



**universidad  
de león**



**Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA  
LA IDENTIFICACIÓN DEL LIGANDO  
DEL RECEPTOR CO-INHIBIDOR PD-  
1H (PROGRAMMED DEATH 1  
HOLOGOUS)**

**EXPERIMENTAL STRATEGY FOR THE  
IDENTIFICATION OF THE PD-1H  
(PROGRAMMED DEATH 1 HOLOGOUS)  
CO-INHIBITORY RECEPTOR LIGAND**

**Autor:** Víctor Salido Subiñas

**Tutores:** D. José Ignacio Rodríguez Barbosa y  
Dña. María Luisa del Río González

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Julio, 2023**

## Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Introducción al sistema inmunitario.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Activación e inicio de la respuesta inmunitaria .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Propiedades y características del receptor PD-1H.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Principales funciones de PD-1H. Su doble papel como receptor y ligando .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5. Ligandos propuestos para el receptor PD-1H .....</b>	<b>9</b>
<b>1.6. Implicaciones del PD-1H en la inmunoterapia contra el cáncer .....</b>	<b>10</b>
<b>1.7. Estrategia para la identificación del ligando de PD-1H en la especie murina. El sistema BioID2 .....</b>	<b>12</b>
<b>2. Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Hipótesis de trabajo .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. Objetivos .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Líneas celulares, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3. Diseño, preparación de la construcción genética y clonación en el vector retroviral pBABE.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Clonación en pJET (vector de paso).....</b>	<b>16</b>
<b>3.5. Clonación en el vector retroviral pIB-276.....</b>	<b>16</b>
<b>3.6. Producción de la construcción genética recombinante PD-1H/BioID2 .....</b>	<b>17</b>
<b>3.7. Infección de los macrófagos RAW 267 .....</b>	<b>18</b>
<b>3.8. Análisis de estabilidad de la expresión.....</b>	<b>18</b>
<b>3.9. Preparación de lisados celulares .....</b>	<b>18</b>
<b>3.10. Detección y purificación de moléculas biotiniladas.....</b>	<b>19</b>
<b>3.11. Aislamiento y detección de moléculas biotiniladas .....</b>	<b>19</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Obtención del vector viral pIB 437.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2. Infección y detección de la expresión de la proteína de fusión recombinante PD-1H/BioID2 .....</b>	<b>21</b>
<b>4.3. PCR de DNA genómico de la línea celular de macrófagos murinos RAW 267 .....</b>	<b>23</b>
<b>4.4. Purificación e identificación de proteínas biotiniladas.....</b>	<b>24</b>
<b>5. Discusión .....</b>	<b>26</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>28</b>
<b>7. Referencias.....</b>	<b>28</b>
<b>Anexo I. Esquemas del funcionamiento de las técnicas de SOEing PCR y Sistema Gateway.....</b>	<b>30</b>
<b>Anexo II. Condiciones de las diferentes reacciones realizadas durante los experimentos y protocolos de preparación de los geles de poliacrilamida.....</b>	<b>31</b>
<b>Anexo III. Protocolo de extracción de ADN.....</b>	<b>33</b>

## Resumen

El Programmed Death-1 Homolog (PD-1H) es una molécula perteneciente a la familia de CD28/B7 de receptores de membrana. Su función es la de inhibir la activación linfocitaria tras la interacción con su ligando y debido a esto, está considerado como una diana terapéutica muy prometedora en inmunoterapia del cáncer. Sin embargo, en la actualidad no se conoce con seguridad cual es el ligando de este receptor a pesar de varios estudios que han logrado identificar interacciones de PD-1H con otras moléculas. En este trabajo se describe la puesta a punto de un método experimental para la expresión de la proteína recombinante de fusión PD-1H/BioID2. Concretamente, se ha generado una construcción genética recombinante de una fusión entre el receptor celular PD-1H y la biotín ligasa BioID2, capaz de marcar proteínas con biotina por proximidad. Utilizando esta construcción, se modificaron genéticamente células con el objetivo de aislar posteriormente sus proteínas y purificar aquellas marcadas con biotina. Asimismo, se han preparado extractos de lisados celulares a partir de células transducidas que expresan dicha proteína recombinante de fusión para identificar los posibles ligandos que se hayan biotinilado de PD-1H.

**Palabras clave:** BioID2, biotinilación, co-inhibición, ligando, PD-1H, purificación

## Abstract

Programmed Death-1 Homolog (PD-1H) is a molecule belonging to the CD28/B7 family of membrane receptors. Its function is to inhibit lymphocyte activation upon interaction with its ligand and because of that, it is considered a very promising therapeutic target in cancer immunotherapy. However, nowadays, the ligand of this receptor is not known with certainty despite the fact that several studies have identified interactions of PD-1H with other molecules. This work describes the development of an experimental method for the expression of the recombinant PD-1H/BioID2 fusion protein. Specifically, a recombinant genetic construct of a fusion between the cellular PD-1H receptor and the biotin ligase BioID2, capable of tagging biotin-binding proteins by proximity, has been generated. Using this genetic construct, cells were genetically modified in order to subsequently isolate biotin-tagged proteins. Cell lysate extracts have also been prepared from transduced cells expressing this recombinant fusion protein to identify possible PD-1H biotinylated ligands.

**Keywords:** BioID2, biotinylation, co-inhibition, ligand, PD-1H, purification

## **Listado de abreviaturas**

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- AP:** Purificación por Afinidad
- APC:** Célula Presentadora de Antígenos
- APEX:** Ascorbato Peroxidasa
- CTLA-4:** Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
- DAMP:** Patrón Moleculares Asociados a Daños
- FCS:** Suero Fetal Bobino
- GFP:** Proteína Verde Fluorescente
- GVHD:** Graft Versus Host Disease
- ICI:** Inhibidores de Puntos de control Inmunitarios
- IgV:** Dominio Variable de inmunoglobulina
- LB:** Luria y Bertani
- MDSC:** Myeloid-Derived Suppressor Cells
- MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad
- NCR:** Puntos de control Reguladores Negativos
- PAMP:** Patrón Moleculares Asociados a Patógenos
- PCA:** Ensayos de Complementación de Fragmentos proteicos
- PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PD-1:** Programmed Death-1
- PD-L1:** Programmed Death-Ligand 1
- PD-1H:** Programmed Death-1 Homolog
- TB:** Terrific Broth
- TCR:** Receptor de Células T
- TLR:** Receptor Toll-Like
- TME:** Microambiente Tumoral
- VISTA:** V-domain Ig Suppressor of T cell Activation
- VSIG-3:** V-Set and immunoglobulin domain containing 3

## **1. Introducción**

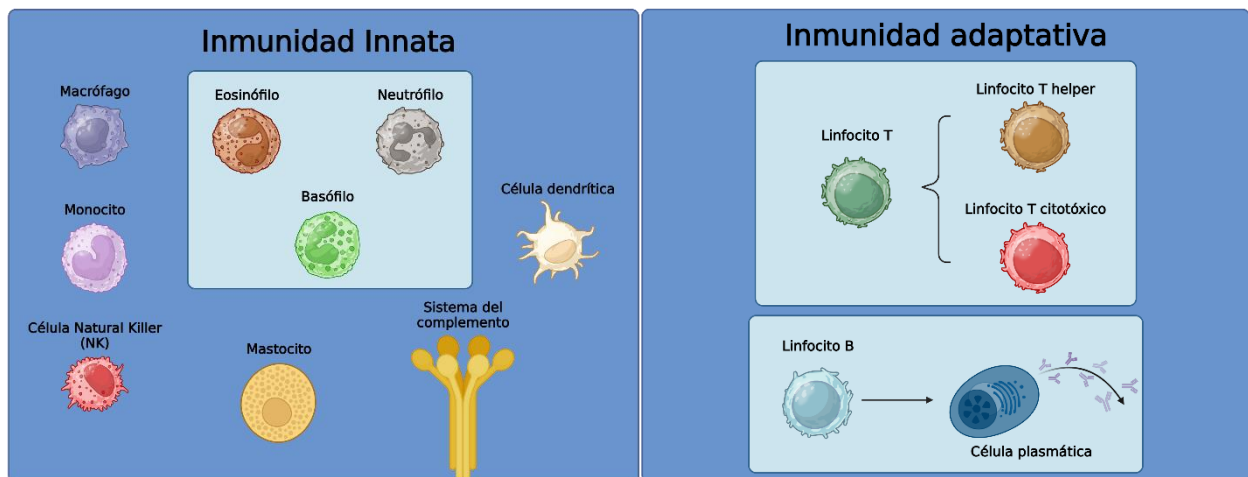
### **1.1. Introducción al sistema inmunitario**

El sistema inmunitario es una compleja red interactiva formada por distintos órganos y células, además de moléculas como citoquinas y factores humorales. Es el encargado de la defensa del organismo ante el ataque de patógenos externos y de amenazas internas (enfermedades autoinmunes, por ejemplo). A su vez, este sistema se divide en dos subsistemas, la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, que presentan diferencias en cuanto a sus funciones, pero que están íntimamente relacionados (Parkin y Cohen, 2001).

Por su parte, la inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo y se hace cargo de la protección en los primeros instantes tras la aparición de una nueva amenaza, mediante la detección rápida y eliminación de los invasores (Bonilla y Oettgen, 2010). La inmunidad innata está formada por varios tipos celulares, estructuras (las barreras) y factores humorales como el sistema del complemento. Otra característica de la inmunidad innata es la relativa falta de especificidad en su acción, es decir, la inmunidad innata responde de la misma forma frente a las diferentes amenazas. (Parkin y Cohen, 2001). A pesar de esto, el sistema inmunitario innato sigue teniendo la capacidad de discernir entre “amigo o enemigo”, aunque esta habilidad es limitada (Bonilla y Oettgen, 2010). El mecanismo que controla esta actividad se basa en el reconocimiento de patrones moleculares que se encuentran presentes en los patógenos y otras amenazas relacionadas con daños celulares (Parkin y Cohen, 2001). De esta forma, ante esa señal de peligro externo o interno, se encienden las alarmas y se inician los protocolos de defensa por parte de la inmunidad innata, que sirven de puente para el inicio de la inmunidad adaptativa.

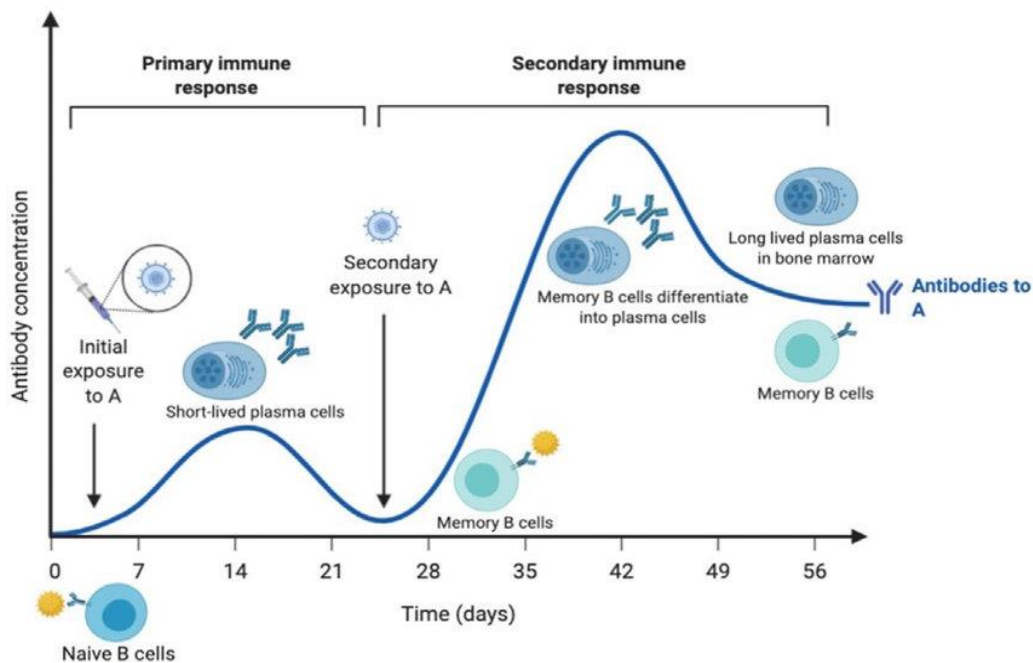
El otro componente del sistema inmunitario es la inmunidad adaptativa. Es característica de los animales superiores y está compuesta por los linfocitos T y B, además de las citoquinas producidas por determinados tipos celulares. La función de esta rama del sistema inmunitario es la elaboración de respuestas específicas frente a las amenazas detectadas. Para ello, los linfocitos T y B están dotados de receptores celulares capaces de reconocer un único antígeno, es decir, cada célula B y T es específica o tiene la capacidad de detectar con su receptor un antígeno determinado (Parkin y Cohen, 2001). Esto se consigue mediante un fenómeno conocido como recombinación somática, que consiste en una reorganización de los segmentos génicos de ADN que codifican para las distintas partes de los receptores de estas células

(Bonilla y Oettgen, 2010). A causa de esto, la respuesta inmunitaria adaptativa requiere de varios días o incluso semanas para elaborarse de manera efectiva (Parkin y Cohen, 2001).



**Figura 1.** Esquema de los diferentes componentes de la inmunidad innata (izquierda) y adaptativa (derecha). Imagen realizada con Biorender

Una diferencia clave entre la inmunidad innata y adaptativa es que esta última presenta “memoria”, lo que quiere decir que, una vez superada la infección, parte de las células T y B generadas persisten en el organismo y son capaces de llevar a cabo una respuesta específica rápida y más eficaz en caso de producirse una nueva entrada del patógeno (Bonilla y Oettgen, 2010). Sin embargo, en los últimos años han aparecido estudios que sugieren que la inmunidad innata también presenta cierto grado de memoria inmunológica (Sherwood *et al.*, 2022). Las células mieloides y linfoides innatas serían capaces de retener cierto grado de memoria y de desarrollar una respuesta inmunitaria más potente frente al regreso de la amenaza. Este fenómeno es denominado memoria inmune innata o inmunidad entrenada (Sherwood *et al.*, 2022).



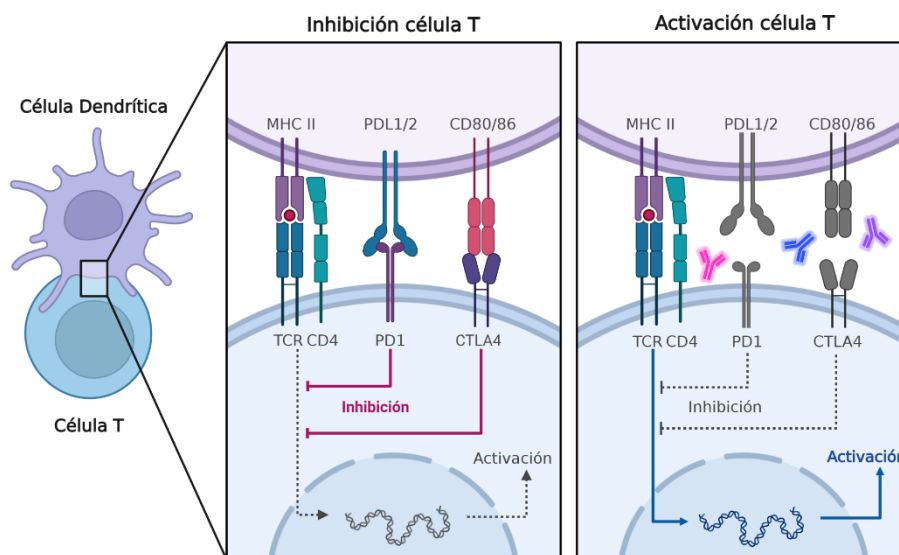
**Figura 2.** Evolución de la respuesta inmunitaria (primaria y secundaria) contra un antígeno específico con el tiempo. Imagen tomada de (Mahalingam *et al.*, 2021)

## 1.2. Activación e inicio de la respuesta inmunitaria

El comienzo de la respuesta inmunitaria en el organismo requiere de dos componentes principales, las Células Presentadoras de Antígenos (APC) y los linfocitos T. Tras el reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) o a Daños (DAMPs) por parte de los Receptores Toll-Like (TLRs) localizados en diferentes tipos celulares pertenecientes a la inmunidad innata, comienza la presentación antigénica en las APC. Estas células se encargan de muestrear los antígenos detectados y prepararlos para su reconocimiento por los Receptores de las Células T (TCRs). Para ello, los antígenos son presentados en forma de pequeños péptidos acoplados a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) presentes en la superficie de las APCs.

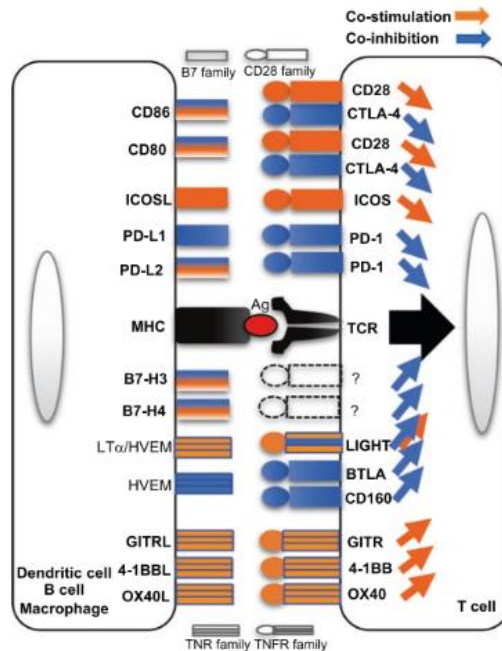
Existen dos tipos de MHC, los de clase I y los de clase II, que interactúan con los linfocitos T CD4 y CD8, respectivamente. El primer paso en la activación de las células T es el reconocimiento de los péptidos presentados en el contexto del MHC por parte del TCR, la llamada señal 1. En este punto, la interacción principal MHC-TCR es acompañada por moléculas de CD4/CD8, que estabilizan esta interacción mediante su unión a regiones no polimórficas de los MHCs, tanto de clase I como de clase II (Bonilla y Oettgen, 2010). Sin embargo, esto no es suficiente para provocar la activación de los linfocitos T.

Posteriormente, entran en juego otros mecanismos, las señales co-estimuladoras o co-inhibidoras (señal 2) y la señal de proliferación (señal 3). De estas, resulta especialmente interesante, para el caso planteado, la señal 2, responsable de la co-estimulación de los linfocitos T. El fenómeno de co-estimulación está controlado principalmente por los receptores CD80/86 presentes en las APCs y CD28 localizado en linfocitos T. Por su parte, la co-inhibición está regulada generalmente por los receptores CTLA-4 y PD-1 de las células T. Es importante destacar que, a parte de los aquí mencionados, existe una gran cantidad de receptores tanto co-estimuladores como co-inhibidores que actúan en armonía y complementariamente durante el proceso de diferenciación de las células T y de esta forma incrementan la respuesta inmunológica frente a un determinado antígeno (Azuma y Yagita, 2019).



**Figura 3.** Esquema del papel de los receptores celulares co-inhibidores durante la actuación de los linfocitos T. En el panel de la izquierda se muestra cómo la interacción de las diferentes moléculas co-inhibidoras (PD-1 y CTLA-4) con su ligando produce la inhibición de la activación de la célula T. En el panel de la derecha se muestra cómo se podría evitar este fenómeno de co-inhibición mediante el bloqueo (en la figura esto se ilustra con anticuerpos) de las vías de señalización mediadas por este tipo de receptores. Realizado en Biorender

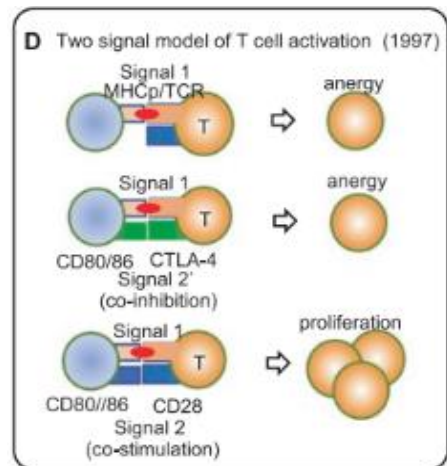




**Figura 4.** Esquema de los diferentes receptores de la superficie celular de una APC y un linfocito T. En naranja se indican las moléculas co-estimuladoras y en azul las co-inhedoras. Imagen tomada de (Azuma y Yagita, 2019)

Teniendo todo esto en cuenta, de la interacción entre una APC y un linfocito T, pueden derivarse 3 posibilidades (Azuma y Yagita, 2019):

- Anergia por ausencia de señal 2: el TCR reconoce el antígeno presentado en el MHC, pero debido a la ausencia de señales co-estimuladoras el linfocito permanece en estado de incapacidad funcional.
- Anergia por co-inhibición: el TCR vuelve a ser capaz de reconocer el antígeno en el contexto del MHC, pero a causa de la producción de señales de co-inhibición (interacción con CTLA-4 por ejemplo) la célula no se activa.
- Activación y proliferación: además de reconocerse el antígeno, se producen señales co-estimuladoras productivas, por lo que el linfocito se activa, comienza a dividirse y se diferencia a célula T efectora.



**Figura 5.** Esquema de las diferentes posibilidades de activación de un linfocito T en función de las señales presentes. Imagen tomada de (Azuma y Yagita, 2019)

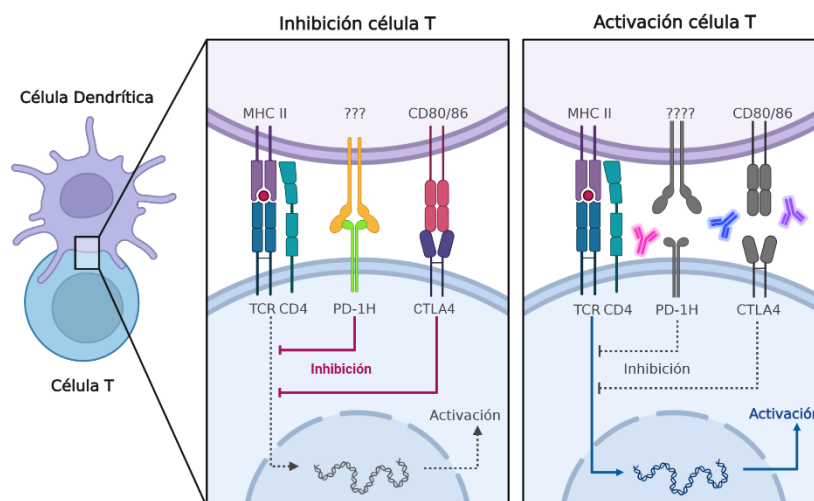
En resumen, la activación linfocitaria y el curso de la diferenciación hacia célula efectora, en cuanto a la señal 2, depende del balance establecido entre la cantidad de señales estimuladoras e inhibitoras recibidas.

### 1.3. Propiedades y características del receptor PD-1H

De todo el conjunto de receptores co-inhibidores y co-estimuladores que participan en la activación de los linfocitos T, este trabajo se centra en uno de ellos, el receptor Homólogo de Muerte Programada 1 o en inglés “Programmed Death-1 Homolog (PD-1H)”. El PD-1H, también denominado, en inglés, “V-domain Ig Suppressor of T cell Activation (VISTA)” es una molécula perteneciente a la familia de CD28/B7 de receptores de membrana, al grupo de los Inhibidores de Puntos de control Inmunitarios (ICI) y a los Puntos de control Reguladores Negativos (NCR). Presenta una serie de características tanto estructurales como funcionales, que lo hacen especialmente atractivo para tratamientos de inmunoterapia contra el cáncer (Slater *et al.*, 2020).

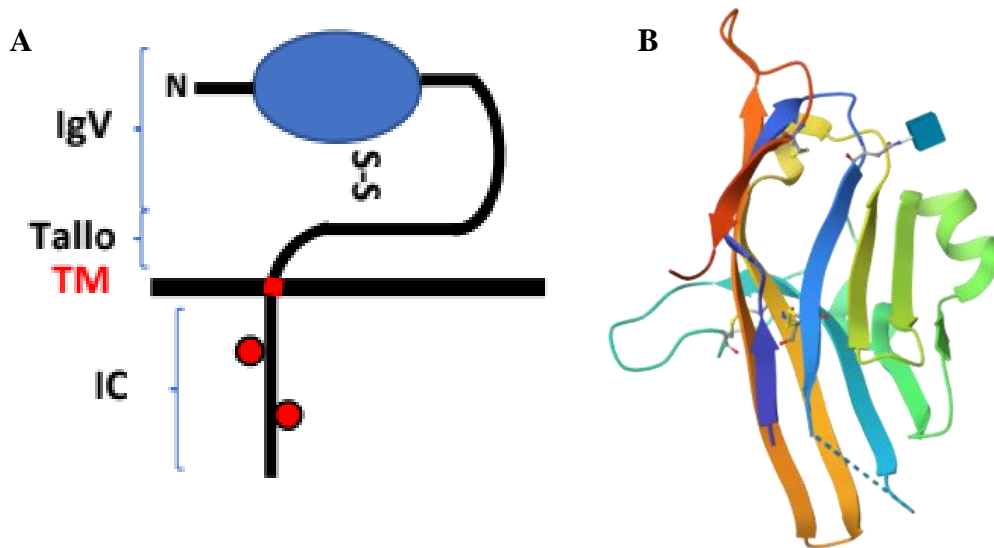
Existen evidencias indirectas recogidas de experimentos *in vivo* de modelos animales de enfermedades autoinflamatorias y cáncer que sugieren el papel co-inhibidor de la interacción PD-1H con sus ligandos. Sin embargo, el mecanismo molecular de acción de este receptor y su estructura no son muy conocidos (Slater *et al.*, 2020).

Este receptor se expresa en la mayoría de las células hematopoyéticas, tanto en el linaje mieloide como en el linaje linfoide, con la excepción de los linfocitos B. (Liu *et al.*, 2018). Sin embargo, su expresión se encuentra incrementada en las llamadas “Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs)” y en los linfocitos T CD4, lo que las convierten en dianas de elección para el desarrollo de tratamientos contra diferentes patologías (Mortezaee *et al.*, 2022).



**Figura 6.** Esquema del funcionamiento de PD-1H como receptor co-inhibidor durante la activación. En el panel de la izquierda se muestra como en caso de que se produzca la interacción de PD-1H con su ligando, se produce una inhibición del proceso de activación linfocitaria, similar a la señal producida al interaccionar PD-1 con PD-L1 o CD80/86 con CTLA-4. En el panel de la derecha se muestra cómo se podría evitar este fenómeno de co-inhibición mediante el bloqueo de las vías de señalización mediadas por este tipo de receptores. Realizado en Biorender

El PD-1H es una proteína de transmembrana de tipo I compuesta de aproximadamente 300 aminoácidos, distribuidos en tres dominios principales: extracelular, transmembrana y citoplasmático. A su vez, el dominio extracelular presenta dos partes, un tallo y un dominio Variable de Inmunoglobulina (IgV) (Wang *et al.*, 2022).



**Figura 7.** Modelo de la estructura de PD-1H. A la izquierda (imagen A) se muestra un esquema de la estructura de PD-1H en la que se aprecian los tres dominios principales de la molécula: IgV y Tallo conforman el dominio extracelular, TM se corresponde con el dominio transmembrana e IC equivale a dominio intracelular (imagen tomada de del Vigo Soto, 2020). Los puntos rojos representan posibles puntos de unión para la proteína quinasa C. A la derecha (imagen B) se encuentra un modelo tridimensional del PD-1H (imagen tomada del Protein Data Bank código de entrada: 6U6V)

Esta fracción extracelular ha sido la parte más estudiada del receptor, pues se han realizado estudios bioinformáticos y de cristalografía. Estos análisis han determinado que el dominio extracelular presenta unas propiedades especiales, como el extenso tamaño de la porción IgV y el alto contenido en histidinas. Además, este dominio del PD-1H presenta otras características estructurales no típicas de los dominios IgV (Slater *et al.*, 2020). La proteína VISTA se encuentra codificada en un gen localizado en el cromosoma 10 humano, algo que resulta especialmente interesante porque no existen genes que codifican para otros receptores de la superfamilia Ig. La expresión de este receptor, aparte de en linfocitos T, aparece en otros tipos celulares entre los que se encuentran monocitos, neutrófilos, macrófagos, etc (Wang *et al.*, 2022). La fracción IgV del PD-1H presenta una homología bastante baja con el resto de miembros de la familia de receptores CD28/B7, siendo el mayor valor de este parámetro un 22% al comparar con PD-L1 (Wang *et al.*, 2022). Por otra parte, al analizar la proteína completa, PD-1H es el receptor de la familia CD28/B7 con mayor conservación entre la especie humana y murina, con un 76% de identidad (Nowak *et al.*, 2017).

#### **1.4. Principales funciones de PD-1H. Su doble papel como receptor y ligando**

Debido a su pertenencia al grupo de los receptores co-inhibidores, la función principal del receptor PD-1H es la de ejercer una acción supresora de la respuesta inmunitaria. A partir de esta actividad general, se derivan sus implicaciones en procesos tumorales y su participación en enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Nowak *et al.*, 2017). Su relación con el cáncer resulta muy interesante. En este contexto, el PD-1H actuaría como un mecanismo de evasión del sistema inmunitario en aquellos tumores en los que se ha observado su sobreexpresión. Varios estudios demuestran esto último mediante el establecimiento de correlaciones entre la sobreexpresión de PD-1H y otras moléculas, tanto en células tumorales como en células sanas (Mortezaee *et al.*, 2022). A esto es necesario sumar el efecto del Microambiente Tumoral (TME). Este TME impide que las respuestas inmunitarias antitumorales sean efectivas mediante el uso de mecanismos supresores de dichas respuestas, entre los que se encontraría involucrado VISTA (Nowak *et al.*, 2017). Siguiendo esta idea, la actividad inmunosupresora del PD-1H, en combinación con otros receptores co-inhibidores, sería utilizada por el tumor para evitar el ataque del sistema inmunitario del organismo durante el crecimiento y propagación tumoral (Nowak *et al.*, 2017).

Por otra parte, la función del PD-1H en casos de enfermedades autoinmunes e inflamatorias sería mediar en la activación de la respuesta inmunitaria que desencadena estas patologías. A diferencia de lo que ocurre en el cáncer, en este caso, el propio VISTA es el causante de la enfermedad (se produce una liberación masiva de citoquinas proinflamatorias) (Mortezaee *et al.*, 2022). El modelo de enfermedad autoinmune mediada por PD-1H más estudiado es el lupus eritematoso. En esta patología, se producen una serie de lesiones cutáneas debido a reacciones inmunitarias contra proteínas propias del organismo. Según la literatura, la activación de VISTA mediante medicamentos biológicos agonistas provocaría una reducción de la activación de la respuesta inmunitaria, lo que permitiría tratar este tipo de enfermedades (Han *et al.*, 2019). Para las enfermedades inflamatorias, un buen modelo de estudio sería el asma. Ante un evento de asma, se produce una infiltración masiva de eosinófilos en las vías respiratorias y una liberación desproporcionada de citoquinas proinflamatorias que superan la capacidad reguladora, debida a la incapacidad de actuación de los linfocitos T reguladores y de los receptores supresores de la respuesta inmune, entre los que se incluiría el PD-1H (Liu *et al.*, 2018)

Aparte de todas las enfermedades anteriormente mencionadas, otros procesos patológicos en los que participa VISTA son la artritis inducida por anticuerpos y la “Graft Versus Host Disease (GVHD)” (Mortezaee *et al.*, 2022).

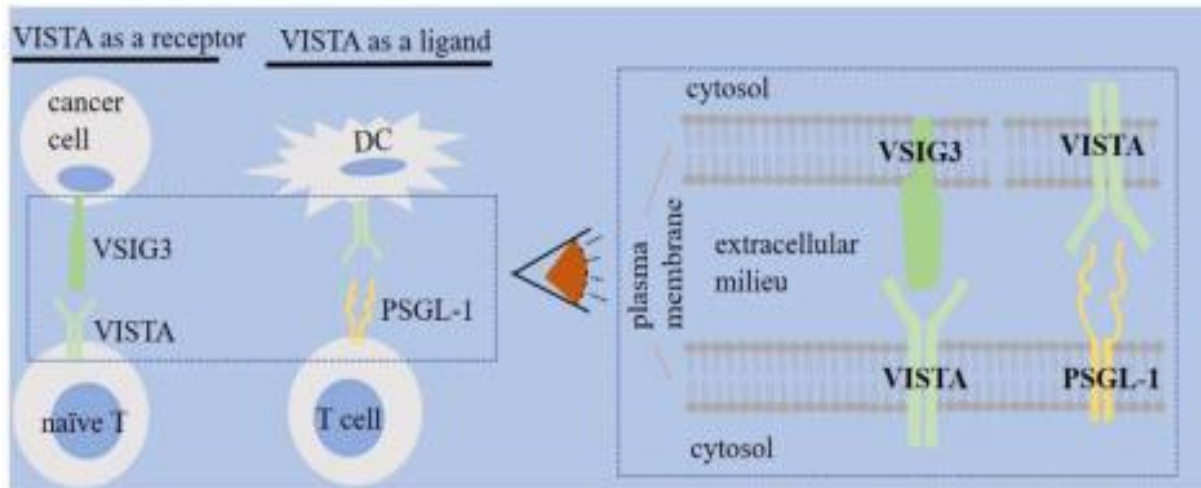
### **1.5. Ligandos propuestos para el receptor PD-1H**

Debido a las peculiaridades de su estructura, el PD-1H tiene la capacidad de actuar tanto de receptor como de ligando. Esto es a causa de, por un lado, la presencia de dos sitios de unión para proteínquinasa C y de regiones ricas en prolina, que sirven como sitios de anclaje en su dominio citoplasmático (Mortezaee *et al.*, 2022) y, por el otro, la inusual riqueza en residuos de histidina en el dominio extracelular (Johnston *et al.*, 2019). Aunque inicialmente se creía que VISTA funcionaba como un receptor convencional, una serie de ensayos realizados *in vitro* de medición de la activación de la respuesta de células T en presencia del PD-1H demostró su capacidad de actuación como ligando (Nowak *et al.*, 2017). Partiendo de esta idea de bifuncionalidad, se han descrito dos ligandos para el PD-1H en la especie humana.

En primer lugar, se encuentra el “V-Set and Immunoglobulin domain containing 3 (VSIG-3)”, una proteína de superficie celular perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se trata de un receptor celular característico de cerebro y testículos, si bien su expresión se ve incrementada en células tumorales de diferentes tipos de cánceres (cáncer colorectal, carcinoma hepatocelular y cánceres gástricos tipo intestinal) (Wang *et al.*, 2019). La interacción PD-1H/VSIG-3 provoca una reducción de la proliferación de células T activadas, así como una disminución en la producción de citoquinas y quimiocinas (Wang *et al.*, 2019). Bajo estas premisas, VISTA actuaría como un receptor co-inhibidor de los linfocitos que infiltran tumores (Mortezaee *et al.*, 2022).

Por otra parte, las histidinas de la región extracelular del PD-1H le permiten, mediante sus cadenas laterales, interactuar con la proteína “P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1)”. Se trata de una proteína que facilita la adhesión celular entre leucocitos, plaquetas y células endoteliales. En otro contexto, mediaría en la regulación negativa de la respuesta de células T, tal como en casos de infección viral crónica, cáncer y algunas enfermedades autoinmunes (Johnston *et al.*, 2019). En este escenario, el PD-1H actuaría como un ligando de PSGL-1 expresado en las APCs (Mortezaee *et al.*, 2022). La literatura, además, indica que, *in vivo*, la interacción de PD-1H con PSGL-1 es dependiente del pH, de forma que únicamente se produce en presencia de pH ácido. Esto es de especial interés, pues una de las características del TME

es este pH más bajo que el fisiológico, lo que sugiere que PD-1H expresado en un tumor actuaría como un ligando inhibitor de la respuesta inmune antitumoral (Johnston *et al.*, 2019).



**Figura 8.** Esquema de la doble función de PD-1H como receptor y ligando. En la parte izquierda se indica como dependiendo del tipo de célula en el que se exprese VISTA, su función puede ser la de receptor o ligando. A la derecha se encuentra una ampliación que muestra en más detalle la interacción de PD-1H, según actúe como receptor o ligando. Imagen tomada de Mortezaee *et al.*, 2022

A pesar de toda la información conocida acerca de estos posibles ligandos del PD-1H, ensayos *in vitro* de citometría de flujo no han podido confirmar que estas interacciones que ocurren en la especie humana se encuentren presentes también en la especie murina.

### 1.6. Implicaciones del PD-1H en la inmunoterapia contra el cáncer

Como indican los antecedentes previos de este trabajo, la mayor parte de los esfuerzos realizados en la investigación del PD-1H han estado encaminados a estudiar su papel en el contexto de la respuesta inmunitaria antitumoral. Esto se debe a que VISTA exhibe un gran potencial como punto de control inmunitario, con enormes posibilidades de ser una buena diana terapéutica para el desarrollo de tratamientos contra el cáncer.

El descubrimiento de la capacidad del PD-1H de funcionar, tanto como ligando como receptor, se traduce en diferentes posibles terapias a aplicar. Si bien en la especie humana se conoce la existencia de receptores que interactúan con VISTA, en la especie murina estas moléculas no han sido identificadas, lo que supone un obstáculo para el desarrollo preclínico de tratamientos antitumorales basados en esta diana terapéutica. Ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando ratones, demuestran que la mayor activación de las células T ocurre en ausencia de PD-1H, tanto en las células T como en las APC. Por tanto, se podrían utilizar anticuerpos específicos anti-PD-1H que eviten las señales co-inhibidoras recibidas por células T activadas o naïve

(Nowak *et al.*, 2017). Además, también se podrían utilizar anticuerpos dirigidos contra los posibles ligandos del PD-1H (Nowak *et al.*, 2017). En cualquier caso, la expresión de VISTA en las células mieloides supresoras de tumores y el pH ácido del TME condicionan las posibles interacciones de PD-1H con sus posibles ligandos (Johnston *et al.*, 2019).

En la actualidad, existen varios fármacos basados en anticuerpos monoclonales para el tratamiento del cáncer que actúan sobre cascadas de señalización de otros ICI, principalmente sobre CTLA-4 o PD-1 (Wang *et al.*, 2019). Por esto, el desarrollo de nuevos medicamentos capaces de actuar sobre el PD-1H supone una nueva estrategia de lucha contra el cáncer (Wang *et al.*, 2019). Por otra parte, se puede utilizar también los niveles de expresión de PD-1H como una herramienta de diagnóstico de tumores en estadio temprano (Mortezaee *et al.*, 2022). Unos estudios realizados en pacientes que padecen de un tipo de cáncer de esófago (*esophageal SSC*) han encontrado una correlación positiva entre mayor tasa de supervivencia y bajos niveles de expresión de PD-1H en las células infiltrantes del tumor (Linfocitos Infiltrantes del Tumor o TILs), ya que es necesaria una cantidad mínima de VISTA para que se produzca la inhibición de la respuesta inmunitaria antitumoral (Mortezaee *et al.*, 2022). Por el contrario, en estadios más avanzados de cáncer, se produce una sobreexpresión de PD-1H, lo que genera a su vez un cambio en el TME que impide el correcto funcionamiento de la respuesta inmunitaria antitumoral. Varios estudios dedicados a buscar relaciones entre esta sobreexpresión de PD-1H y el avance del desarrollo de diferentes tipos de tumores han arrojado resultados que parecen indicar que un aumento en la expresión de VISTA implica un peor pronóstico (Mortezaee *et al.*, 2022). Por tanto, la determinación del nivel de expresión del receptor PD-1H también puede ser utilizada como un elemento de diagnóstico en casos de cáncer en estado avanzado.

En última instancia, la literatura también reconoce el potencial del PD-1H como mediador en los fenómenos de resistencia a fármacos anti-CTLA-4 y bloqueantes de la interacción de PD-1 con PD-L1 (Johnston *et al.*, 2019). Debido a esto, uno de los enfoques más prometedores en la inmunoterapia del cáncer son las terapias combinadas, buscando las interacciones sinérgicas entre fármacos. Además, es necesario identificar biomarcadores de respuesta clínica predictivos, para así poder elegir qué tratamientos son los más adecuados. Por último, otro factor a tener en cuenta es la evolución del TME y de la respuesta inmune antitumoral a lo largo del desarrollo de un tumor (Nowak *et al.*, 2017).

### **1.7. Estrategia para la identificación del ligando de PD-1H en la especie murina. El sistema BioID2**

El BioID2 es un método de estudio de las interacciones entre proteínas. Surge como una forma evolucionada del sistema BioID, una técnica utilizada para el análisis de interacción entre proteínas mediante la biotinylación promiscua de moléculas celulares llevada a cabo por una ligasa bacteriana (Kim *et al.*, 2016). Este marcaje con biotina es dependiente de la proximidad entre las proteínas (entre 10 y 15 nm de separación). Además, como la biotinylación es una modificación muy rara en la naturaleza, se pueden purificar las proteínas marcadas utilizando técnicas comunes de cromatografía de afinidad con *sepharose streptavidin beads* (Roux *et al.*, 2018).

El método BioID consiste en generar una proteína fusión, conformada por una proteína cebo (aquella con la que se busca interacciones) y una ligasa bacteriana proveniente de *E.coli* (Kim *et al.*, 2016). Una vez obtenida la proteína fusión, se modifican genéticamente las células de forma que la expresen de forma estable. Así, se consigue que la biotinylación pueda extenderse durante todo el tiempo de vida de la célula. Entonces, en el momento que una molécula se acerque lo suficiente a la proteína fusión, se produce la biotinylación, quedando la proteína presa marcada. Por último, se purificarían estas proteínas marcadas mediante cromatografía de afinidad con estreptavidina-sefarosa (Kim *et al.*, 2016). Este método permite identificar interacciones en cis que ocurren en la misma célula cuando dos moléculas están coexpresadas.

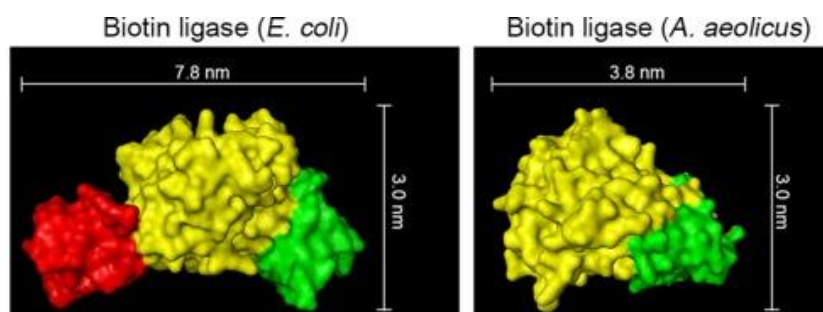
La ventaja principal de esta tecnología es su capacidad para ser utilizada en estudios de proteínas insolubles y proteínas asociadas a la membrana, además, también es capaz de detectar interacciones débiles/transitorias entre proteínas, todo ello en un ambiente relativamente similar al celular. Otra ventaja del BioID es que puede inducirse, en cierta medida y temporalmente, la biotinylación de las proteínas (Roux *et al.*, 2018). Sin embargo, existen dos problemas (Roux *et al.*, 2018):

- Al presentar un tamaño mayor que otras alternativas (por ejemplo, la GFP) puede dificultar la localización de la proteína de fusión o alterar la funcionalidad de la proteína cebo.
- Las proteínas marcadas con biotina no tienen que interactuar necesariamente con la proteína cebo, sino que simplemente se encuentren próximas entre sí en la célula.



Debido a esto, se ha llevado a cabo el desarrollo de un nuevo método basado en el BioID denominado BioID2 que palia estos inconvenientes en gran medida.

El BioID2 es un sistema basado, al igual que el BioID, en las biotin ligasas bacterianas, sin embargo, BioID2 toma como base la enzima proveniente de *Aquifex aeolicus*, no la de *E.coli*, a la que se han realizado una serie de modificaciones. Esta ligasa de *A. aeolicus* es la biotin ligasa de menor tamaño existente, lo que soluciona todos los problemas relacionados con el tamaño de la ligasa (Kim *et al.*, 2016). Otra ventaja del BioID2 sobre BioID es que la primera requiere de una menor concentración de biotina para poder realizar el marcaje y que se puede incrementar el rango de biotilación de BioID2, utilizando un linker entre la proteína cebo y la biotin ligasa (Kim *et al.*, 2016).



**Figura 9.** Modelo tridimensional de las biotin ligasas de *E. coli* (izquierda) y *A. aeolicus* (derecha). Imagen tomada de Kim *et al.*, 2016

## 2. Hipótesis y objetivos

### 2.1. Hipótesis de trabajo

Según muestran las evidencias preliminares en modelos animales de inflamación, la interacción de PD-1H con sus ligandos co-inhibe la función de los linfocitos T. Sin embargo, en la actualidad, no se conoce en profundidad el mecanismo de funcionamiento de esta vía y tampoco se han identificado los ligandos de PD-1H en la especie murina. En este contexto, la utilización del sistema BioID2 permitiría realizar un pre-screening de proteínas y así identificar posibles candidatos a ser el verdadero ligando de VISTA, en caso de ser co-expresado en la misma célula (configuración cis)

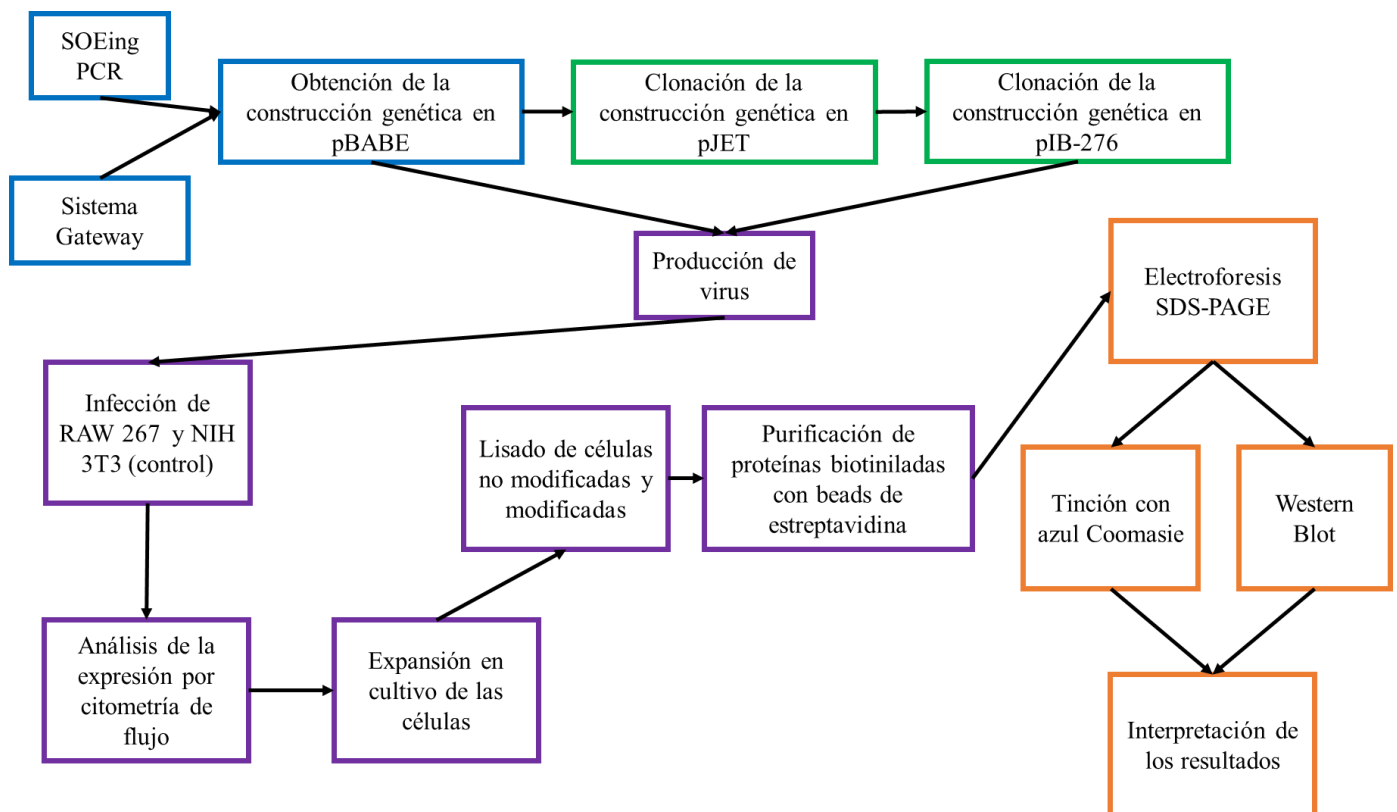
### 2.2. Objetivos

Objetivo general: diseño de una estrategia experimental para la identificación de ligandos de PD-1H.

Objetivos específicos:

- El diseño de un vector viral capaz de expresar PD-1H murino fusionado al sistema BioID2, mediante técnicas de ingeniería genética.
- Transducción de células para la expresión estable de PD-1H/BioID2.
- Purificación del ligando de PD-1H expresado en configuración cis de las células modificadas genéticamente

### 3. Materiales y métodos



**Figura 10.** Esquema del flujo de trabajo seguido durante el Trabajo Fin de Grado

#### 3.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo

Se utilizaron dos cepas bacterianas de *Escherichia coli* (*E. coli*), la cepa TOP 10, utilizada en los procesos de clonaje de la construcción genética y la cepa STBL3, que sirvió como cepa en la que se conservará la construcción genética final. Las características de ambas cepas, así como de los medios de cultivo utilizados se detallan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Características de las cepas bacterianas y medios de cultivo utilizados en los experimentos

Cepa bacteriana	Procedencia	Genotipo			
<i>E. coli</i> TOP 10	Invitrogen	F- <i>mcrA</i> Δ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ ( <i>araleu</i> ) 7697 <i>galU galK rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>			
<i>E. coli</i> STBL3	Invitrogen	F- <i>mcrB mrrhsdS20</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) <i>recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i>(<i>Str<sup>R</sup></i>) <i>xyl-5 λ-leumtl-1</i></i>			
Medios de cultivo					
Ingredientes	LB-TB (medio líquido)	LB-TB (medio sólido)	Casa comercial		SOC
Luria y Bertani (LB)	12,5 g/L	12,5 g/L	Roth		20 g/L de triptona
Terrific Broth (TB)	24,5 g/L	24,5 g/L	Roth		5 g/L de extracto de levadura
Agar	-	20 g/L	Roth		0,5 g/L de NaCl

### 3.2. Líneas celulares, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Durante el experimento, se utilizaron varias líneas celulares, cuyas características se detallan en la siguiente tabla:

**Tabla 2.** Características de las diferentes líneas celulares utilizadas durante los experimentos

Línea celular	Tipo celular	Función	Modificaciones realizadas
LCL-5	Linfocito B	Células empaquetadoras de retrovirus ecotrópicos	Transfección con plásmidos de interés
HEK 293T	Célula de riñón embrionario humano	Células empaquetadoras de retrovirus pseudotipados con VSV-G	Transfección con plásmidos empaquetadores (pIB-269, pIB-270 y pIB-285) para la obtención de retrovirus
NIH 3T3	Fibroblasto	Control de la infección	Infección con los virus producidos
RAW 267	Macrófago	Línea que será modificada para observar la interacción receptor-ligando	Infección con virus para expresión de la construcción génica

En cuanto a los medios de cultivo, se utilizó medio RPMI 1640 con 10% de Fetal Calf Serum (FCS) y aditivos para el crecimiento y expansión de las diferentes líneas celulares. Por otra parte, durante los procesos de transfección se utilizó Opti-MEM, se trata de una modificación del medio mínimo esencial de Eagle, al cual se le han añadido una serie de compuestos (HEPES, bicarbonato sódico, piruvato sódico, timidina, hipoxantina, L-glutamina y factores de crecimiento).

### **3.3. Diseño, preparación de la construcción genética y clonación en el vector retroviral pBABE**

El primer paso dado para el desarrollo de la estrategia experimental propuesta fue el diseño, mediante herramientas y softwares informáticos (SnapGene, base de datos de plásmidos del laboratorio). Para la obtención de la construcción buscada, fue necesario realizar una fusión de proteínas, para lo cual se utilizó la técnica de SOEing PCR (figura 1 del anexo I). Tras esto, se utilizó el sistema Gateway para la introducción del gen codificante para la proteína recombinante de fusión PD-1H/BioID2 en un vector retroviral (pBABE) (figura 2 del anexo I).

### **3.4. Clonación en pJET (vector de paso)**

En primer lugar, se procedió a la obtención, mediante PCR (tabla 1 del anexo II), de la secuencia de ADN que codifica para la construcción, a la que se le añadió, paralelamente, las secuencias de corte de dos enzimas de restricción (*AgeI* y *EcoRI*). Posteriormente, se comprobó el éxito de la amplificación y se extrajo el producto de PCR, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del kit de extracción de banda.

Una vez aislado el fragmento de ADN con la construcción, se realizó la ligación del fragmento de ADN en el vector de clonaje pJET, siguiendo el protocolo que se encuentra en la tabla 4 del anexo II. Es importante añadir que la preparación del mix de ligación se llevó a cabo en hielo y que es necesario dejar la mezcla en frío hasta que la tapa del termociclador alcance la temperatura adecuada. También, tras la ligación, se procedió a la transformación de bacterias *E. coli* TOP10 mediante choque térmico y su cultivo en placas de medio LB sólido suplementado con carbenicilina como agente de selección. Para asegurar que la construcción genética se habría transformado de manera efectiva, se realizó una PCR de colonia (tabla 2 del anexo II) de varias colonias bacterianas crecidas en presencia de antibiótico, seguida de una extracción del plásmido y comprobación de la secuencia mediante un análisis de secuenciación (Servicio de ácidos nucleicos de la ULE).

### **3.5. Clonación en el vector retroviral pIB-276**

El siguiente paso consistió en una nueva clonación de la construcción genética en el vector final. Al igual que para el clonaje en pJET, se siguió una estrategia de clonaje dirigido, comenzando por la digestión tanto del pJET como del vector destino pIB-276 con las enzimas de restricción *AgeI* y *EcoRI*. De esta forma, se obtuvo la construcción genética y el vector viral linearizado. Las condiciones de las reacciones se muestran en la tabla 3 del anexo II. Debido a que el tamaño

del pIB-276 con el inserto PD-1H/BioID2 era demasiado grande (9025 pb) y a que el gen que codifica para GFP (ya presente en el pIB-276) no es necesario, durante la digestión se eliminó este gen que codifica para GFP. Tras esto, se procedió a la ligación del inserto con el pIB-437, siguiendo el protocolo que se muestra en la tabla 5 del anexo II.

Después de terminar el clonaje, se transformaron de nuevo *E. coli* TOP 10 con los mismos objetivos y procedimientos que los seguidos en el caso del pJET.

Por último, se hizo una nueva transformación, pero esta vez en la cepa de *E.coli* STBL3, pues es la cepa más indicada para manipular este tipo de vectores. Posteriormente, se congelaron las bacterias transformadas a -80 °C como stock para la extracción de ADN plasmídico en el futuro.

### 3.6. Producción de la construcción genética recombinante PD-1H/BioID2

Es importante destacar que antes de realizar este paso, se ensayó, mediante citometría de flujo, la integridad y expresión de la construcción. Para la producción de los virus, se requirieron grandes cantidades de vector viral. Por ello, se realizaron tres extracciones de ADN plasmídico de cultivos en medio LB líquido de *E.coli* TOP10 transformadas con el vector final. Los protocolos seguidos se muestran en la tabla 1 del anexo III. Tras esto, se procedió a la transfección, mediante liposomas, de las células empaquetadoras de virus (HEK 293T), siguiendo el protocolo recogido en la siguiente tabla:

**Tabla 3.** Proporciones de los plásmidos y reactivos necesarios para la transfección de las células HEK 293 por placa

Vector	pIB-437 (transfer)	pIB-269 (helper)	pIB-270 (envelope)	pIB-285 (adyuvante)	Total
Cantidad de DNA (por placa)	36 µg	18 µg	9 µg	9 µg	72 µg
Opti-Mem	1284 µL				
Liposomas	216 µL				

Posteriormente, estas células se incubaron durante 48 horas y se procedió a la purificación de los virus generados mediante ultracentrifugación.

### 3.7. Infección de los macrófagos RAW 267

A continuación, se infectaron las células RAW 267 con diferentes diluciones de la solución de virus concentrada. Durante este proceso, se utilizaron células de la línea NIH 3T3 como control de la infección.

### 3.8. Análisis de estabilidad de la expresión

Para detectar la expresión de la fusión PD-1H/BioID2 se utilizó la citometría de flujo. Lo primero fue diseñar la plantilla de análisis. Tras esto, se procedió a la tinción de las muestras, que se prepararon en una placa de 96 pocillos, para su posterior análisis en el citómetro de flujo. El protocolo de tinción se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 4.** Protocolo de tinción de las muestras para análisis por citometría de flujo

Paso	Descripción
1°	Añadir volumen suficiente de células como para tener el número adecuado de células en cada pocillo
2°	Centrifugar la placa de 96 pocillos a 1200 rpm durante 2 minutos y desechar los sobrenadantes
3°	Preparar las diluciones de anticuerpos a las concentraciones adecuadas para cada uno de ellos. Las diluciones se preparan utilizando FACS Buffer como diluyente
4°	Añadir 50 µL de las diluciones de anticuerpos (marcados con fluorocromos) correspondientes a cada pocillo, siguiendo el diseño de la plantilla de tinción. En aquellos pocillos donde no habría que añadir anticuerpo, se añaden 50 µL de FACS Buffer
5°	Tapar la placa, con papel de aluminio, para evitar que la luz degrade los fluorocromos acoplados a los anticuerpos
6°	Incubar las células con los anticuerpos durante 15 minutos a temperatura ambiente, manteniendo la placa tapada
7°	Centrifugar la placa a 1200 rpm durante 2 minutos y desechar los sobrenadantes
8°	Preparar las diluciones de estreptavidina a las concentraciones adecuadas, diluyendo en FACS Buffer
9°	Añadir 50 µL de la dilución de estreptavidina correspondiente a cada pocillo (anticuerpos marcados con biotina), siguiendo la plantilla. En aquellos pocillos donde no habría que añadir estreptavidina, se añaden 50 µL de FACS Buffer
10°	Incubar las células con la estreptavidina durante 15 minutos a temperatura ambiente, manteniendo la placa tapada
11°	Centrifugar la placa a 1200 rpm durante 2 minutos y desechar los sobrenadantes
12°	Lavar cada pocillo con 200 µL de FACS Buffer para eliminar el exceso de fluorocromos
13°	Centrifugar la placa a 1200 rpm durante 2 minutos y desechar los sobrenadantes
14°	Resuspender las muestras en un volumen de 200 µL de FACS Buffer y tapar la placa para llevarla al citómetro

### 3.9. Preparación de lisados celulares

Una vez comprobado el nivel de expresión de la proteína de interés, se dejan las células dos días en cultivo para que tenga lugar la biotinilación de las moléculas por el BioID2. Tras esto, se extrajeron las proteínas del cultivo celular mediante la lisis de las células. Para ello, se siguió el protocolo sugerido por la casa comercial (Invitrogen), detallado a continuación (tabla 5), utilizando como material de partida  $20 \times 10^6$  células.

**Tabla 5.** Protocolo de preparación del Buffer de Lisis y de realización del lisado de las células

<b>Buffer de lisis</b>	Suplementar el Cell Lysis Buffer II (Invitrogen FNN0021) con 1 mM de PMSF (Millipore 52332) y cóctel inhibidor de proteasas (Sigma P8340)
<b>Paso</b>	<b>Descripción</b>
1°	Recolectar las células en PBS, levantándolas de la placa con Buffer de Macrófagos
2°	Centrifugar a 1600 rpm durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante
3°	Lavar las células 2 veces con PBS frío, centrifugando como en el paso anterior
4°	Lisar el pellet de células durante 30 minutos, en hielo y agitando con vórtex cada 10 minutos
5°	Centrifugar el lisado a 13000 rpm durante 10 minutos a 4 °C
6°	Congelar el lisado a -80 °C

### 3.10. Detección y purificación de moléculas biotiniladas

Para la separación de las proteínas biotiniladas del resto de proteínas de la muestra se utilizaron las beads de estreptavidina de BioVision (6565-2). El protocolo seguido fue una adaptación del protocolo propuesto por GoldBio y se muestra a continuación:

**Tabla 6.** Protocolo de purificación de los lisados celulares

Paso	Descripción
1°	Resuspender las beads en su propio buffer con unos golpecitos suaves con el dedo
2°	Tomar 10 µL de beads y añadirlas a un Eppendorf vacío
3°	Lavar las beads con 100 µL de PBS y centrifugar 2 minutos a 1000g. Luego, eliminar el sobrenadante
4°	Repetir el paso anterior 3 veces más
5°	Añadir 100 µL de lisado celular a las beads lavadas y resuspender las beads en el lisado, dando unos golpes suaves con el dedo
6°	Incubar la muestra con las beads durante 2 horas en hielo, dando un vortex suave cada 5 minutos
7°	Centrifugar 2 minutos a 1000 g y eliminar el sobrenadante
8°	Lavar las beads con 100 µL de PBS y centrifugar de nuevo 2 minutos a 1000 g
9°	Recoger el sobrenadante y medir su absorbancia a 280 nm. Repetir estos dos últimos pasos hasta que la absorbancia sea mínima (menor de 0,002 - 0,001)
10°	Cuando la absorbancia alcanza el valor adecuado, resuspender las beads en 100 µL de SDS Sample Buffer (2x) suplementado con 0,4 M de urea
11°	Si fuere necesario conservar la muestra a -20°C para futuros análisis

### 3.11. Aislamiento y detección de moléculas biotiniladas

La separación de las moléculas biotiniladas presentes en la muestra se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE. Antes de realizar la electroforesis es necesario preparar las muestras de proteínas, para ello se sigue el siguiente protocolo:

**Tabla 7.** Protocolo de preparación de las muestras de proteínas para SDS-PAGE

Paso	Descripción
1°	Tomar volumen de muestra suficiente como para cargar 7 µg de proteína
2°	Añadir PBS suficiente como para que el SDS Sample Buffer quede a concentración 1x.
3°	Añadir β-mercaptoetanol suficiente para que este quede en la proporción adecuada (1 µL de β-mercaptoetanol por 4 µL de Sample Buffer)
<b>Consideración</b>	La cuantificación de la concentración de proteína no se puede realizar de manera exacta en todas las muestras, por lo que alguna de ellas se determinó de manera relativa, cargando diferentes diluciones de la muestra en otro gel

El procedimiento seguido para realizar la electroforesis se muestra en la siguiente tabla y tras ella, se realizó la tinción del gel resultante con azul Coomassie.

**Tabla 8.** Protocolo de realización de la electroforesis SDS-PAGE

Paso	Descripción
1°	Montar los cristales (1 mm de grosor) en el soporte
2°	Comprobar la presencia de fugas añadiendo 2 mL de agua miliQ
3°	Eliminar el agua volcando el soporte y secar los restos que puedan quedar con papel Whatman
4°	Preparar 5 mL de Resolving Gel al 8% (tabla 6 del anexo II) y añadirlos entre los cristales. Dar unos pequeños golpes con el soporte en la poyata para que se iguale el frente del gel
5°	Añadir isopropanol suficiente sobre el gel como para que este sobresalga un poco por encima de los cristales. Dar unos golpecitos con el soporte a la poyata para asegurar que el frente del gel queda alineado
6°	Esperar que el Resolving Gel polimerice y eliminar el isopropanol volcando el soporte y secando los restos con papel Whatman
7°	Preparar 2 mL de Stacking Gel al 5% (tabla 7 del anexo II) y añadirlos entre los cristales. Colocar el peine inmediatamente después
8°	Esperar a que el Stacking Gel polimerice
9°	Montar la cubeta de electroforesis y añadir suficiente volumen de Running Buffer 1x como para que el espacio entre los geles quede recubierto y la zona exterior esté llena hasta la mitad
10°	Retirar el peine del gel y cargar 2 µL de PAGE Ruler (marcador de pesos) y 20 µL de cada muestra

Luego, con el fin de detectar las proteínas biotiniladas presentes en los lisados celulares que no se aprecien con la tinción azul Coomassie, se realizó un Western Blot de otro gel preparado exactamente igual. El protocolo seguido se muestra a continuación:

**Tabla 9.** Protocolo de realización del Western Blot

Paso	Descripción
1°	Sacar el gel de poliacrilamida de los cristales en Transfer Buffer
2°	Montar el sándwich de transferencia, humedeciendo los materiales en Transfer Buffer
3°	Colocar el sándwich en la cubeta de electroforesis y añadir Transfer Buffer
4°	Realizar la transferencia a 20 mA en la cámara fría durante toda la noche
5°	Sacar la membrana de nitrocelulosa del sándwich y bloquearla incubando en leche al 5% durante 30 minutos en movimiento. Este paso se realiza en la cámara fría
6°	Tomar la membrana y depositarla en un tubo de 50 mL, de forma que quede pegada a la pared interior del tubo
7°	Lavar 3 veces con 8 mL de TTBS, en agitación durante 5 minutos en cada lavado
8°	Cubrir el tubo de 50 mL con papel de aluminio e incubar la membrana durante 30 minutos con estreptavidina peroxidasa (1/10000) en 5 mL de TTBS en movimiento
9°	Retirar la estreptavidina del tubo y lavar 3 veces la membrana con 8 mL de TTBS, agitando 5 minutos en cada lavado
10°	Revelar, en condiciones de oscuridad, incubando la membrana con los sustratos A y B en proporción 1:1 durante 2 minutos
11°	Retirar el exceso de líquido de la membrana y cubrirla con papel film transparente
12°	Colocar la membrana junto a una película fotográfica en una carpeta

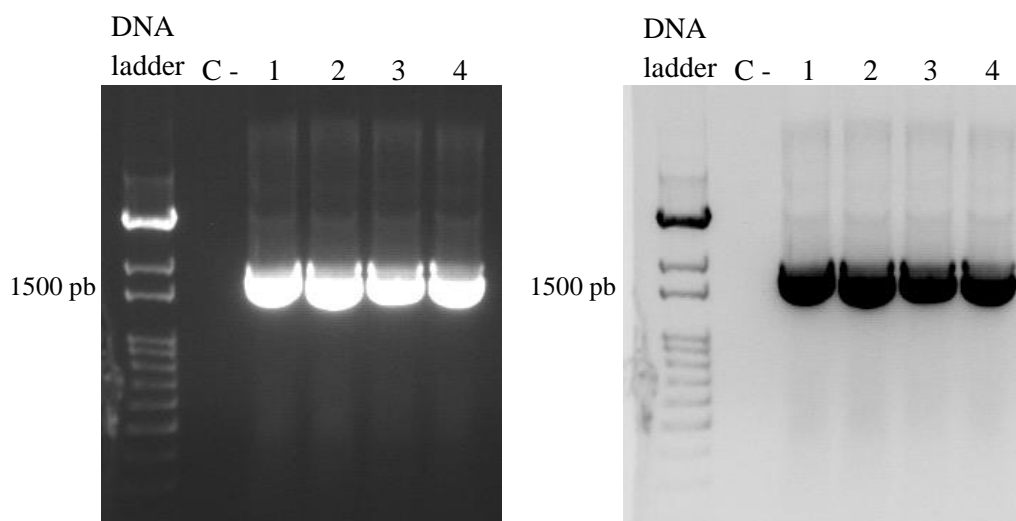


13°	Revelar la película en líquido revelador
14°	Lavar los restos de líquido revelador en agua y fijar en líquido fijador

## 4. Resultados

### 4.1. Obtención del vector viral pIB 437

El paso final de la primera parte del Trabajo Fin de Grado fue la construcción del vector viral que se utilizará para la modificación genética de las células eucariotas. Esto se consiguió a través de la ligación entre la secuencia de la proteína de interés (inserto PD-1H/BioID2) aislada, mediante digestión, del vector de clonaje intermedio (pJET) y el vector de clonaje destino (pIB 276), para generar así el plásmido recombinante final pIB-437. Tras esto, se transformó el plásmido final (pIB 437) en bacterias STBL3 y, posteriormente, se aisló de nuevo el plásmido de las bacterias y se realizó una PCR de colonia, amplificando el fragmento correspondiente a la proteína de fusión. El resultado de esta PCR se muestra a continuación en la figura 11.



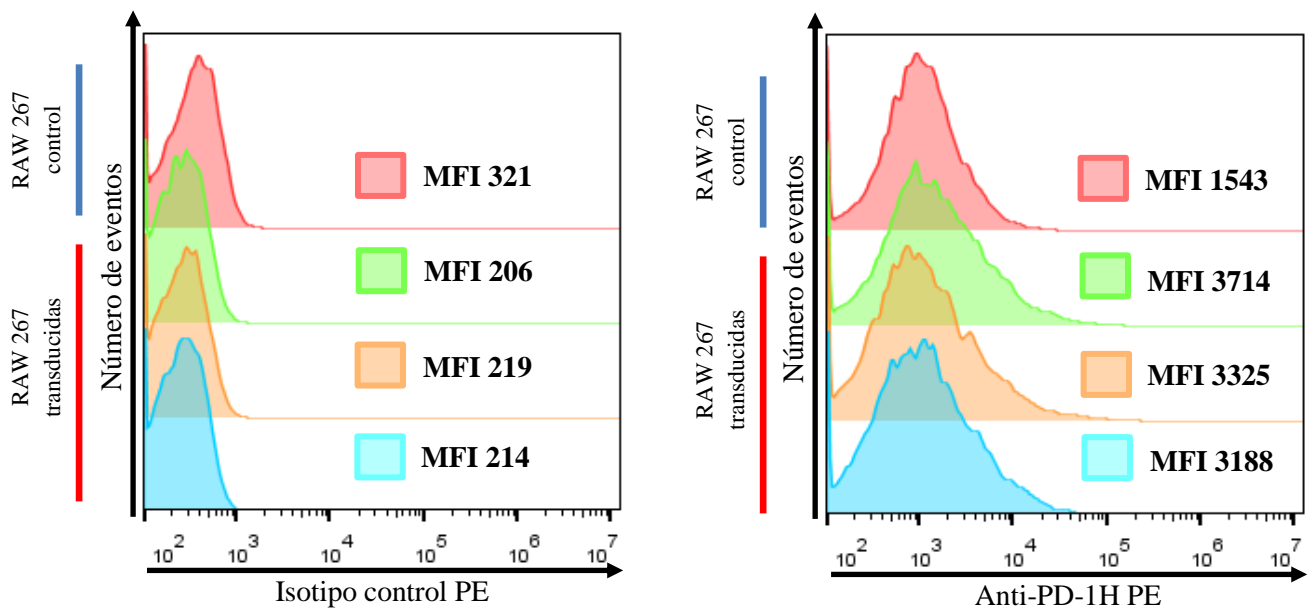
**Figura 11.** Gel de agarosa de la PCR de colonia normal (izquierda) y negativa (derecha). Se ensayaron 4 colonias aisladas que crecieron en presencia de carbenicilina. Todas las colonias resultaron positivas, lo que confirma que fueron transformadas exitosamente y contenían la construcción de interés. C – se identifica como el control negativo de la PCR

### 4.2. Infección y detección de la expresión de la proteína de fusión recombinante PD-1H/BioID2

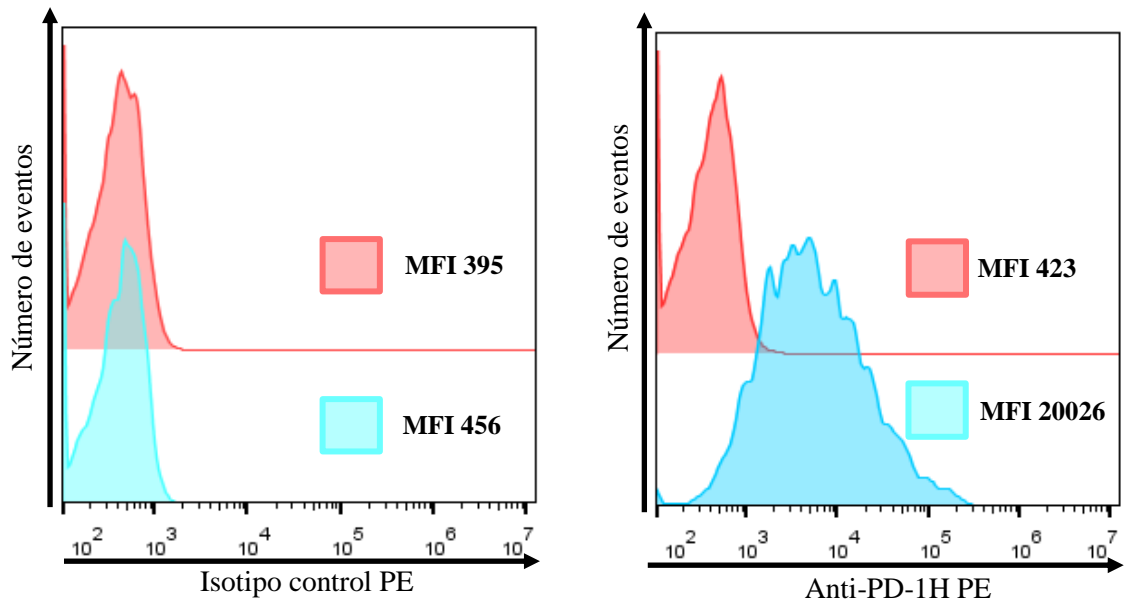
Se realizó la transfección de células HEK 293T con 4 plásmidos para producir los retrovirus para posteriormente infectar los macrófagos RAW 267. Luego, tras la infección de los macrófagos con los virus, se seleccionaron las células modificadas con puomicina y se analizó la expresión del PD-1H modificado en la superficie celular mediante citometría de flujo, utilizando un anticuerpo dirigido contra PD-1H.

A juzgar por los gráficos obtenidos, la infección de los macrófagos con los virus pIB-437 produjo una ligera sobreexpresión (aumentó 3 veces la MFI, con respecto al control no transducido) de la proteína recombinante PD-1H/BioID2 (Figura 12). Por otra parte, se puede afirmar que esto no se debe a un fallo durante el protocolo de infección, puesto que las células NIH 3T3 que se utilizaron como control de infección si presentan niveles aumentados de expresión de PD-1H (Figura 13). Debido a esto, se optó por repetir de nuevo la infección y citometría para tratar de realizar la modificación genética deseada (sobreexpresión de PD-1H/BioID2), pero se llegó de otra vez a los mismos resultados.

Teniendo en cuenta estos resultados, se tomó la decisión de continuar los experimentos utilizando como muestras las NIH 3T3, que permiten observar la expresión estable de la proteína de fusión tras la transducción.



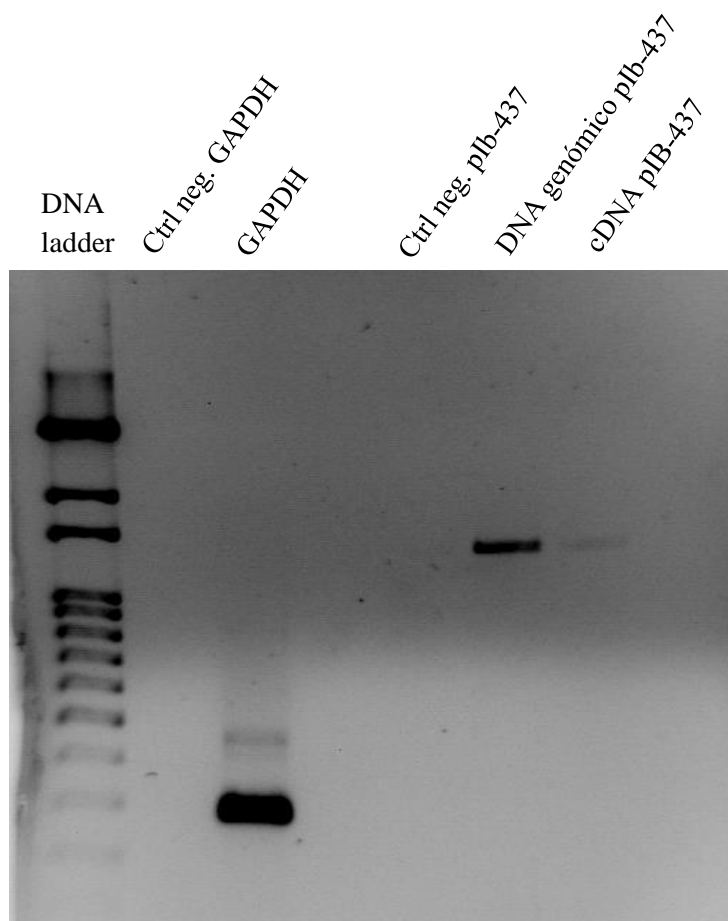
**Figura 12.** Histogramas de los resultados de la citometría de flujo de las células control de la infección (RAW 267). A la izquierda se muestra el resultado utilizando un anticuerpo isotipo control y a la derecha utilizando un anticuerpo anti-PD-1H. En color rojo, se muestra el valor de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células control y, en verde, naranja y azul el valor de 3 lotes distintos de células que expresan PD-1H/BioID2. Se puede apreciar como al utilizar un anticuerpo anti-PD-1H, se produce un ligero aumento en la expresión del receptor.



**Figura 13.** Histogramas de los resultados de la citometría de flujo de las células control de la infección (NIH 3T3). A la izquierda se muestra el resultado utilizando un anticuerpo isotipo control y a la derecha utilizando un anticuerpo anti-PD-1H. En color rojo, se muestra el valor de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células control y en azul, el valor de las células que expresan PD-1H/BioID2

#### 4.3. PCR de DNA genómico de la línea celular de macrófagos murinos RAW 267

Debido al resultado anterior, se tomó la decisión de realizar una PCR de ADN genómico extraído de los RAW 267, para comprobar si se había conseguido integrar el material genético del virus en el genoma de la célula. Para ello, primero se extrajo el ADN genómico y luego se realizó la PCR, utilizando como cebadores uno que anillaba con el PD-1H y otro que anillaba con el BioID2, de forma que solo cabría esperar amplificación de la secuencia que codifica para la fusión PD-1H/BioID2 si esta se hubiera integrado en el genoma de la célula. A continuación, se muestra el gel obtenido de la PCR.



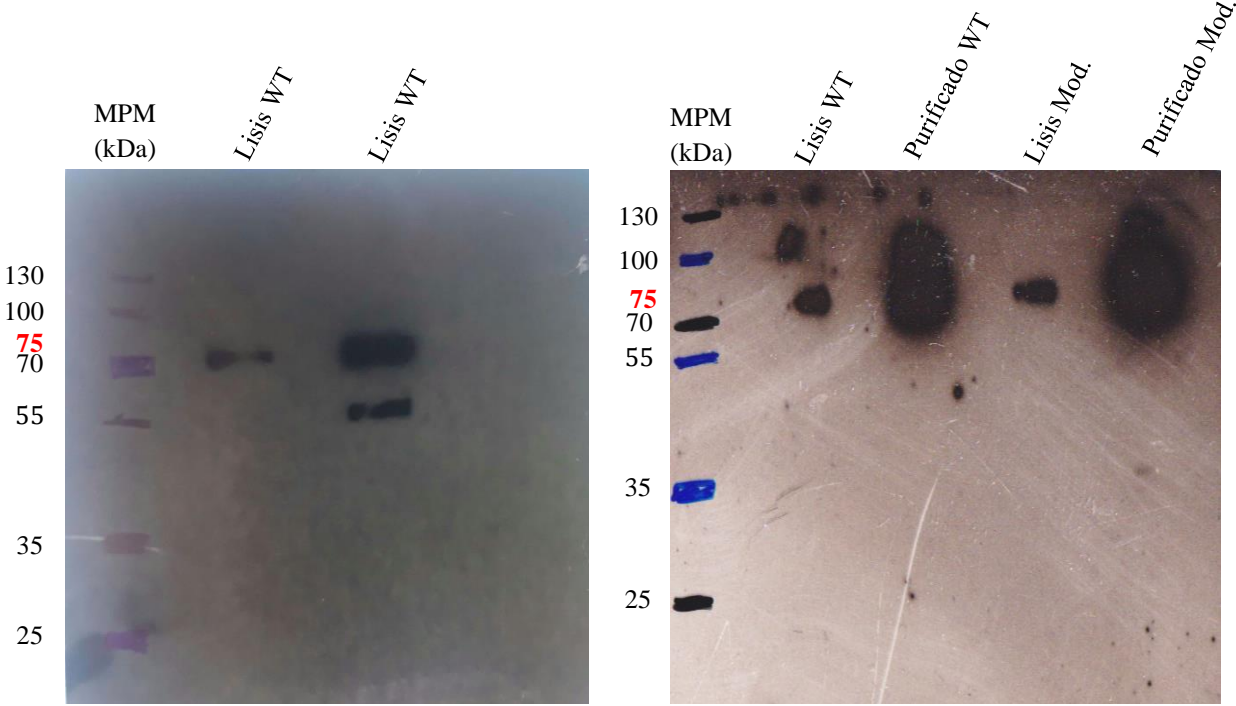
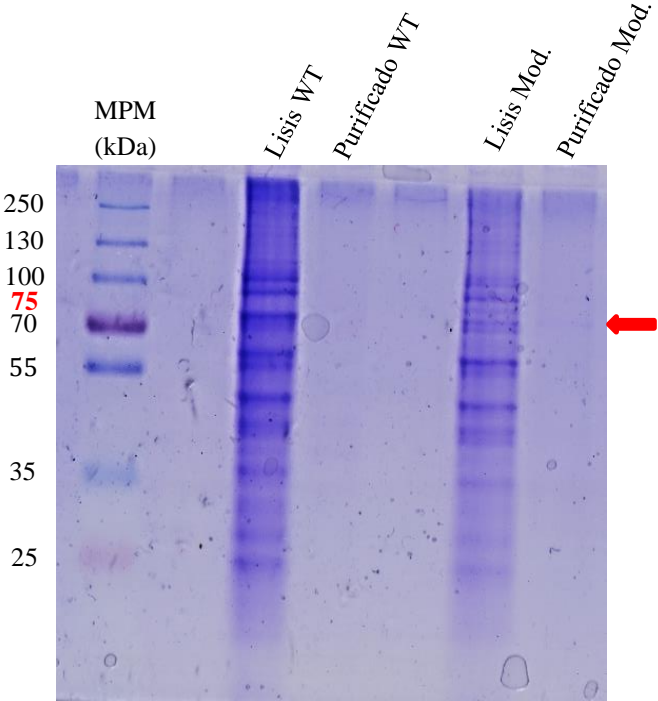
**Figura 14.** Imagen en negativo del gel obtenido de la PCR del ADN genómico de los macrófagos RAW 267. Se utilizó como control del funcionamiento de la PCR el gen *house keeping* GAPDH, amplificado con una pareja de cebadores específica para GAPDH. Para los carriles correspondientes al fragmento de ADN que codifica para PD-1H/BioID2 (Ctrl neg. pIB-437, DNA genómico pIB-437 y cDNA pIB-437) se utilizaron los cebadores específicos de PD-1H y BioID2- **Ctrl neg. GAPDH:** control negativo de la PCR. **GAPDH:** control positivo de la PCR. **C- 437:** control negativo de presencia del ADN viral en el genoma celular (se usaron los cebadores específicos de PD-1H y BioID2, pero sin muestra). **DNA genómico 437:** muestra de interés (cebadores específicos y ADN genómico). **cDNA 437:** amplicón obtenido tras una RT-PCR utilizando como molde el ARN de los RAW 267 transducidos con PD-1H/BioID2.

#### 4.4. Purificación e identificación de proteínas biotiniladas

A partir de las células NIH 3T3 modificadas genéticamente se prepararon lisados celulares para extraer sus proteínas. Posteriormente, se purificaron aquellas moléculas que estuvieran biotiniladas con beads de estreptavidina.

A fin de comparar el conjunto de proteínas biotiniladas, se realizó una electroforesis SDS-PAGE, utilizando como control un lisado, purificado y no purificado de células NIH 3T3 no infectadas, así como un lisado sin purificar de células NIH 3T3 modificadas genéticamente para observar el background de proteínas. En el gel SDS-PAGE se puede observar una banda tenue correspondiente a una posible proteína biotinilada, de peso molecular aproximado 75 kDa,

específica de las células modificadas genéticamente (figura 15). Por último, se realizó un Western Blot con otro gel idéntico para comprobar que las proteínas purificadas estaban biotiniladas. Los resultados del Western Blot revelan que existen dos proteínas endógenas biotiniladas en las células NIH 3T3 control que se purificaron con beads de estreptavidina, similares a las observadas en las células modificadas genéticamente, sin aparecer en estas últimas bandas adicionales (figura 15). Esto sugiere que el sistema PD-1H/BioID2 no ha encontrado proteínas en la proximidad de PD-1H que hayan podido ser biotiniladas.



**Figura 15.** Gel SDS-PAGE resultado de la electroforesis (arriba) y películas fotográficas resultado del Western Blot (abajo). La flecha roja señala una banda tenue que parece específica de la modificación genética. Al observar las películas, se visualiza que la banda tenue no es específica de la modificación, si no que no se puede apreciar en el gel de acrilamida debido a la poca sensibilidad de la tinción. Además, en una de las películas se puede apreciar la presencia de dos bandas (debido a la cantidad de proteína cargada), lo que indica que la banda de mayor grosor de las condiciones purificadas en realidad se corresponde con dos bandas diferentes. **Lisis WT:** lisado completo de células NIH 3T3 sin ninguna modificación. **Purificado WT:** muestra purificada a partir del lisado de la línea NIH 3T3 sin ninguna modificación. **Lisis Mod.:** lisado completo de células NIH 3T3 que expresan PD-1H/BioID2. **Purificado Mod.:** muestra purificada a partir del lisado de la línea NIH 3T3 que expresa la fusión proteica PD-1H/BioID2.

## 5. Discusión

En la actualidad existen numerosos métodos de estudio de interacciones entre proteínas. Entre otros, podemos destacar algunos como los sistemas de doble híbrido de levaduras, el *phage display*, la purificación por afinidad, los Ensayos de Complementación de Fragmentos proteicos (PCAs) o los microarrays de proteínas (Styren *et al.*, 2012). Sin embargo, una alternativa reciente es el marcaje de proteínas por proximidad. Estas técnicas son una variante de la purificación por afinidad clásica (AP) y dentro de ellas, unas de las más potentes son las técnicas de marcado con biotina como el BioID o el APEX (Trinkle-Mulcahy, 2019). Las ventajas de estas técnicas sobre las técnicas de AP clásicas son su capacidad de detectar interacciones débiles o transitorias, ya que la AP clásica es incapaz de aportar soluciones a estos problemas. Además, el marcaje con biotina permite utilizar la alta afinidad entre la biotina y la estreptavidina para realizar la extracción de las proteínas marcadas (Trinkle-Mulcahy, 2019).

A la hora de realizar un marcaje por proximidad con este tipo de técnicas, es importante resaltar los problemas que poseen el BioID o el APEX (Trinkle-Mulcahy, 2019), que son los efectos negativos que puede provocar la fusión proteica o la sobreexpresión de la proteína de interés y, en segundo lugar, la biotinilación inespecífica de diferentes moléculas por parte de la biotin ligasa libre que se puede generar por rotura o degradación de la fusión proteica.

A la hora de preparar la proteína de fusión recombinante PD-1H/BioID2, es recomendable añadir la biotin ligasa, por un lado, en el extremo C-terminal de la proteína de interés y, por otro, en el extremo N-terminal (Roux *et al.*, 2018). Por otra parte, es importante determinar también la funcionalidad de la proteína de fusión para lo que se requiere un conocimiento en profundidad de la función de la molécula a la que se ha fusionado el BioID (Roux *et al.*, 2018). Otros detalles relevantes son asegurar que la localización de la proteína de fusión es la adecuada y que la expresión de dicha proteína de fusión es estable (Roux *et al.*, 2018). Teniendo todos estos antecedentes en cuenta, se diseñó una fusión de BioID2 en el dominio extracelular de PD-1H, ya que se pretendía detectar interacciones que ocurren en la superficie celular. En cuanto a

la comprobación de la funcionalidad, se conoce que PD-1H es inhibidor de la activación linfocitaria, sin embargo, no está dilucidado el mecanismo por el que VISTA es capaz de ejercer esta función. Por otra parte, al desconocerse el ligando de PD-1H, tampoco se puede asegurar al 100 % que BioID2 sea capaz de cumplir con su función de biotinar moléculas por proximidad. Sin embargo, si se pudo identificar claramente la expresión de la fusión PD-1H/BioID2 en la superficie celular de las células transducidas, por medio de la citometría de flujo, utilizando un anticuerpo dirigido contra VISTA. Como la construcción genética se introdujo en células que no expresan PD-1H de forma natural, todas las moléculas de VISTA expresadas en las células modificadas se corresponderán con la proteína de fusión PD-1H/BioID2. Por último, debido al sistema de transfección de células utilizado y a pruebas posteriores de PCR sobre ADN genómico, se puede asegurar que existió una integración exitosa de la secuencia que codifica para la proteína de fusión PD-1H/BioID2, por lo que cabe esperar que la expresión de la proteína de fusión sea estable en el tiempo. Tanto en las células NIH 3T3 como en las células RAW 267 se pudo demostrar la expresión de la proteína recombinante PD-1H/BioID2 por citometría de flujo y PCR, respectivamente.

En el momento de analizar los resultados de un experimento de marcaje con BioID2, pueden ocurrir que aparezcan proteínas que han sido marcadas por acción del BioID2 o puede que no se marque nada. Por otra parte, es necesario identificar a mayores si las proteínas que han sido biotiniladas son de interés o son simplemente moléculas vecinas. Acorde a los resultados obtenidos en este trabajo, inicialmente se pensó que se había conseguido purificar una proteína específica que había sido marcada por la acción del BioID2, sin embargo, tras la realización de una prueba confirmativa, se observó que dicha proteína también se encontraba en la condición control no modificado genéticamente, por lo que se descartó la posibilidad de que fuera una proteína específica. Se concluyó que se trataba de una proteína endógena que se encuentra biotinilada de forma natural

A pesar de no haberse obtenido resultados positivos concluyentes, no se puede despreciar el potencial que tiene BioID2 para el marcaje de proteínas por proximidad. Por otra parte, en el desarrollo de este trabajo también se logró poner a punto un diseño experimental capaz de aislar moléculas biotiniladas a partir de cultivos celulares. Además, se diseñó un vector viral capaz de inducir la expresión de la fusión PD-1H/BioID2 en todas aquellas células susceptibles de modificación genética por este método. Algunas aplicaciones a futuro de este trabajo son la modificación genética de distintos tipos celulares con el vector para detectar interacciones de

PD-1H en cis o incluso la adaptación del sistema para la identificación de interacciones en configuración trans.

## 6. Conclusiones

Las conclusiones que pueden extraerse de los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Grado son las siguientes:

- Generación exitosa de una construcción genética recombinante de una fusión entre el receptor co-inhibidor PD-1H murino y la biotina ligasa BioID2, así como su transducción en dos tipos celulares distintos.
- Puesta a punto de un protocolo de lisis y purificación de proteínas biotiniladas a partir de cultivos celulares de células eucariotas utilizando beads de estreptavidina.

## 7. Referencias

Azuma, M. y Yagita, H. (2019) *Co-signal Molecules in T Cell activation*. Singapore: Springer Singapore.

Becton, Dickinson and Company (2002) *FlowJo™ Software* (Versión 10.0.7) [Programa de ordenador] Disponible en: <https://www.flowjo.com/solutions/flowjo/downloads> (Accedido: 16 de junio de 2023).

Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G. *et al.* (2000) RCSB PDB. Disponible en: <https://www.rcsb.org/> (Accedido: 15 de abril de 2023).

BioRender (2023) *BioRender*. Disponible en: <https://www.biorender.com> (Accedido: 21 de junio de 2023).

Bonilla, F. A. y Oettgen, H. C. (2010) "Adaptive immunity", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), pp. 33-40.

Corpet, F. (2000) *Multalin*. Disponible en: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> (Accedido: 27 de octubre de 2022).

Cunningham, F., Allen, J. E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J. *et al.* (2022) *Ensembl*. Disponible en: <https://www.ensembl.org/index.html> (Accedido: 22 de septiembre de 2022).

Dotmatics (2012) *SnapGene software* (Versión 6.1) [Programa de ordenador]. Disponible en: <https://www.snapgene.com> (Accedido: 17 de septiembre de 2022).

Han, X., Vesely, M. D., Yang, W., Sanmamed, M. F. *et al.* (2019) "PD-1H (VISTA)-mediated suppression of autoimmunity in systemic and cutaneous lupus erythematosus", *Science Translational Medicine*. doi: 10.1126/scitranslmed.aax1159.

Johnston, R. J., Su, L. J., Pinckney, J., Critton, D. *et al.* (2019) "VISTA is an acidic pH-selective ligand for PSGL-1", *Nature*, 574(7779), pp. 565-570.

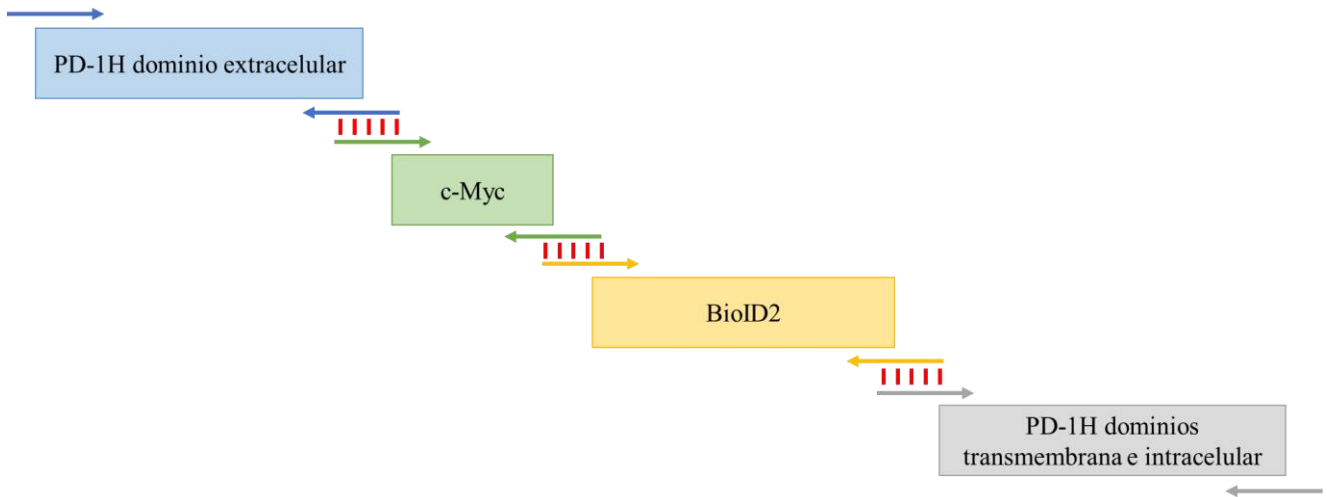
Kim, D. I., Jensen, S. C., Noble, K. A., Kc, B. *et al.* (2016) "An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling", *Molecular Biology of the Cell*, 27(8), pp. 1188-1196.

Liu, H., Li, X., Hu, L., Zhu, M. *et al.* (2018) "A crucial role of the PD-1H coinhibitory receptor in suppressing experimental asthma", *Cellular and Molecular Immunology*, 15(9), pp. 838-845.

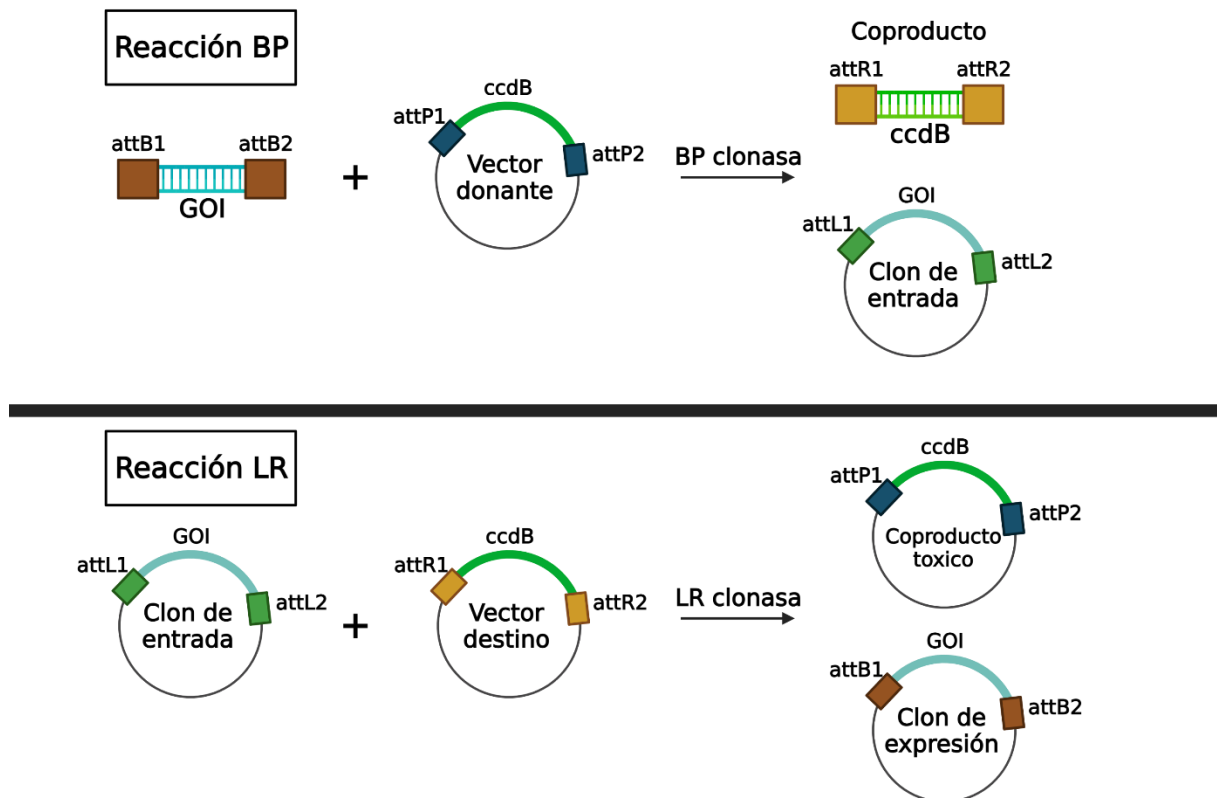


- Mahalingam, S., Peter, J., Xu, Z., Bordoloi, D. *et al.* (2021) "Landscape of humoral immune responses against SARS-CoV-2 in patients with COVID-19 disease and the value of antibody testing", *Heliyon*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06762>
- Mortezaee, K., Majidpoor, J. y Najafi, S. (2022) "VISTA immune regulatory effects in bypassing cancer immunotherapy: Updated", *Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121083>
- Nowak, E. C., Lines, J. L., Varn, F. S., Deng, J. *et al.* (2017) "Immunoregulatory functions of VISTA", *Immunological Reviews*, 276(1), pp. 66-79.
- Parkin, J. y Cohen, B. (2001) "An overview of the immune system", *The Lancet*, 357(9270), pp. 1777-1789.
- Roux, K. J., Kim, D. I., Burke, B. y May, D. G. (2018) "BioID: a screen for protein-protein interactions", *Current Protocols in Protein Science*, 91(1), pp. 1-15.
- Sherwood, E. R., Burelbach, K. R., McBride, M. A., Stothers, C. L. *et al.* (2022) "Innate immune memory and the host response to Infection", *The Journal of Immunology*. 208(4), pp. 785-792.
- Slater, B. T., Han, X., Chen, L. y Xiong, Y. (2020) "Structural insight into T cell coinhibition by PD-1H (VISTA)", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(3), pp. 1648-1657.
- Stynen, B., Tournu, H., Tavernier, J. y Van Dijck, P. (2012) " Diversity in genetic *in vivo* methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), pp. 331-382.
- The UniProt Consortium (2021) *UniProt*. Disponible en: <https://www.uniprot.org> (Accedido: 10 de septiembre de 2022).
- Trinkle-Mulcahy, L. (2019) "Recent advances in proximity-based labeling methods for interactome mapping [version 1; referees: 2 approved]", *F1000Research*. doi:10.12688/f1000research.16903.1.
- Vigo Soto, I. del (2020) *Estudio de las interacciones de PD-1H y sus ligandos en la respuesta inmunitaria murina*. Tesis doctoral. Universidad de León.
- Vincze, T., Posfai, J. y Roberts, R. J. (2003) *NEBcutter*. Disponible en: <https://nc3.neb.com/NEBcutter/prj/> (Accedido: 11 de septiembre de 2022).
- Wang, J., Wu, G., Manick, B., Hernandez, V. *et al.* (2019) "VSIG-3 as a ligand of VISTA inhibits human T-cell function", *Immunology*, 156(1), pp. 74-85.
- Wang, Y., Zhang, H., Liu, C., Wang, Z. *et al.* (2022) "Immune checkpoint modulators in cancer immunotherapy: recent advances and emerging concepts", *Journal of Hematology and Oncology*. doi:10.1186/s13045-022-01325-0.

## Anexo I. Esquemas del funcionamiento de las técnicas de SOEing PCR y Sistema Gateway



**Figura 1.** Esquema del diseño de la SOEing PCR para generar la fusión PD-1H/BioID2 utilizada durante el experimento. Cada cuadrado se corresponde con uno de los fragmentos de ADN que se fusionaron con la PCR. Las flechas se corresponden con los cebadores utilizados durante el proceso, dos para cada fragmento de ADN. Los cebadores presentan unas zonas que solapan con otro cebador, representadas por las rallas rojas



**Figura 2.** Esquema del funcionamiento del sistema Gateway. El GOI se corresponde con la secuencia de ADN de interés (fusión PD-1H/BioID2). El clon de entrada es un vector de paso que se utiliza en la segunda reacción. El clon de expresión es el vector destino en el que se ha introducido el ADN de interés (PD-1H/BioID2) mediante la reacción catalizada por la LR Clonasa.

## Anexo II. Condiciones de las diferentes reacciones realizadas durante los experimentos y protocolos de preparación de los geles de poliacrilamida

**Tabla 1.** PCR de ampliación de PD-1H/BioID a partir de pBABE para su clonaje en pJET

Reactivos (en orden de adición)	Volumen (µL)	Condiciones	
		Temperatura (°C)	Tiempo
Buffer GC	4	98	30 s
dNTPs (10 mM)	0,4	98	95 s
F	1	67,9	25 s
R	1	72	60 s
DMSO	0,6	72	5 min
Phusion (polimerasa)	0,2	4	∞
dH <sub>2</sub> O	12,8		

30 ciclos

**Tabla 2.** PCR de colonia para comprobar la presencia y correcta condición del inserto en las bacterias

Reactivos (en orden de adición)	Volumen (µL)	Condiciones	
		Temperatura (°C)	Tiempo
Buffer Taq	2,5	94	2 min
dNTPs (10 mM)	0,25	94	30 s
F	0,5	59	30 s
R	0,5	72	2 min
Taq (polimerasa)	0,2	72	3 min
dH <sub>2</sub> O	21,05	4	∞

26 ciclos

**Tabla 3.** Reacciones de digestión del pIB-276 (izquierda) y del pJET (derecha) con las enzimas *AgeI* y *EcoRI*

Digestión pIB-276		Digestión pJET	
Reactivos (en orden de adición)	Volumen (µL)	Reactivos (en orden de adición)	Volumen (µL)
Buffer (Orange 10x)	2	Buffer (Orange 10x)	2
pIB-276	2	pJET	4
<i>AgeI</i>	1	<i>AgeI</i>	1
<i>EcoRI</i>	1	<i>EcoRI</i>	1
dH <sub>2</sub> O	14	dH <sub>2</sub> O	12
<b>Condiciones</b>	2 horas a 37°C	<b>Condiciones</b>	2 horas a 37°C

**Tabla 4.** Protocolo de ligación de pJET con el inserto PD-1H/BioID2

Mezcla de ligación	
Reactivos (en orden de adición)	Volumen (µL)
Agua libre de nucleasas	7,5
Buffer Reaction 2x	10
Inserto (PD-1H/BioID2)	1
Vector (pJET)	0.5
T4 DNA ligasa	1
<b>Condiciones</b>	Incubación a 22°C durante 5 minutos en el termociclador

**Tabla 5.** Protocolo de ligación de pIB-437 con el inserto PD-1H/BioID2

<b>Mezcla de ligación</b>	
<b>Reactivos (en orden de adición)</b>	<b>Volumen (μL)</b>
Agua libre de nucleasas	9,7
Buffer T4	2
Inserto (PD-1H/BioID2)	1,8
Vector (pJET)	5,5
T4 DNA ligasa	1
<b>Condiciones</b>	Incubación a 22°C durante 10 minutos en el termociclador

**Tabla 6.** Protocolo de preparación de 5 mL de Resolving Gel al 8% para SDS-PAGE

<b>Reactivos (en orden de adición)</b>	<b>Volumen (mL)</b>
H2O mili Q	2,3
Mix de acrilamida al 30 %	1,3
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3
SDS al 10 %	0,05
Persulfato de amonio al 10 %	0,05
TEMED	0,003

**Tabla 7.** Protocolo de preparación de 2 mL de Stacking Gel al 5% para SDS-PAGE

<b>Reactivos (en orden de adición)</b>	<b>Volumen (mL)</b>
H2O mili Q	1,4
Mix de acrilamida al 30 %	0,33
1,5 M Tris (pH 6,8)	0,25
SDS al 10 %	0,02
Persulfato de amonio al 10 %	0,02
TEMED	0,002

### Anexo III. Protocolo de extracción de ADN

**Tabla 1.** Protocolo adaptado de: Midiprep Invitrogen n° de catálogo: K210005

<b>Paso</b>	<b>Descripción</b>
1°	Equilibrar la columna con 10 mL de Equilibration Buffer (EQ1)
2°	Centrifugar en un tubo de 50 mL de cultivo de bacterias a 4000 rpm durante 10 minutos
3°	Eliminar el sobrenadante del cultivo volcando el tubo
4°	Resuspender el pellet bacteriano en 4 mL de Resuspension Buffer (R4). Importante que la mezcla quede homogénea
5°	Añadir 4 mL de Lysis Buffer (L7) y mezclar suavemente invirtiendo el tubo
6°	Incubar el tubo 5 minutos a temperatura ambiente
7°	Añadir 4 mL de Precipitation Buffer (N3) y mezclar invirtiendo el tubo hasta que la mezcla sea homogénea
8°	Pasar la mezcla del tubo de 50 mL a 10 Eppendorfs y centrifugar a 15000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente
9°	Cargar el sobrenadante con una pipeta a la columna ya equilibrada
10°	Dejar drenar el líquido por acción de la gravedad
11°	Añadir 10 mL de Wash Buffer (W8) para lavar la columna y dejar drenar el líquido por gravedad
12°	Desechar el líquido que atravesó la columna y añadir otros 10 mL de Wash Buffer (W8)
13°	Colocar un nuevo tubo de 50 mL estéril debajo de la columna y añadir 5 mL de Elution Buffer (E4), dejando que el líquido drene por fuerza de la gravedad
14°	Añadir 3,5 mL de isopropanol al tubo de 50 mL (que contendrá el ADN eluido del paso anterior) y mezclar bien
15°	Distribuir la mezcla del tubo de 50 mL en 8 Eppendorfs y centrifugar a 15000 g durante 30 minutos a 4 °C
16°	Eliminar el sobrenadante de los viales aspirando el líquido, dejando solo el pellet
17°	Añadir a cada pellet 375 µL de etanol 70% y centrifugar a 15000g durante 5 minutos a 4 °C
18°	Eliminar el sobrenadante de los tubos, dejando de nuevo solo el pellet
19°	Secar el pellet al aire, en la campana de flujo laminar.
20°	Añadir a cada tubo con el pellet seco 30 µL de agua estéril y dejar los tubos en una nevera a 4 °C hasta el día siguiente
21°	Resuspender el pellet de ADN de cada Eppendorf y juntar el volumen de todos los viales en uno solo.
22°	Medir la concentración de ADN con el Nanodrop
23°	Tomar 2 Eppendorfs y añadir en cada uno 400 µL de medio RPMI. Luego, añadir a uno de ellos 2 µL de ADN
24°	Rotular los tubos y dejarlos en el incubador durante 4 días para comprobar la esterilidad del ADN extraído