Bauer, S., Grabstein, K.H., Spies, T., 1999. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6879–6884. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6879>
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., Spies, T., 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734–738. <https://doi.org/10.1038/nature01112>
- Guerra, N., Tan, Y.X., Joncker, N.T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N.R., Raulet, D.H., 2008. NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor

- Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy. *Immunity* 28, 571–580. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.016>
- Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., Nakachi, K., 2000. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *The Lancet* 356, 1795–1799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03231-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03231-1)
- Jinushi, M., Hodi, F.S., Dranoff, G., 2006. Therapy-induced antibodies to MHC class I chain-related protein A antagonize immune suppression and stimulate antitumor cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 9190–9195. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603503103>
- Kaiser, B.K., Yim, D., Chow, I.-T., Gonzalez, S., Dai, Z., Mann, H.H., Strong, R.K., Groh, V., Spies, T., 2007. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* 447, 482–486. <https://doi.org/10.1038/nature05768>
- Kalbasi, A., Ribas, A., 2020. Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade. *Nat Rev Immunol* 20, 25–39. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0218-4>
- Klemen, N.D., Wang, M., Rubinstein, J.C., Olino, K., Clune, J., Ariyan, S., Cha, C., Weiss, S.A., Kluger, H.M., Sznol, M., 2020. Survival after checkpoint inhibitors for metastatic acral, mucosal and uveal melanoma. *J Immunother Cancer* 8, e000341. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000341>
- Lee, H., Quek, C., Silva, I., Tasker, A., Batten, M., Rizos, H., Lim, S.Y., Nur Gide, T., Shang, P., Attrill, G.H., Madore, J., Edwards, J., Carlino, M.S., Gumiński, A., Saw, R.P.M., Thompson, J.F., Ferguson, P.M., Palendira, U., Menzies, A.M., Long, G.V., Scolyer, R.A., Wilmott, J.S., 2019. Integrated molecular and immunophenotypic analysis of NK cells in anti-PD-1 treated metastatic melanoma patients. *OncoImmunology* 8, e1537581. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1537581>
- Li, B., Jiang, Y., Li, G., Fisher, G.A., Li, R., 2020. Natural killer cell and stroma abundance are independently prognostic and predict gastric cancer chemotherapy benefit. *JCI Insight* 5, e136570. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.136570>
- Madjd, Z., Spendlove, I., Moss, R., Bevin, S., Pinder, S.E., Watson, N.F.S., Ellis, I., Durrant, L.G., 2007. Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma. *Cancer Immun* 7, 17.
- Mailliard, R.B., Alber, S.M., Shen, H., Watkins, S.C., Kirkwood, J.M., Herberman, R.B., Kalinski, P., 2005. IL-18-induced CD83 + CCR7 + NK helper cells. *The Journal of Experimental Medicine* 202, 941–953. <https://doi.org/10.1084/jem.20050128>

- Martín-Fontechá, A., Thomsen, L.L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for TH1 priming. *Nat Immunol* 5, 1260–1265. <https://doi.org/10.1038/ni1138>
- Mellergaard, M., Skovbakke, S.L., Schneider, C.L., Lauridsen, F., Andresen, L., Jensen, H., Skov, S., 2014. N-Glycosylation of Asparagine 8 Regulates Surface Expression of Major Histocompatibility Complex Class I Chain-related Protein A (MICA) Alleles Dependent on Threonine 24. *Journal of Biological Chemistry* 289, 20078–20091. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.573238>
- Molinero, L.L., Fuertes, M.B., Girart, M.V., Fainboim, L., Rabinovich, G.A., Costas, M.A., Zwirner, N.W., 2004. NF- κ B Regulates Expression of the MHC Class I-Related Chain A Gene in Activated T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 173, 5583–5590. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.9.5583>
- Mujal, A.M., Delconte, R.B., Sun, J.C., 2021. Natural Killer Cells: From Innate to Adaptive Features. *Annu. Rev. Immunol.* 39, 417–447. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101819-074948>
- Powderly, J.D., Gutierrez, M., Wang, J.S., Hamilton, E.P., Sharma, M., Spira, A.I., Millward, M., Shackleton, M.J., Frentzas, S., Koczywas, M., Mehta, N., Christensen, A.M., Shapiro, I., Whalen, K., Michaelson, J., Baeuerle, P., Janik, J.E., Rasco, D.W., 2022. A phase 1 dose-escalation study to investigate the safety, efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamic activity of CLN-619 (anti-MICA/MICB antibody) alone and in combination with pembrolizumab in patients with advanced solid tumors. *JCO* 40, TPS2688–TPS2688. https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.TPS2688
- Regge, M.V., 2024. Evaluación preclínica de un anticuerpo monoclonal anti-MICA como agente terapéutico contra tumores. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Salih, H.R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S.Z., Kanz, L., Rammensee, H.-G., Steinle, A., 2003. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 102, 1389–1396. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-01-0019>
- Salih, H.R., Rammensee, H.-G., Steinle, A., 2002. Cutting Edge: Down-Regulation of MICA on Human Tumors by Proteolytic Shedding. *The Journal of Immunology* 169, 4098–4102. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4098>
- Schrambach, S., Ardizzone, M., Leymarie, V., Sibilia, J., Bahram, S., 2007. In Vivo Expression Pattern of MICA and MICB and Its Relevance to Auto-Immunity and Cancer. *PLoS ONE* 2, e518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000518>

- Secchiari, F., Nuñez, S.Y., Sierra, J.M., Ziblat, A., Regge, M.V., Raffo Iraolagoitia, X.L., Rovegno, A., Ameri, C., Secin, F.P., Richards, N., Ríos Pita, H., Vitagliano, G., Rico, L., Mieaggi, M., Frascheri, F., Bonanno, N., Blas, L., Trotta, A., Friedrich, A.D., Fuertes, M.B., Domaica, C.I., Zwirner, N.W., 2022. The MICA-NKG2D axis in clear cell renal cell carcinoma bolsters MICA as target in immuno-oncology. *OncoImmunology* 11, 2104991. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2022.2104991>
- Smyth, M.J., Swann, J., Cretney, E., Zerafa, N., Yokoyama, W.M., Hayakawa, Y., 2005. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *The Journal of Experimental Medicine* 202, 583–588. <https://doi.org/10.1084/jem.20050994>
- Stephens, H.A.F., 2001. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends in Immunology* 22, 378–385. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)01960-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)01960-3)
- Torres, N., Regge, M.V., Secchiari, F., Friedrich, A.D., Spallanzani, R.G., Raffo Iraolagoitia, X.L., Núñez, S.Y., Sierra, J.M., Ziblat, A., Santilli, M.C., Gilio, N., Almada, E., Lauche, C., Pardo, R., Domaica, C.I., Fuertes, M.B., Madauss, K.P., Hance, K.W., Gloger, I.S., Zylberman, V., Goldbaum, F.A., Zwirner, N.W., 2020. Restoration of antitumor immunity through anti-MICA antibodies elicited with a chimeric protein. *J Immunother Cancer* 8, e000233. <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000233>
- Waldhauer, I., Goehlsdorf, D., Gieseke, F., Weinschenk, T., Wittenbrink, M., Ludwig, A., Stevanovic, S., Rammensee, H.-G., Steinle, A., 2008. Tumor-Associated MICA Is Shed by ADAM Proteases. *Cancer Research* 68, 6368–6376. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6768>
- Wang, J.S., Gutierrez, M., Rasco, D.W., Melero Bermejo, I., Powderly, J.D., Hamilton, E.P., Millward, M., Arance, A.M., Stec, R., Moreno, V., Sharma, M., Lugowska, I.A., Shackleton, M.J., Frentzas, S., Janik, J.E., Liu, T., Shapiro, I., Whalen, K., Jones, J.A., Spira, A.I., 2023. A phase 1 dose-escalation study to investigate the safety, efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamic activity of cln-619 (Anti-MICA/B antibody) alone and in combination with pembrolizumab in patients with advanced solid tumors. *JCO* 41, 2532–2532. https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.2532
- Wang, W., 2015. NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00368>
- Wang, X., Lundgren, A.D., Singh, P., Goodlett, D.R., Plymate, S.R., Wu, J.D., 2009. A six-amino acid motif in the α3 domain of MICA is the cancer therapeutic target to inhibit shedding.

Biochemical and Biophysical Research Communications 387, 476–481.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.062>

- Watson, N.F.S., Spendlove, I., Madjd, Z., McGilvray, R., Green, A.R., Ellis, I.O., Scholefield, J.H., Durrant, L.G., 2006. Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* 118, 1445–1452. <https://doi.org/10.1002/ijc.21510>
- Wong, J.L., Berk, E., Edwards, R.P., Kalinski, P., 2013. IL-18-Primed Helper NK Cells Collaborate with Dendritic Cells to Promote Recruitment of Effector CD8+ T Cells to the Tumor Microenvironment. *Cancer Research* 73, 4653–4662. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4366>
- Zhang, J., Basher, F., Wu, J.D., 2015. NKG2D Ligands in Tumor Immunity: Two Sides of a Coin. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00097>
- Zhang, J., Liu, D., Li, G., Staveley-O'Carroll, K.F., Graff, J.N., Li, Z., Wu, J.D., 2017. Antibody-mediated neutralization of soluble MIC significantly enhances CTLA4 blockade therapy. *Sci. Adv.* 3, e1602133. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602133>
- Zwirner, N.W., Marcos, C.Y., Mirbaha, F., Zou, Y., Stastny, P., 2000. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Human Immunology* 61, 917–924. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(00\)00162-2](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(00)00162-2)
- Zwirner, N.W., Ziblat, A., 2017. Regulation of NK Cell Activation and Effector Functions by the IL-12 Family of Cytokines: The Case of IL-27. *Front. Immunol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00025>