



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Área de Inmunología

Dpto. de Sanidad Animal

TESIS DOCTORAL

“Estudio de las interacciones de PD-1H y sus ligandos en la respuesta inmunitaria murina”

Autora: Irene del Vigo Soto

Programa de Doctorado: Biología Molecular y Biotecnología

Directores:

Dr. José Ignacio Rodríguez Barbosa

Dra. María Luisa del Río González

León, 2020



universidad
de león



esDule
Escuela de Doctorado
de la Universidad de León

INFORME DEL TUTOR

El Dr. D. José Ignacio Rodríguez Barbosa como Tutor de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de las interacciones de PD-1H y sus ligandos en la respuesta inmunitaria murina” realizada por Dña. Irene del Vigo Soto en el programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología, regulado por el R.D. 99/2011, de 28 de enero, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a 9 de octubre de 2020



universidad
de león



esDule
Escuela de Doctorado
de la Universidad de León

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El Dr. D. José Ignacio Rodríguez Barbosa y la Dra. Dña. María Luisa del Río González como directores de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de las interacciones de PD-1H y sus ligandos en la respuesta inmunitaria murina” realizada por Dña. Irene del Vígo Soto en el programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, en León a 9 de octubre de 2020

Fdo.
Dr. D. José Ignacio Rodríguez Barbosa

Fdo.
Dra. Dña. María Luisa del Río González



universidad
de león



esDule
Escuela de Doctorado
de la Universidad de León

ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL

La Comisión Académica del programa de doctorado Biología Molecular y Biotecnología en su reunión celebrada el día de de ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de las interacciones de PD-1H y sus ligandos en la respuesta inmunitaria murina”, dirigida por el Dr. D. José Ignacio Rodríguez Barbosa y la Dra. Dña. María Luisa del Río González, elaborada por Dña. Irene del Vigo Soto y cuyo título en inglés es el siguiente “The study of the interactions between PD-1H and their putative ligands in the murine immune response”.

Lo que firmo, en León a de de 2020.

El Secretario,

Fdo.:

Vº Bº

Presidente de la Comisión Académica,

Fdo.:

*“Confía en el tiempo,
que suele dar dulces salidas a muchas amargas dificultades”*

Miguel de Cervantes Saavedra

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, los doctores José Ignacio Rodríguez Barbosa y María Luisa del Río González, quienes además de darme la posibilidad de conocer el mundo de la investigación y sus entresijos, con sus conocimientos y apoyo me han guiado a través de cada una de las etapas de este proyecto. No solo me han brindado su ayuda, sino que también han puesto a mi disposición todos los recursos materiales necesarios para poder realizar esta tesis doctoral, que ha contado con la financiación de proyectos de la Junta de Castilla y León (Referencia LE003U16) y del Fondo de Investigaciones Sanitarias (Referencia PI16/00002).

En segundo lugar, agradecer la Junta de Castilla y León y al Fondo Social Europeo por concederme la beca predoctoral “Ayudas destinadas a financiar la contratación predoctoral de personal investigador cofinanciadas por el Fondo Social Europeo” (Orden de 10 de noviembre de 2016, de la Consejería de Educación, por la que se convocan ayudas destinadas a financiar la contratación predoctoral de personal investigador, cofinanciadas por el Fondo Social Europeo, publicada en el «B.O.C. y L.» n.º 221, de 16 de noviembre), sin la que no hubiese sido posible llevar a cabo este trabajo.

También quiero agradecer el apoyo que me han transmitido todos los compañeros que han pasado por el laboratorio en estos años, con especial mención a Natalia, Andrea, Javier y Rebeca, por la aportación que han hecho a este proyecto a través de su trabajo. Agradecerles a ellos y al resto de personas con las que he tenido el placer de cruzarme durante mi etapa aquí, desde la primera a la última, Samuel, Carolina, Carla, Ana, Álex, Irene, María, Alexia, Vita, Fernando, Natalia, Rebeca, Cristina, Andrea, Marga, Javier, Gonzalo y seguramente me dejé a más de uno, que no me lo tengan en cuenta, muchas gracias a todos por vuestras conversaciones y ánimos que han hecho que esto fuera un poco más fácil.

Por último, quiero agradecer a mi familia y a mi pareja, por apoyarme aun cuando mis ánimos decaían. En especial, a mis padres y a mi hermano, que siempre estuvieron ahí para darme palabras de apoyo y un abrazo reconfortante para renovar energías.

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE

Tabla de contenidos

Lista de abreviaturas.....	VII
Índice de figuras.....	XI
Índice de tablas	XV
Resumen.....	1
Abstract.....	3
1 Introducción	7
1.1 El paradigma de las cuatro señales que regula la activación, expansión clonal y diferenciación de las células T naive a células T efectoras	8
1.2 Superfamilia de las inmunoglobulinas	13
1.2.1 Los receptores coestimuladores y coinhibidores de la familia B7-CD28	15
1.2.2 Los receptores coinhibidores	17
1.2.3 El receptor coinhibidor PD-1H (<i>Programmed death-1 homologue</i>)	25
1.3 Ligandos de PD-1H en la especie humana: VSIG3, VSIG8 y PSGL-1.	36
1.4 Efecto antitumoral del bloqueo de receptores coinhibidores en la clínica.....	39
1.4.1 Mecanismos de evasión tumoral.....	39
1.4.2 Los receptores coinhibidores de interés terapéutico	40
2 Hipótesis de trabajo y objetivos	47
3 Materiales y métodos.....	51
3.1 Biología molecular	51
3.1.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	51
3.1.2 Estrategia experimental para el clonaje de genes de interés	51
3.1.3 Plásmidos	54
3.1.4 Extracción de plásmidos.....	59
3.1.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	59
3.1.6 Digestión con enzimas de restricción	66
3.1.7 Electroforesis en gel de agarosa.....	66
3.1.8 Purificación de bandas de ADN en gel de agarosa.....	67
3.1.9 Ligación	67
3.1.10 Transformación bacteriana mediante choque térmico	68
3.1.11 Secuenciación.....	68
3.2 Cultivos celulares	69

3.2.1	Reactivos y medios de cultivo	69
3.2.2	Líneas celulares y condiciones de crecimiento.....	69
3.2.3	Congelación y descongelación	70
3.2.4	Recuento de células.....	70
3.2.5	Expresión en células eucariotas de los genes de interés.....	71
3.2.6	Generación de líneas celulares	73
3.2.7	Aislamiento de células hematopoyéticas.....	75
3.2.8	Aislamiento de macrófagos peritoneales de ratones Balb/c.....	75
3.2.9	Protocolo de activación celular	76
3.2.10	Citometría de flujo	76
3.2.11	Microscopía.....	78
3.3	Producción de proteína recombinante soluble	78
3.3.1	Detección de proteína recombinante mediante ELISA	78
3.3.2	Purificación de proteínas recombinantes solubles	81
3.3.3	Análisis de las proteínas recombinantes por electroforesis en geles de acrilamida.....	83
4	Resultados	89
4.1	Patrón de expresión de PD-1H en células hematopoyéticas y linfoides en condiciones homeostáticas y tras la activación con estímulos policlonales	89
4.2	Expresión de PD-1H en líneas celulares de macrófagos murinos.....	92
4.3	La proteína soluble mVSIG3.Ig no muestra afinidad detectable por mPD-1H de membrana en citometría de flujo	94
4.3.1	Estrategia de clonaje y expresión de la proteína mPD-1H de membrana.....	94
4.3.2	Estrategia de clonaje y expresión de la proteína recombinante soluble mVSIG3(ECD).mIgG2a (mVSIG3.Ig)	95
4.3.3	Generación de la línea celular de expresión estable de la proteína recombinante soluble mVSIG3.Ig.....	96
4.3.4	Determinación de la interacción entre mVSIG3.Ig y PD-1H de membrana por citometría de flujo	97
4.4	Las proteínas solubles mVSIG8.Ig (transcritos 1 y 2) no muestran afinidad detectable por mPD-1H de membrana en citometría de flujo	98
4.4.1	Estrategia de clonaje y expresión de la proteína recombinante soluble mVSIG8 región extracelular (transcritos 1 y 2).mIgG2a (mVSIG8.Ig)	98
4.4.2	Ausencia de afinidad de unión entre mVSIG8.Ig (T1 y T2) y PD-1H de membrana por citometría de flujo.....	100
4.5	La proteína soluble mPSGL-1.Ig no muestra afinidad detectable por mPD-1H de membrana en citometría de flujo	101

4.5.1	Estrategia de clonaje y expresión de la proteína recombinante soluble mPSGL-1	101
4.5.2	Determinación de la interacción entre mPSGL-1 y mPD-1H de membrana por citometría de flujo	102
4.6	Las proteínas recombinantes solubles mVSIG3.Ig y mVSIG8.Ig (transcritos 1 y 2) no muestran afinidad específica por mPD-1H de membrana a pH ácido en citometría de flujo.....	104
4.7	Las proteínas recombinantes solubles mPD-1H.IgG2a, Flag.mPD-1H.AviTag y mPD-1H.COMP no muestran afinidad detectable por mVSIG3 de membrana en citometría de flujo	106
4.7.1	Estrategia de clonaje y expresión de la proteína mVSIG3 de membrana ...	106
4.7.2	Estrategia de clonaje y expresión de las proteínas recombinantes solubles mPD-1H.mIgG2a (mPD-1H.Ig), Flag.mPD-1H.AviTag y mPD-1H.COMP.....	107
4.7.3	Las proteínas recombinantes solubles Flag.mPD-1H.AviTag y mPD-1H.COMP inhiben la unión del anticuerpo comercial anti-mPD-1H-PE a células transducidas con mPD-1H	111
4.7.4	Generación de línea celular de expresión estable de la proteína recombinante soluble mPD-1H.Ig.....	114
4.7.5	Determinación de la interacción de mPD-1H.Ig y mPD-1H.COMP a mVSIG3 de membrana por citometría de flujo.....	114
4.8	Las proteínas recombinantes solubles mPD-1H.IgG2a y mPD-1H.COMP no muestran afinidad detectable por mPSGL-1 de membrana en citometría de flujo.....	115
4.9	Las proteínas recombinantes solubles Flag.mPD-1H.AviTag y mPD-1H.COMP no interactúan en ELISA con los ortólogos murinos de los posibles ligandos de PD-1H humano.....	117
4.10	La proteína soluble Flag.mPD-1H-bio detecta la expresión del ligando en linfocitos T CD4.....	119
5	Discusión	125
5.1	Relevancia biológica y clínica de los <i>immune checkpoints</i>	125
5.2	PD-1H, un <i>immune checkpoint</i> con características únicas	128
5.3	Oligomerización y conformación de las proteínas de fusión de PD-1H	130
5.4	Posibles ligandos de PD-1H: VSIG3, VSIG8 y PSGL-1	131
5.5	Influencia del patrón de glicosilación en la interacción entre proteínas	135
5.6	Perspectivas futuras	136
6	Conclusiones	141

7 Referencias	145
Anexo I. Confirmación y validación de secuencias.....	159
Anexo II. Rendimiento de la producción de proteínas solubles en células HEK293T	183

Lista de abreviaturas

ACK	Amonio-cloruro-potasio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AICD	Activación de muerte celular inducida
AP-1	Proteína activadora-1, <i>Activator Protein 1</i>
APC	Aloficocianina
APC	Célula presentadora de antígeno, <i>Antigen Presenting Cell</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	Colección americana de cultivos tipo, <i>American Type Culture Collection</i>
BAFT	Factor de transcripción de leucina básico, <i>Basic Leucine zipper Transcription Factor</i>
BSA	Albúmina sérica bovina, <i>Bovine Serum Albumin</i>
CDR3	Región determinante de complementariedad 3, <i>Complementarity-Determining Región 3</i>
CD40L	CD40 ligando
CDS	Secuencia codificante, <i>Coding Sequence</i>
COMP	<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>
ConA	Concanavalina A
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4</i>
CTLs	Linfocitos T citotóxicos, <i>Cytotoxic T Lymphocytes</i>
DC	Célula dendrítica, <i>Dendritic Cell</i>
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatos, <i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
ECD	Dominio extracelular, <i>Extracellular Domain</i>
eGFP	Proteína verde fluorescente, <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
F	<i>Forward</i>
FBS	Suero fetal bovino, <i>Fetal Bovine Serum</i>
Fc	Fracción cristalizable del anticuerpo
FDA	Agencia de Medicamentos y Alimentación, <i>Food and Drug Administration</i>
FGL-1	<i>Fibrinogen-like protein 1</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, <i>Fluorescein IsoTioCyanate</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
Gal-3	Galectina 3
Grb2	Proteína unida al receptor del factor de crecimiento 2, <i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GvHD	Enfermedad injerto contra huésped, <i>Graft-versus-host disease</i>
HIF	Factor inducible por hipoxia, <i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HGMB1	<i>Highb mobility group protein B1</i>
HVEM	Mediador de la entrada de herpesvirus en la célula, <i>Herpesvirus Entry Mediator</i>
IC	Dominio intracelular, <i>intracellular domain</i>
ICOS	Coestimulador inducible de células T, <i>Inducible T Cell Costimulator</i>
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
IFN-γ	Interferón- γ
Ig	Inmunoglobulina
IgSF	Superfamilia de las Inmunoglobulinas, <i>Immunoglobulin Superfamily</i>
IgC	Dominio inmunoglobulina constante
IgV	Dominio inmunoglobulina variable

IL	Interleucina
IL-2R	Receptor IL-2
IP	Ioduro de propidio
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
ITAM	Motivo de activación de inmunoreceptor basado en tirosina, <i>Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif</i>
ITIM	Motivo inhibidor de inmunoreceptor basado en tirosina, <i>Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motif</i>
ITSM	Motivo de cambio de inmunoreceptor basado en tirosina, <i>Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif</i>
ITT	<i>Immunoglobulin Tail Tyrosine</i>
LAG-3	Gen de activación de linfocitos tipo-3, <i>Lymphocyte-Activation Gene 3</i>
LAT	<i>Linker</i> de activación en las células T
LB	Luria y Bertani
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LSEctin	<i>Liver sinusoidal endothelial cell lectin</i>
LTRs	Secuencias largas terminales repetidas, <i>Long Terminal Repeats</i>
MΦ	Macrófago
mAb	Anticuerpo monoclonal, <i>Monoclonal Antibody</i>
MCS	Sitio de clonación múltiple, <i>Multiple Cloning Site</i>
MDSC	Célula supresora derivada de células mieloides, <i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i>
MFI	Intensidad media de fluorescencia, <i>Median Fluorescence Intensity</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad, <i>Major Histocompatibility Complex</i>
MTA	Acuerdo de Transferencia de Material, <i>Material Transfer Agreement</i>
NF-κB	Factor de transcripción nuclear <i>kappa B</i>
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NKT	Células T con marcadores NK
NOD	Ratón diabético no obeso, <i>Non-obese diabetic</i>
ORF	Marco abierto de lectura, <i>Open Reading Frame</i>
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos, <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino, <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD-1	Receptor de muerte celular programada 1, <i>Programmed Death-1</i>
PD-1H	PD-1 homólogo
PD-L1	Ligando 1 de PD-1
PD-L2	Ligando 2 de PD-1
PE	Ficoeritrina, <i>Phycoerythrin</i>
PerCP	Peridina-clorofila-proteína
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa, <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
PKC	Proteína quinasa C, <i>Protein Kinase C</i>
pp.	Páginas
PURO	Puromicina
PVR	Receptor de poliovirus, <i>Poliovirus Receptor</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Temperatura ambiente, <i>Room Temperature</i>
SA-BV421	Estreptavidina-violeta brillante 421

SA-PE	Estreptavidina-ficoeritrina
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SHIP	SH2 inositol fosfatasa, <i>SH2 inositol phosphatase</i>
SHP-1/2	Fosfatasa 1 y 2 con dominio homólogo Src
SPR	Resonancia de plasmón de superficie, <i>Surface Plasmon Resonance</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
T7/EI	T7 endonucleasa I
TB	<i>Terrific Broth</i>
TBE	Tampón Tris-Borato EDTA
TCD-BM	Médula ósea con depleción de células T, <i>T Cell – Depleted Bone Marrow</i>
TCR	Receptor de células T, <i>T Cell Receptor</i>
Teff	Célula T efectora
TGF-β	Factor de crecimiento transformador-beta, <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Th	Célula T <i>helper</i>
TIGIT	Inmunoglobulina de células T y dominio ITIM, <i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
TILs	Linfocitos infiltrantes de tumor, <i>Tumor-Infiltrating Lymphocytes</i>
TIM-3	Inmunoglobulina de células T tipo-3, <i>T-Cell Immunoglobulin Mucin-3</i>
Tm	Célula T de memoria
TM	Dominio transmembrana, <i>Transmembrane domain</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral, <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFR	Receptor del TNF, <i>TNF Receptor</i>
TNFRSF	Superfamilia del TNFR, <i>TNFR Superfamily</i>
TNFSF	Superfamilia del TNF, <i>TNF Superfamily</i>
TRAF	Factor asociado al receptor TNF, <i>TNFR Associated Factor</i>
Treg	Célula T reguladora
UI	Unidad de actividad enzimática
UTR	Región no traducida, <i>Untranslated Region</i>
VISTA	<i>V-domain Ig Suppressor of T cell Activation</i>
VSIG	<i>V-Set And Immunoglobulin Domain Containing</i>
VSV-G	Glicoproteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular G
WT	Tipo natural, <i>Wild-Type</i>

Índice de figuras

Figura 1. Modelo de las cuatro señales que regula la activación de las células T.....	9
Figura 2. Activación e inhibición de las células T	10
Figura 3. Principales mecanismos empleados por los receptores coinhibidores para regular la señalización de las células T	11
Figura 4. Representación esquemática de los dominios Ig de tipo C1, C2 y V.	13
Figura 5. Regulación de la activación de las células T por CD28	16
Figura 6. Descripción general de las vías coinhibidoras.....	18
Figura 7. Regulación de la activación de las células T a través de los mecanismos intrínsecos de CTLA-4.....	19
Figura 8. Regulación de la activación de las células T a través de los mecanismos extrínsecos de CTLA-4.....	20
Figura 9. Mecanismo general de coinhibición mediado por PD-1	22
Figura 10. Organización genómica, secuencia y alineamiento de PD-1H.	27
Figura 11. Modelo de la estructura de PD-1H.	28
Figura 12. Función como ligando/receptor de PD-1H en la regulación de la activación de las células T.....	29
Figura 13. Modelo hipotético de actuación de PD-1H.	34
Figura 14. Función de la proteína PD-1H.....	36
Figura 15. Alineamiento de las regiones extracelulares de las proteínas humana (superior) y murina (inferior) de VSIG3	38
Figura 16. Alineamiento de las regiones extracelulares de las proteínas humana (superior) y murina (inferior) de VSIG8.....	38
Figura 17. Alineamiento de las regiones extracelulares de las proteínas humana (superior) y murina (inferior) de PSGL-1	39
Figura 18. Estrategia general seguida para el clonaje de genes de interés.....	52
Figura 19. Estrategia de clonaje	53
Figura 20. Vector plasmídico comercial pJET 1.2/blunt.....	55
Figura 21. Plásmido pMIG-IRES-GFP.....	55
Figura 22. Plásmido pIB351	56
Figura 23. Plásmido MSCV-pgk-Puro	56
Figura 24. pSecTag2-mIgG2a.Fc-WT-HygroB	57
Figura 25. Plásmido pIB363	57
Figura 26. Plásmido pIB319a	58
Figura 27. Plásmido pIB313.2.....	58
Figura 28. Plásmido pIB354.....	59
Figura 29. Transfección mediante lipofección.....	71
Figura 30. Procedimiento general de transducción con vectores retrovirales ecotrópicos..	72
Figura 31. Secuencia de pasos del ELISA sándwich.....	79
Figura 32. Curva patrón ELISA sándwich mTL1a.Ig	80
Figura 33. Estrategia general para la purificación de proteínas marcadas con tags, basado en la cromatografía de afinidad	82
Figura 34. Patrones de expresión de PD-1H en células hematopoyéticas de ratones Balb/c	91
Figura 35. Aumento de la expresión de mPD-1H tras dos horas en cultivo.	92

Figura 36. Expresión de PD-1H en células mieloides CD11b de la cavidad peritoneal de ratones Balb/c.....	93
Figura 37. Expresión de mPD-1H en las líneas de macrófagos J774A1 y RAW264.7.....	94
Figura 38. Detección de la proteína de membrana recombinante mPD-1H en la línea celular transducida NIH-3T3.....	95
Figura 39. Comprobación de la proteína soluble mVSIG3.Ig.....	96
Figura 40. Detección de la proteína recombinante soluble mVSIG3.Ig.....	97
Figura 41. mVSIG3.Ig soluble no muestra afinidad de unión por PD-1H murino de membrana.....	98
Figura 42. Comprobación de la producción de VSIG8.Ig transcrito 1.....	99
Figura 43. Electroforesis SDS-PAGE e <i>immunoblot</i> de mVSIG8.Ig T2.....	100
Figura 44. Ausencia de interacción detectable entre las proteínas recombinantes de VSIG8.Ig (transcritos 1, T1, y 2, T2) y mPD-1H de membrana en citometría de flujo.....	101
Figura 45. Electroforesis SDS-PAGE e <i>immunoblot</i> de mPSGL-1.Ig.....	102
Figura 46. Interacción no detectable entre las proteínas recombinantes PSGL-1.Ig y mPD-1H de membrana en citometría de flujo.....	103
Figura 47. Interacción no detectable entre las proteínas solubles mVSIG3.Ig y mVSIG8.Ig (transcritos 1 y 2) y la proteína de membrana mPD-1H a diferentes puntos de pH.....	105
Figura 48. Expresión de la construcción genética Flag.VSIG3-IRES-GFP como proteína de fusión de membrana en la línea celular NIH-3T3.....	107
Figura 49. Detección de la proteína soluble mPD-1H.Ig mediante ELISA sándwich.....	108
Figura 50. Electroforesis SDS-PAGE 12% e <i>immunoblot</i> de los tres formatos de proteína recombinante de mPD-1H.....	110
Figura 51. La proteína Flag.mPD-1H.AviTag-bio se biotinila correctamente por la proteína BirA ligasa.....	111
Figura 52. La proteína recombinante soluble mPD-1H.Ig inhibe parcialmente la unión del anticuerpo anti mPD-1H -PE (clon MIH64).....	112
Figura 53. Las proteínas recombinantes solubles Flag.mPD-1H.AviTag y mPD-1H.COMP inhiben la unión del anticuerpo anti-mPD-1H-PE (clon MIH64).....	113
Figura 54. Detección de la proteína recombinante soluble mPD-1H.Ig.....	114
Figura 55. Las distintas variantes recombinantes de mPD-1H soluble no aumentan la afinidad de unión detectable por mVSIG3 de membrana en citometría de flujo.....	115
Figura 56. Interacción inespecífica entre las proteínas solubles de mPD-1H y la proteína de membrana mPSGL-1.....	117
Figura 57. Comprobación de la producción de TIGIT.Ig.....	118
Figura 58. No se detecta interacción entre las proteínas solubles de PD-1H y sus posibles ligandos por ELISA.....	119
Figura 59. Unión de la proteína Flag.mPD-1H.AviTag a células T CD4, CD8, B220 y CD11b de ratones Balb/c (A) y B6 (B).....	120
Figura 60. La unión de proteína Flag.mPD-1H.AviTag a células T CD4 no aumenta con la activación.....	121
Figura 61. Unión no detectable de la proteína Flag.mPD-1H.AviTag a timocitos.....	122
Figura 62. Ausencia de unión detectable de la proteína Flag.mPD-1H.AviTag-bio a la línea celular EL-4 que no expresa PD-1H.....	122
Figura I. Clonaje del gen codificante de la proteína de membrana PD-1H.....	161
Figura II. Clonaje del gen codificante de la proteína soluble mVSIG3.Ig.....	164
Figura III. Clonaje del gen codificante de la proteína soluble mVSIG8.Ig T1.....	167

Figura IV. Clonaje del gen codificante de la proteína soluble mPSGL-1.Ig	170
Figura V. Clonaje de la secuencia codificante de la proteína de membrana mVSIG3	173
Figura VI. Clonaje del gen codificante para la proteína soluble PD-1H.Ig.....	175
Figura VII. Clonaje del gen codificante de la proteína soluble mPD-1H.COMP.....	178
Figura VIII. Clonaje del gen codificante de la proteína VSIG8 de membrana	181

Índice de tablas

Tabla 1. Familias de moléculas coestimuladoras y coinhibidoras de la IgSF.	14
Tabla 2. PD-1H actúa como coinhibidor de la respuesta inmunitaria mediada por células T	26
Tabla 3. Comparación de la expresión de PD-1H en diferentes tipos celulares humanos y murinos.....	30
Tabla 4. Influencia de PD-1H en diferentes modelos murinos de enfermedad.....	32
Tabla 5. Anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA en el mercado.....	40
Tabla 6. Cepa bacteriana y medios de cultivo empleados.....	51
Tabla 7. Plásmidos utilizados con su procedencia y descripción de sus elementos característicos.....	54
Tabla 8. Cantidades de reactivos necesarias por reacción de PCR.....	60
Tabla 9. Resumen de las proteínas recombinantes generadas.....	61
Tabla 10. Condiciones particulares para cada reacción de PCR: construcción, cebadores y temperaturas de fusión e hibridación.....	62
Tabla 11. Condiciones generales de PCR.....	66
Tabla 12. Descripción de las reacciones de digestión realizadas.....	66
Tabla 13. Relación de reactivos para la preparación de geles de agarosa al 1,2%.	67
Tabla 14. Relación de reactivos para las reacciones de ligación.....	68
Tabla 15. Medios utilizados y composición.	69
Tabla 16. Relación de líneas celulares utilizadas.....	70
Tabla 17. Protocolos de congelación y descongelación de viales.	70
Tabla 18. Protocolo de transfección (izquierda) y transducción (derecha) de células adherentes.	73
Tabla 19. Líneas celulares generadas en el laboratorio.....	74
Tabla 20. Protocolos de activación celular.....	76
Tabla 21. Anticuerpos empleados para la tinción de las distintas células.....	77
Tabla 22. Protocolo ELISA sandwich para sobrenadantes.....	79
Tabla 23. Anticuerpos de captura y detección utilizados.....	80
Tabla 24. Reactivos requeridos para el ensayo ELISA sándwich.....	80
Tabla 25. Protocolo para la purificación de proteínas a través de cromatografía de afinidad proteína G.....	82
Tabla 26. Reactivos para la purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad.....	83
Tabla 27. Relación de reactivos necesarios para la preparación de geles SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) al 8%.....	84
Tabla 28. Protocolo y reactivos necesarios para la tinción y decoloración de geles de poliacrilamida.....	85
Tabla 29. Reactivos necesarios para la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes.....	85
Tabla 30. Reactivos requeridos para el <i>immunoblot</i>	86
Tabla 31. Estimación de la concentración de proteína mPD-1H.Ig obtenida en los sobrenadantes tras la transfección.....	109
Tabla 32. Rendimiento de producción de proteínas recombinantes solubles.....	183

Resumen

PD-1H (*Programmed death 1-homologue*), también conocido como VISTA, es un receptor de membrana coinhibidor perteneciente a la Superfamilia de las Inmunoglobulinas. Presenta un patrón de expresión restringido a células de origen hematopoyético (principalmente linfocitos T, NKT y células de estirpe mieloide) y sus características estructurales únicas, lo diferencian de otros receptores coinhibidores de la familia B7. Los mecanismos a través de los cuales estos receptores llevan a cabo su función moduladora de la respuesta inmunitaria y la fase de la respuesta en la que actúan, difiere de unos a otros, aunque la mayoría se caracterizan por atenuar la primera señal de activación a través del receptor de la célula T (TCR).

En este trabajo, hemos clonado y expresado como proteínas recombinantes solubles los posibles ligandos del receptor PD-1H murino de membrana, siguiendo la estela marcada por las proteínas identificadas en la especie humana. Además, generamos tres variantes recombinantes solubles de PD-1H con diferentes grados de oligomerización que nos permitiesen incrementar la avidéz de PD-1H por sus ligandos para así estudiar y poder visualizar *in vitro* las interacciones ligando/receptor.

El fin último de este trabajo fue establecer las bases moleculares de las interacciones de PD-1H con sus ligandos que permitiesen, en un futuro, el desarrollo de un modelo preclínico experimental capaz de evaluar los efectos del bloqueo de la vía de señalización mediada por PD-1H en la modulación de la respuesta inmunitaria y, así, poder explotar su potencial como diana terapéutica.

Los resultados obtenidos con el abordaje experimental planteado, nos han permitido concluir que las interacciones observadas en la especie humana entre PD-1H y sus posibles ligandos, no son reproducibles en la especie murina en la técnica de citometría de flujo o ELISA debido a que la afinidad de estas interacciones puede que se encuentre por debajo del límite de detección de la técnica empleada. Además, identificamos que un posible ligando de mPD-1H podría expresarse en células T CD4 maduras.

Abstract

PD-1H (Programmed death 1-homologue), also known as VISTA, is a co-inhibitory membrane-bound receptor belonging to the Immunoglobulin Superfamily. It presents an expression pattern restricted to cells of hematopoietic origin (mainly T lymphocytes, NKT cells and myeloid-derived cells) and its unique structural characteristics differentiate it from other co-inhibitory receptors of the B7 family. The mechanisms through which these receptors carry out their modulatory function of the immune response and the phase of the response in which they act differs from each other, although most share the common feature of attenuating the first activation signal delivered to T cells through the T cell receptor (TCR).

In this work, we have cloned and expressed as soluble recombinant proteins the putative ligands of the murine PD-1H membrane-bound receptor, following the trail marked by the proteins identified in the human species. In addition, we generated three soluble recombinant variants of PD-1H with different degrees of oligomerization to increase the binding avidity of PD-1H for its ligands in order to visualize ligand/receptor interactions *in vitro*.

The main goal of this work was to establish the molecular bases of the interactions of PD-1H with its putative ligands. In the future, this approach would allow the development of an experimental preclinical mouse model capable to assess the effects of blocking the PD-1H-mediated signaling pathway in the modulation of the immune response and thereby be able to exploit its potential as a therapeutic target.

The results obtained with the proposed experimental approach have allowed us to conclude that the interactions observed in the human species between PD-1H and its putative ligands are not reproducible in the murine species in flow cytometry or ELISA. Alternatively, the affinity of these interactions might be below the detection limit of these techniques. Furthermore, we identified a putative mPD-1H ligand expressed in mature CD4 T cells.

INTRODUCCIÓN

1 Introducción

El sistema inmunitario es un conjunto de moléculas, células y tejidos que, mediante complejas interacciones, lleva a cabo la llamada vigilancia inmunológica que consiste en patrullar los tejidos a través del sistema circulatorio y linfático para detectar alteraciones de la homeostasis normal. De esta manera, detecta y reacciona frente a todos aquellos elementos, tanto exógenos como endógenos, que puedan resultar dañinos para el organismo, evitando producir daño a lo propio. Para el correcto desempeño de sus funciones, es crítico que se regule tanto la intensidad como la duración de la respuesta inmunitaria con el objetivo que ésta no sea excesiva y, evitar, por tanto, el daño tisular. En este sentido, son especialmente importantes una serie de moléculas que actúan como puntos de control del sistema inmunitario, denominadas *immune checkpoints*, encargándose de regular las funciones de las células T.

En los últimos años, estos *immune checkpoints* se han convertido en el objetivo de la terapia inmunitaria antitumoral. El uso de inhibidores de estas moléculas se ha revelado como una de las terapias más prometedoras de la última década, llegando a su punto álgido con la concesión del Premio Nobel de Medicina en 2018 a los doctores James P. Allison y Tasuku Honjo, por sus trabajos con los receptores coinhibidores CTLA-4 y PD-1, respectivamente. No obstante, si bien estas terapias mejoran o complementan las existentes, no están exentas de provocar reacciones adversas y la no respuesta esperada en algunos pacientes o resistencias hacia las mismas. Por esta razón, se hace esencial continuar con el estudio y descubrimiento de nuevos *immune checkpoints* o combinaciones de los ya existentes que permitan seguir mejorando los tratamientos en el futuro. Para ello, es imprescindible el desarrollo preclínico de modelos experimentales, que permitan evaluar los efectos y la utilidad de estas moléculas como dianas terapéuticas para la modulación de la respuesta inmunitaria. Para poder recoger toda la información posible y poder llevar a cabo esta tarea, se hace necesario la identificación tanto de los *immune checkpoints* como de sus ligandos. Con este objetivo y siguiendo los avances de caracterización de los ligandos de PD-1H en la especie humana, hemos estudiado si este tipo de interacción se reproducía de igual manera en la especie murina.

Los esfuerzos por encontrar nuevos *immune checkpoints* con posibilidad de traslación a la clínica, se han orientado siguiendo los resultados obtenidos al interrumpir la señalización mediada por PD-1/PD-L1 y CTLA4. Para salvar las resistencias que se están encontrando al

uso de estas moléculas como dianas en la terapia inmunitaria antitumoral, han surgido nuevas dianas terapéuticas como PD-1H. En este trabajo, nos hemos centrado en el estudio del receptor PD-1H para tratar de identificar sus posibles funciones en la especie murina, con el fin de establecer un modelo preclínico murino capaz de dar respuestas a la clínica y potenciar las terapias antitumorales existentes.

1.1 El paradigma de las cuatro señales que regula la activación, expansión clonal y diferenciación de las células T naive a células T efectoras

El sistema inmunitario está constituido por un entramado de células y tejidos que, actuando de manera coordinada son capaces de mantener la homeostasis normal del medio interno y de proteger nuestro organismo frente a posibles amenazas de naturaleza infecciosa que puedan ser dañinas^{1,2}. Las células T y las células B, a través de la inmunidad celular e inmunidad humoral, junto con la inmunidad innata, son los principales componentes del sistema inmunitario para llevar a cabo estas respuestas de modo eficaz³.

La inmunidad innata detecta las primeras señales de alarma y sirve de elemento de contención en las primeras etapas de la infección. Posteriormente, avisa y prepara la respuesta inmunitaria adaptativa elaborada a medida del patógeno. La activación de las células T, comienza con la estimulación de éstas a través del reconocimiento, por parte de sus receptores (TCRs), de péptidos procesados por las células presentadoras de antígenos (APC) y presentados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). A diferencia de las células T, las células B no necesitan que los antígenos sean procesados para identificarlos, ya que reconocen epítomos conformacionales hidrofílicos, que dependen de la estructura conformacional nativa de la molécula. Esta fase de reconocimiento inicial de las células T, se conoce como la primera señal o señal de activación, según el paradigma de las cuatro señales⁴⁻⁶. La segunda señal, es proporcionada por las moléculas coestimuladoras y, va a determinar la magnitud y la calidad de la respuesta. El proceso de coestimulación, es un fenómeno que juega un papel esencial, promoviendo la inmunidad protectora y evitando la autoinmunidad. La interacción entre los pares ligando/receptor expresados en la superficie de las APCs y de las células T, respectivamente, va a inducir la entrada en ciclo y la liberación de citoquinas que constituyen la tercera señal necesaria para la activación óptima de las células T^{4,7}. La presentación antigénica a las células T en ausencia de coestimulación y/o en presencia de señales coinhibidoras, induce una situación de anergia, en la que no habría respuesta por

parte de las células T frente al antígeno⁸⁻¹⁰. La función de las citoquinas liberadas, como la interleucina 2 (IL-2) que actúa de manera autocrina sobre el receptor IL-2R de alta afinidad, induce o promueve el proceso de expansión clonal y diferenciación de las células T⁵. Actualmente, se acepta que la regulación de la supervivencia y diferenciación de las células T, estaría mediada por los ligandos y receptores de la superfamilia del TNF/TNFR, como la

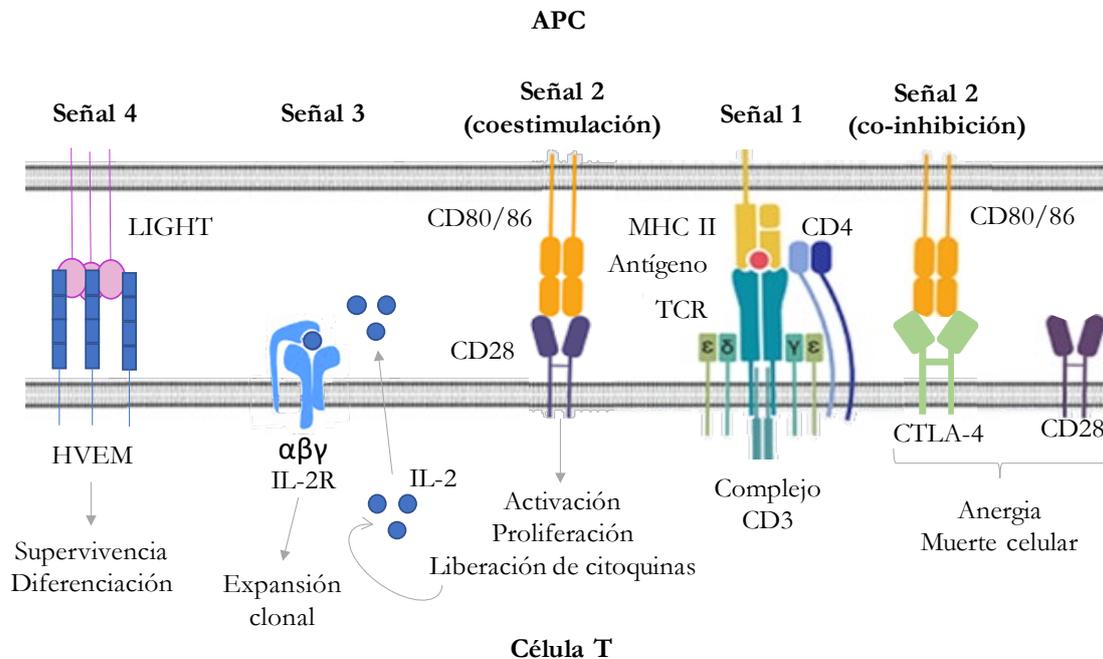


Figura 1. Modelo de las cuatro señales que regula la activación de las células T. La activación óptima de las células T requiere de cuatro señales, siendo el reconocimiento del complejo TCR/CD3 de las células T de un péptido específico unido al MHC de una APC la señal 1. La señal 2, se proporciona mediante la coestimulación mediada por CD28-CD80/86, que induce la liberación de citoquinas, como la IL-2, que conformaría la señal 3. En el caso de que la señal 1 no vaya acompañada de coestimulación, o que la señal 2 fuera coinhibidora, las células T se convierten en funcionalmente inactivas o incapaces de responder al antígeno (anergia). Una vez inducida la expansión clonal, tras la señal 3, la interacción de los receptores de la superfamilia del TNF (TNFRSF) expresados en las células T activadas con sus respectivos ligandos, estimulan la supervivencia y diferenciación de las mismas a células T efectoras (Teff) y células T de memoria (Tm). Adaptado de Azuma (2019)¹¹.

cuarta señal en el paradigma de la activación y diferenciación de las células T (**Figura 1**)¹¹.

La respuesta inmunitaria está regulada por señales positivas y negativas, desde que se inicia hasta que cesa el estímulo que la ha originado y, es necesario, modular la respuesta durante su desarrollo para evitar el daño tisular colateral y facilitar el retorno de la homeostasis¹². Una vez cumplida su función, la mayoría de las células T activadas van a morir por apoptosis, fenómeno que se conoce como *activation induced cell death* (AICD), a excepción de una pequeña población que se diferencia a células T de memoria. Estas células, sobreviven durante períodos prolongados en un estado de reposo y serán las responsables de conseguir una respuesta inmunitaria más intensa y rápida, tras una nueva exposición al mismo

antígeno^{11,13}. En el proceso de contracción de la respuesta inmunitaria, gana peso el fenómeno de regulación negativa de las células T, que se conoce como cohibición⁸. En este caso, serán los receptores cohibidores presentes en la superficie de las células T, los que modulen y restauren la respuesta a su situación basal (**Figura 2**)⁶.

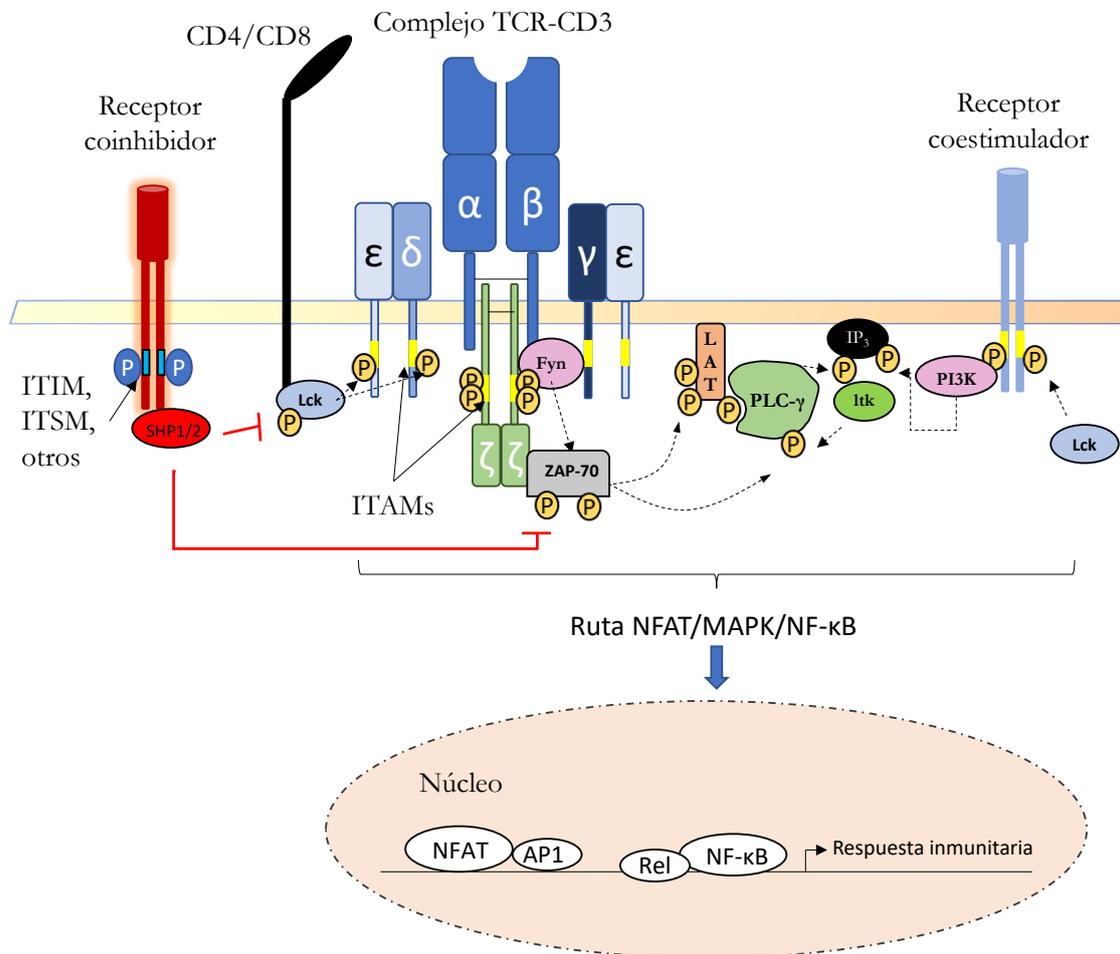


Figura 2. Activación e inhibición de las células T. Modelo simplificado de los eventos de señalización acoplados al TCR. Las interacciones entre el TCR y el péptido-MHC dan como resultado la activación de las quinasas Lck y Fyn, miembros de la familia Src, que fosforilan los residuos de dos tirosinas dentro de los ITAM de las cadenas ζ del CD3. Esto permite que ZAP-70, una tirosina quinasa, se reclute y sea fosforilada por Lck para su activación. Lck, también va a fosforilar los residuos de tirosina de los motivos de activación de los receptores coestimuladores. La fosforilación de estos receptores, va a permitir la interacción de proteínas con dominios SH2 como Itk y PI3K, cuya contribución es esencial para que las células T se puedan activar. ZAP-70 y Lck fosforilan y activan varias rutas de señalización que culminan con la activación de los factores de transcripción NFAT y NF-κB, entre otros, y la expresión de genes que regulan la activación y función de las células T. La expresión de receptores cohibidores, va a impedir o atenuar la activación de las células T, a través de fosfatasas como SHP1 y 2 que desfosforilan los residuos de tirosina de las moléculas que intervienen en la cascada de señalización del TCR modulando su activación. Adaptado de Love et al. (2010) y Pennock et al. (2013)^{14,15}.

La intervención de estos receptores cohibidores va a modular la señal de activación a través de diferentes mecanismos, en función del receptor cohibidor, entre los que se

incluyen la competición con las moléculas coestimuladoras, la modulación de señales intracelulares transmitidas por el complejo TCR-CD3 y la inducción de genes inhibidores (Figura 3)^{13,16}.

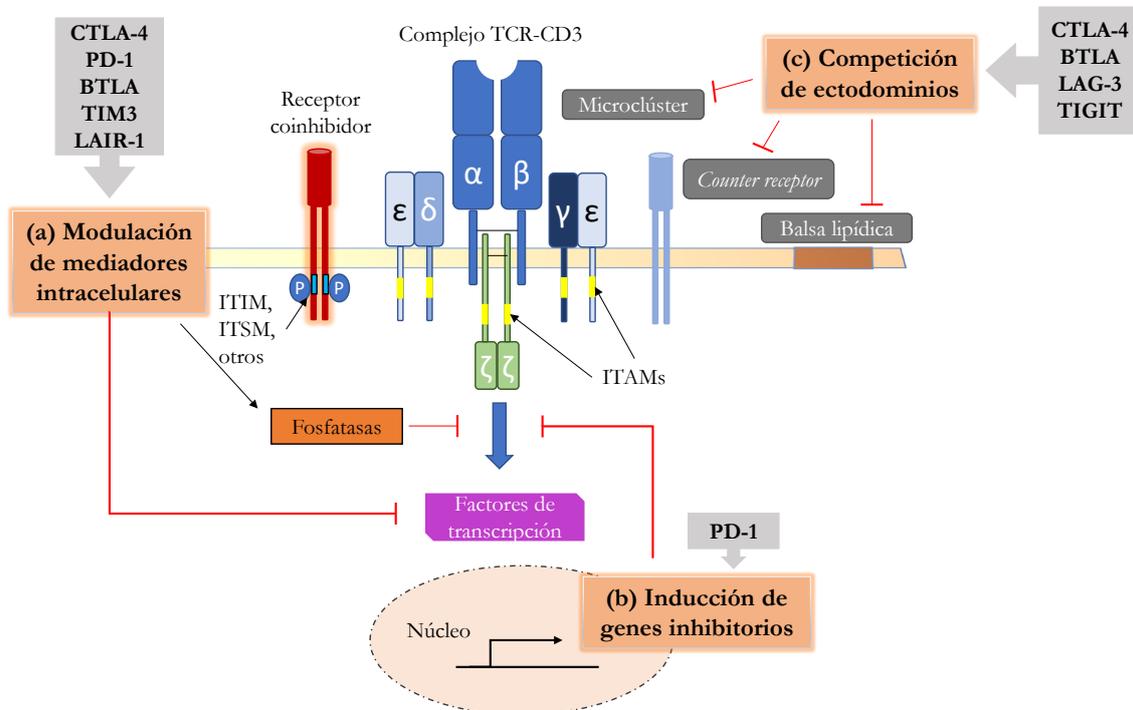


Figura 3. Principales mecanismos empleados por los receptores coinhibidores para regular la señalización de las células T. Una vez se ha producido la interacción del receptor coinhibidor con su ligando, se van a activar los mecanismos de inhibición de la activación de las células T. **(a) Modulación de mediadores intracelulares.** Los motivos ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) o ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*), se fosforilan y reclutan mediadores intracelulares como las fosfatasas SHP-1 y SHP-2, que van a ser las responsables de desfosforilar mediadores clave y de suprimir factores de transcripción necesarios para la activación de las células T. CTLA-4, PD-1, BTLA, TIM-3 y LAIR-1, utilizan este mecanismo. **(b) Inducción de genes inhibidores.** PD-1 y otros receptores coinhibidores, regulan la expresión de un conjunto de genes que inhiben la función de las células T, como el factor de transcripción de leucina básico (BAFT), que regula negativamente la actividad de AP-1. **(c) Competencia de ectodominios.** A través de este mecanismo, los receptores coinhibidores como CTLA-4, BTLA, LAG-3 y TIGIT, sequestran los receptores coestimuladores o los ligandos de estos, y/o previenen la formación de microclústeres y balsas lipídicas, necesarios para la formación de la sinapsis inmunológica, evitando que la señal de activación de las células T sea óptima. Adaptado de Thaventhiran et al. (2012)¹⁷.

En el caso de las citoquinas, igual que existen citoquinas coestimuladoras, también podemos encontrarnos con citoquinas como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y la IL-10 que poseen carácter inmunosupresor y pueden participar en la regulación negativa de la respuesta inmunitaria⁷. La expresión de la mayoría de estos receptores coseñalizadores, se induce en las células T en diferentes etapas de diferenciación, por lo que su impacto no está limitado únicamente a las células T naive, que han comenzado la expansión clonal y diferenciación, sino que modulan igualmente la función de las células T

efectoras (Teff), de memoria (Tm) y reguladoras (Treg)^{11,18}. De esta manera, las moléculas coinhibidoras no solo van a atenuar la activación de las células T desde su inicio, sino que también intervienen en la regulación del proceso de diferenciación, limitando tanto su proliferación como su supervivencia^{19,20}.

A nivel molecular, la activación de las células T se inicia a través del complejo TCR-CD3, formado por las cadenas α y β del TCR, que reconocen la combinación de péptido-MHC, y las cuatro subunidades del CD3, denominadas ϵ , γ , δ y ζ , que se asocian al heterodímero TCR $\alpha\beta$ como tres dímeros ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, $\zeta\zeta$)^{21,22}. La presentación de antígenos en el contexto adecuado, induce la fosforilación de los motivos de activación ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) localizados en las cadenas ζ de la cola citoplasmática del receptor CD3, encargada de la transducción de las señales hacia el núcleo de la célula⁷. Las quinasas de la familia Src, principalmente Lck y Fyn, son las responsables de la fosforilación de estos motivos. Este evento induce el reclutamiento de ZAP-70, una tirosina quinasa, que contiene el dominio SH2, iniciando una cascada de señalización que lleva a la activación de diferentes vías de señalización que, a su vez, activan factores de transcripción, como NFAT, NF- κ B y AP-1, que van a regular la producción de citoquinas y su impacto sobre la proliferación y diferenciación de las células T^{14,23}. Sin embargo, para que esta serie de eventos ocurran, es necesario la intervención de las moléculas coestimuladoras. La interacción de los receptores coestimuladores con sus ligandos, desencadena la fosforilación de los residuos de tirosina de su cola citoplasmática, paso crítico para que las proteínas con dominios SH2, como Lck, Itk, Vav, PI3K, Grb2 y Gads, puedan interactuar con ellos^{15,23}. Por el contrario, algunos receptores coinhibidores poseen motivos inhibidores ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) y/o motivos ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*) en sus dominios citoplasmáticos que cuando son activados por fosforilaciones en residuos de tirosina, se asocian a las fosfatasa SHP y SHIP que desfosforilan moléculas clave de la cascada de señalización iniciada por el complejo TCR-CD3, impidiendo la activación de las células T²³.

Por tanto, la respuesta inmunitaria va a estar regulada tanto por moléculas coestimuladoras como coinhibidoras, que se van a encargar de promover la inmunidad y de mantener la homeostasis. El equilibrio entre estas moléculas coseñalizadoras, es esencial para el correcto funcionamiento del sistema inmunitario, ya que determina el sentido de la respuesta inmunitaria²⁴. Por su capacidad de regular la respuesta, los receptores coinhibidores reciben el nombre de puntos de control o *immune checkpoints*^{9,13}. Constituyen un conjunto de receptores y ligandos de naturaleza glicoproteica que se expresan principalmente en la

superficie de las APCs y de las células T¹². La mayoría de las moléculas que funcionan como receptores coinhibidores pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), aunque algunas de ellas forman parte de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF/TNFR), como HVEM^{9,13}.

1.2 Superfamilia de las inmunoglobulinas

La superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), originalmente, hacía referencia a inmunoglobulinas y otras proteínas involucradas en la respuesta inmunitaria, pero ahora está constituida por un grupo extenso y heterogéneo de proteínas, tanto solubles como de superficie. Presentan una característica en común, que consiste en la presencia de un dominio de tipo inmunoglobulina (Ig) en su región extracelular²⁵⁻²⁷. Aunque este dominio, sirva para englobarlas dentro de un mismo grupo, los miembros de la IgSF difieren en su patrón de expresión, su grado de homología de secuencia de aminoácidos y en su función biológica²⁶. Las moléculas de esta superfamilia puede contener uno o varios dominios de tipo Ig, siendo el dominio constante (C) y el variable (V) los tipos básicos (**Figura 4**)^{26,27}. La diferencia entre los dominios IgC e IgV, radica en la composición de aminoácidos, en el número de cadenas β que poseen y en el espaciamiento entre las cisteínas que estabilizan su estructura a través de puentes disulfuro. Dentro del dominio IgC, se incluye un subconjunto designado C2, que es un dominio más compacto que los tipos C o V, con un espacio intercisteína algo más corto que el de los otros pliegues tipo C clásicos, denominados C1²⁵.

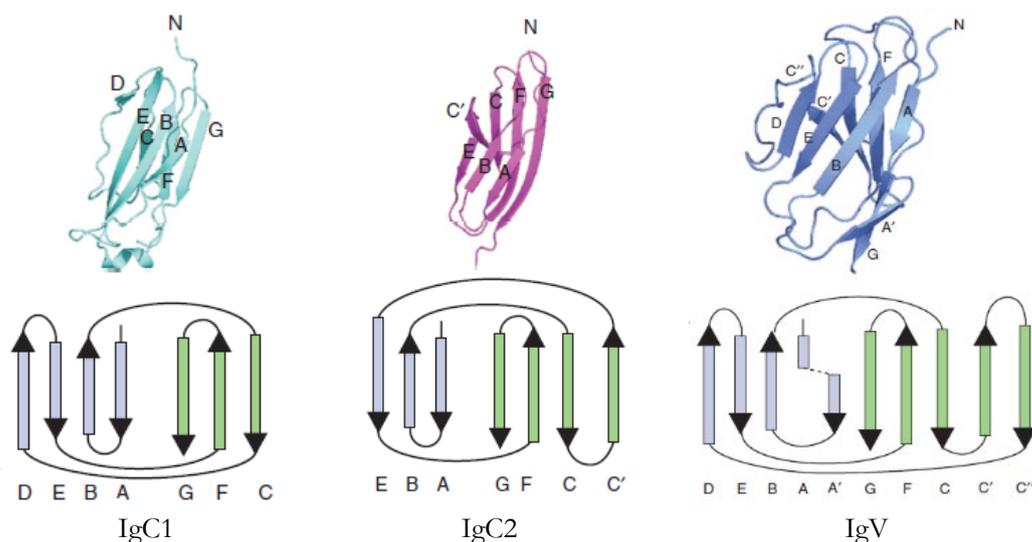


Figura 4. Representación esquemática de los dominios Ig de tipo C1, C2 y V. En los dominios IgC1, la cadena A y la G son paralelas, que es la base de la separación de los extremos N y C-terminales en lados opuestos. En los dominios IgC2, una cadena C' adicional y la falta de una cadena D, compensan la estructura manteniendo la orientación relativa de los extremos N y C-terminales. De manera similar, en dominios IgV, las hebras C' y C'' permiten conservar esta orientación relativa. Natarajan et al. (2015)²⁵.

Las funciones de las proteínas de esta superfamilia son muy variadas. Así, se han encontrado que están involucradas en la respuesta inmunitaria, en actividades enzimáticas, en el desarrollo de las células neurales, en la patogénesis viral y bacteriana (como receptores de virus), o simplemente en adhesión celular. La mayoría de estas funciones biológicas comparten entre sí, que intervienen en el proceso de reconocimiento y adhesión homofílica o heterofílica entre proteínas^{26,27}. Entre estas funciones diversas, tiene especial importancia, el control que ejerce la IgSF sobre la inmunidad innata y la adaptativa, convirtiendo a sus miembros en dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas y tumores malignos²⁸.

En la **Tabla 1**, se indican algunas de las familias de moléculas coseñalizadoras incluidas en esta superfamilia. La familia B7-CD28 es, quizás, la mejor descrita y de la que hablaremos más detalladamente¹³.

Tabla 1. Familias de moléculas coestimuladoras y coinhibidoras de la IgSF.

Familia	Molécula	Dominio extracelular	Señalización	Ligando/Receptor
CD28/B7	CD28		Coestimuladora	B7-1, B7-2
	ICOS (CD278)		Coestimuladora	B7H2
	CTLA4 (CD152)		Coinhibidora	B7-1, B7-2
	PD1 (CD279)		Coinhibidora	B7H1, B7DC
	PD1H (VISTA)		Coinhibidora	Desconocido
	BTLA (CD272)		Coinhibidora	HVEM, UL144
	B7-1 (CD80)		Coinhibidora	B7H1, CD28, CTLA4
	B7H1 (PDL1)		Coinhibidora	PD1, B7-1
	B7H3 (B7RP-2, CD276)		Coestimuladora/ Coinhibidora	Desconocido
	B7H4 (B7α, B7S1)		Coinhibidora	Desconocido
CD226	CD226 (DNAM1)		Coestimuladora	CD112, CD155
	CRTAM (CD355)		Coestimuladora	NECL2
	TIGIT (VSIG9)		Coinhibidora	CD112, CD113, CD155
	CD96 (TACTILE)		Dudosa	CD111, CD155
TIM	TIM1 (KIM1)		Coestimuladora	TIM4, TIM1, PS
	TIM2 (TIMD2)		Coinhibidora	SEMA4A, H-ferritina
	TIM3 (KIM3)		Coinhibidora	Galectin9, PS
	TIM4 (TIMD4)		Dudosa	TIM1, PS

Tabla 1. Familias de moléculas coestimuladoras y coinhibidoras de la IgSF (continuación).

Familia	Molécula	Dominio extracelular	Señalización	Ligando/Receptor
CD2/SLAM	CD2 (LFA2)		Coestimuladora	CD48
	SLAM (CD150)		Coestimuladora	SLAM
	2B4 (CD244)		Coestimuladora/ Coinhibidora	CD48
	Ly108 (NTBA)		Coestimuladora/ Coinhibidora	Ly108
	CD84 (SLAMF5)		Coestimuladora	CD84
	Ly9 (CD229)		Coestimuladora	Ly9
	CRACC (CD319)		Coestimuladora	CRACC
BTN	BTN1 (BTN1A1)		Dudosa	Desconocido
	BTN2 (BTN2A1-3)		Dudosa	Desconocido
	BTN3 (BTN3A1-3)		Dudosa	Desconocido
LAIR	LAIR1		Coinhibidora	Colágenos
Huérfanos	LAG3 (CD223)		Coinhibidora	MHC-II and Fgl-1
	CD160 (BY55)		Coestimuladora/ Coinhibidora	HVEM
				

Adaptado de Collins et al. (2005), Jung and Choi (2013)^{12,29}.

1.2.1 Los receptores coestimuladores y coinhibidores de la familia B7-CD28

La familia B7-CD28, dentro de la IgSF, incluye un gran número de receptores y ligandos, tanto coestimuladores como coinhibidores²⁰. Salvo tres excepciones, CD160, BTLA y B7H6, los miembros de la familia CD28 interactúan principalmente con los miembros de la familia B7¹³. A esta familia, pertenecen moléculas coestimuladoras como CD28 y B7-H2 (ICOS-L) y moléculas coinhibidoras como CTLA-4, PD-L1, PD-L2 y B7-H4, entre otros. B7-H3 y B7-H4 actualmente siguen siendo ligandos huérfanos, aunque sus funciones conocidas son exclusivamente inhibidoras^{20,30}.

La ruta de señalización coestimuladora más estudiada y la que más frecuentemente actúa como la segunda señal necesaria para la activación de las células T, es la compuesta por la interacción de CD28, primera molécula coestimuladora descrita, con los ligandos CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) expresados en la superficie de las APC³¹⁻³³. Ambos ligandos pertenecen a la IgSF y constan de un dominio de tipo IgV y un dominio de tipo IgC en su región

extracelular. Sin embargo, a nivel de secuencia de aminoácidos y región intracelular, las diferencias son notables¹¹. Esta segunda señal, induce el aumento de expresión de la subunidad α del receptor de la IL-2 (IL-2R, CD25), para formar con las subunidades β y γ , el receptor de alta afinidad de unión a IL-2; la expresión de CD40L, vital para la activación de las células T CD4 naive y la adquisición de la función efectora de las células T, y la producción de múltiples citoquinas, incluidas IL-2, interferón (IFN) $-\gamma$, factor de necrosis tumoral (TNF)- α y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)^{11,34}. Las citoquinas mencionadas, constituyen la tercera señal, según el paradigma de las cuatro señales, que regulan la activación de las células T, descrita anteriormente. Mientras que, CD40L y su receptor, CD40, son moléculas coestimuladoras de TNFSF/TNFRSF que proporcionan señales que regulan la supervivencia y diferenciación de las células T (cuarta señal)¹¹. Aunque este proceso puede ocurrir en ausencia de señales proporcionadas por la interacción CD40L/CD40, muchas funciones celulares e inmunitarias son defectuosas si no están presentes (**Figura 5**)³⁵.

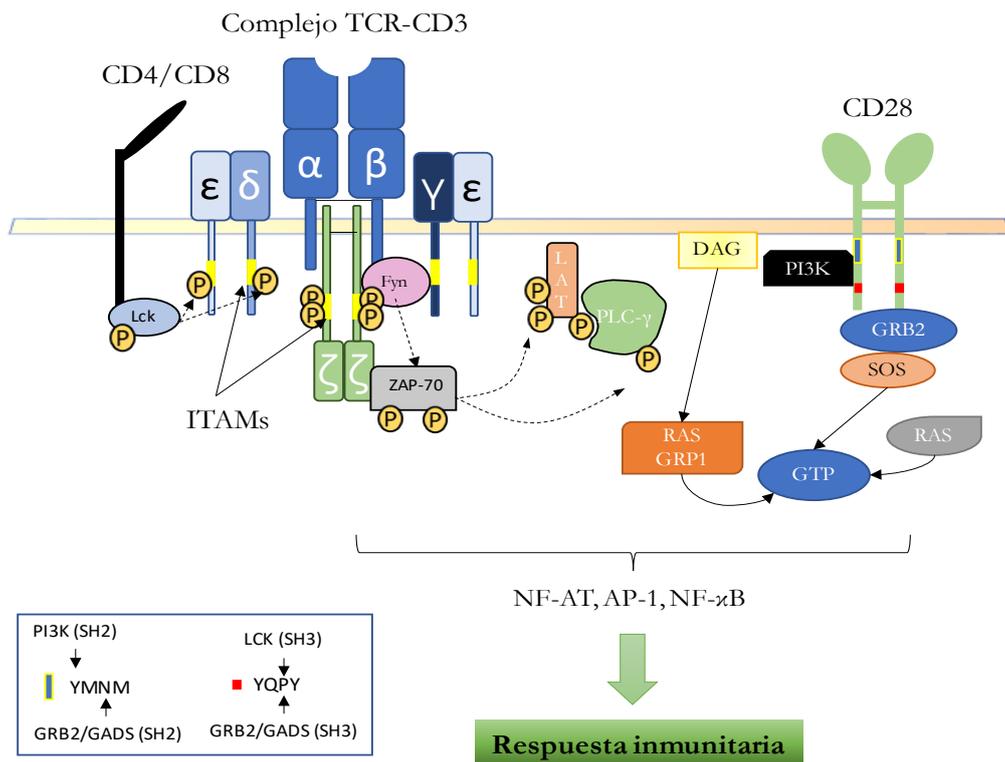


Figura 5. Regulación de la activación de las células T por CD28. La fosforilación de la cola citoplasmática de CD28, permite la asociación con PI3K y Grb2 mediante la unión del dominio SH2 y SH3 a determinados residuos presentes en la cola de la molécula. Estas proteínas van a su vez a interactuar y activar otros mediadores intracelulares, dando lugar a la activación de rutas de señalización que tienen como objetivo la activación de las células T. Adaptado de Rudd et al. (2003) y Rudd et al. (2009)^{36,37}.

Esta ruta CD28/CD80/CD86 es compleja, ya que originalmente CD80 y CD86 fueron identificados como ligandos coestimuladores de CD28, pero también pueden unirse con CTLA-4, receptor coinhibidor, para suprimir la proliferación excesiva de células T. CTLA-4, que en su región extracelular comparte con CD28 un motivo de unión (MYPPPY) a estas moléculas, pero con una mayor afinidad que CD28, dirige la vía coinhibidora más estudiada^{36,38}. La coinhibición mediada por CTLA-4, implica tanto mecanismos intrínsecos como extrínsecos de los que hablaremos más adelante.

1.2.2 Los receptores coinhibidores

Los receptores coinhibidores, se aseguran de la correcta contracción de las células T en las respuestas inmunitarias, ya sea a través de su expresión en estas células o por el control que ejercen sobre ellas las células T reguladoras (Treg)³⁹.

Hasta la fecha, los receptores coinhibidores más estudiados y mejor caracterizados son CTLA-4 y PD-1. Los mecanismos a través de los cuales estas moléculas coinhibidoras regulan la respuesta inmunitaria son muy diferentes. Mientras que CTLA-4 actúa a nivel central regulando la respuesta en las fases iniciales de la activación de las células T, PD-1 interviene regulando la función de las células T efectoras en los tejidos cuando la respuesta ya está en curso⁴⁰.

En los últimos años, y tras el estudio y el descubrimiento de nuevos receptores coinhibidores, éstos han ido ganando importancia gracias al papel crítico que juegan en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria y en la regulación de las enfermedades autoinmunes³⁹. Más recientemente, han cobrado especial relevancia como dianas en la inmunoterapia frente al cáncer, donde el nivel de expresión de estos ligandos para receptores coinhibidores de las células T se encuentra aumentado^{6,41}. En la **Figura 6**, se indican algunos ejemplos de receptores coinhibidores.

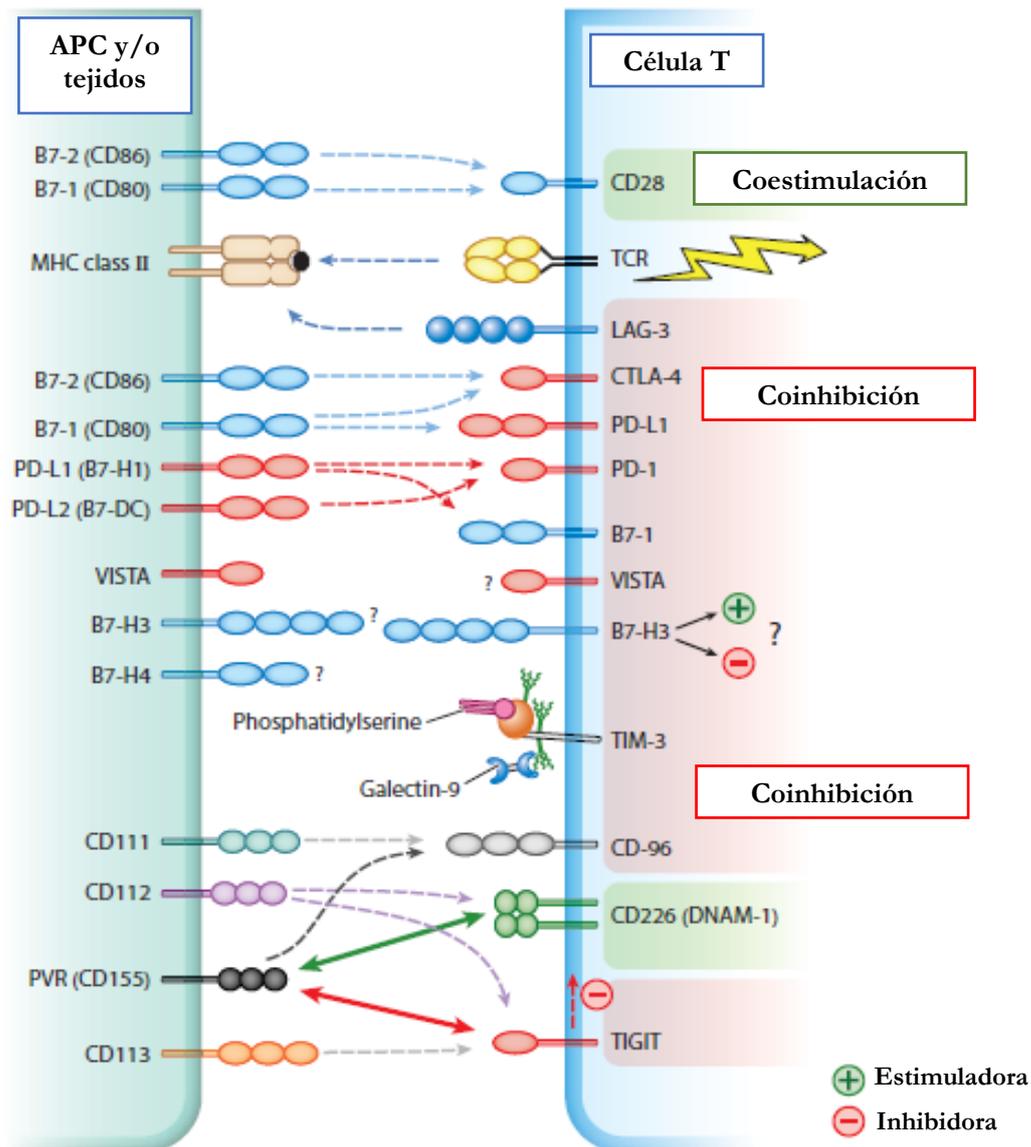


Figura 6. Descripción general de las vías coinhibidoras. Tras la activación de las células T, mediada por el reconocimiento TCR de péptidos presentados en el MHC en la superficie de APC y coestimulación a través CD28, muchas vías diferentes pueden contribuir a inhibir la respuesta de las células T . Baumeister et al. (2016)⁴².

1.2.2.1 La interacción coinhibidora CTLA-4/CD80/CD86

CTLA-4 es un receptor coinhibidor que se expresa en células Treg y en células T activadas, pero no en células T “naive” o de memoria. Tiene dos ligandos que pertenecen a la familia B7, CD80 y CD86, que se expresan en APCs. CTLA-4 ejerce su función inmunosupresora en las células T por varios mecanismos, que se dividen en intrínsecos y extrínsecos (**Figuras 7 y 8**)⁸. Entre los mecanismos intrínsecos, cabe mencionar la interrupción de la coestimulación mediada por CD28 y sus ligandos, a través del reclutamiento de la tirosina fosfatasa inhibitoria SHP-2 hacia el receptor de células T, la

competición por ligandos, el aumento de la expresión de moléculas de adhesión y la inhibición independiente de ligando. Por otro lado, CTLA-4 también puede utilizar mecanismos extrínsecos, como la inducción de la expresión de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) por APCs, la reducción de la expresión/disponibilidad de ligandos y el secuestro de ligandos⁴³.

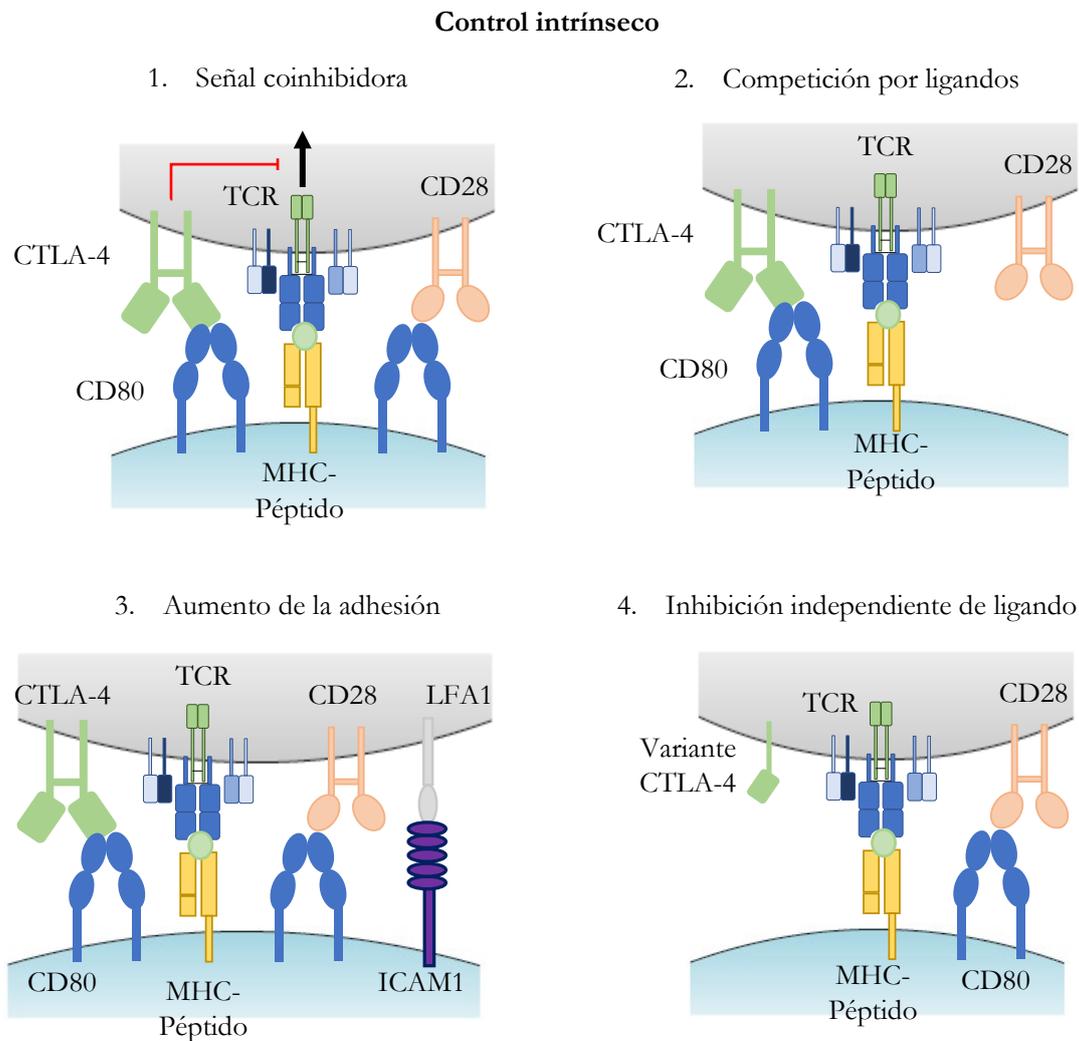
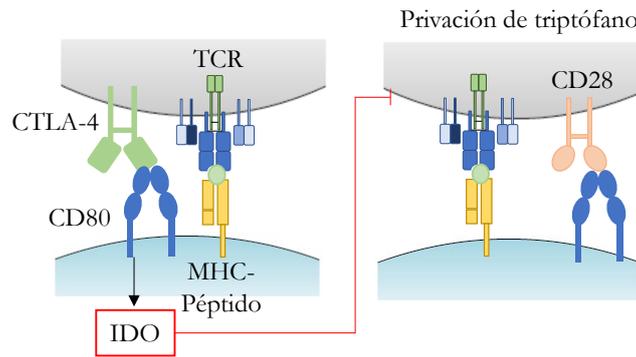


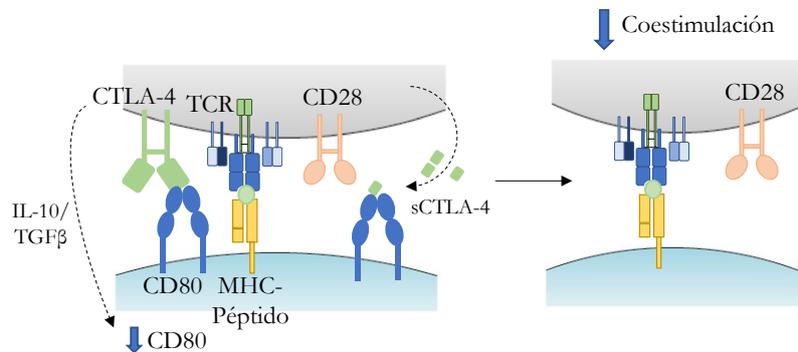
Figura 7. Regulación de la activación de las células T a través de los mecanismos intrínsecos de CTLA-4. (1) Señal coinhibidora. Las señales a través de CTLA-4 pueden interferir con la señalización proximal por el receptor de células T (TCR) y CD28. (2) Competencia por ligandos. CTLA-4 es el receptor de mayor afinidad para CD80/CD86 y compite con CD28 por la unión de CD80 / CD86. (3) Promoción de la adhesión. CTLA-4 puede aumentar la adhesión de células T/APC a través de una vía mediada por LFA1, lo que resulta en una activación reducida de las células T. (4) Inhibición independiente del ligando. Una variante de CTLA-4, que no puede unirse a los ligandos, puede inhibir la activación de las células T a través de una vía de señalización similar a la variante completa de CTLA-4. Adaptado de Schildberg et al. (2016)⁸

Control extrínseco

1. Señalización reversa en APC



2. Reducción de la disponibilidad/expresión de ligandos



3. CTLA-4 en las Tregs secuestra ligandos de las APC

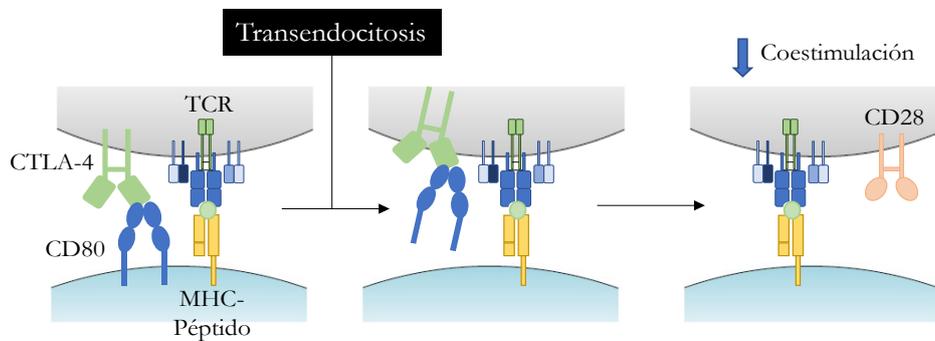


Figura 8. Regulación de la activación de las células T a través de los mecanismos extrínsecos de CTLA-4. (1) Señalización inversa a través de ligandos en APC. CTLA-4, puede invertir la señal a través de CD80 y CD86 en la APC, lo que lleva a la producción de la enzima IDO que conduce a la supresión de las respuestas efectoras de las células T debido principalmente a la degradación del triptófano y a la formación de metabolitos tóxicos para las células T, generados a partir del catabolismo de este aminoácido. (2) Reducir la expresión / disponibilidad del ligando. Citoquinas como IL10, TGFβ o variantes solubles de CTLA-4 (sCTLA-4), reducen la expresión o disponibilidad de ligandos. (3) CTLA-4 expresado en las Tregs elimina ligandos de las APC. La unión de CTLA-4 a CD80 o CD86, puede provocar transendocitosis de los ligandos de la APC, lo que da como resultado niveles más bajos de ligandos disponibles en la superficie de las APC. Adaptado de Schildberg et al. (2016)⁸.

La importancia del papel de CTLA-4, al limitar las repuestas de las células T se hace patente al observar, que ratones deficientes en CTLA-4 mueren a las pocas semanas de edad por una autoinmunidad letal, espontánea y masiva, debido a una proliferación descontrolada de los linfocitos T⁶. Las células T activadas, infiltran agresivamente el bazo y los nódulos linfáticos, así como el hígado, el corazón, el pulmón y el páncreas. Este fenotipo autoinmune severo y generalizado, sugiere que la función principal de CTLA-4 es mantener la homeostasis del sistema inmunitario⁴³. En las células Treg, también se ha observado como la expresión de CTLA-4 juegan un papel muy importante, no solo en la prevención de la autoinmunidad y en el mantenimiento de la homeostasis, sino también por su capacidad de impedir respuestas inmunitarias antitumorales. Se ha visto como la ausencia de expresión de CTLA-4 en células Treg, altera su función supresora y, en un modelo tumoral de leucemia en ratones mutantes condicionales para CTLA-4, conduce a la rápida eliminación del tumor⁴⁴.

1.2.2.2 La interacción de PD-1 con sus ligandos PD-L1 y PD-L2

De forma similar a CTLA-4, PD-1 no se expresa en células T naive o de memoria, sino que se expresa en células T tras la activación y en células T exhaustas. PD-1 puede interactuar con dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. PD-L1 se expresa en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas, entre las que se encuentran células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas, macrófagos, células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs), así como en fibroblastos y células T⁴³.

La interacción PD-1/PD-L1 regula negativamente la actividad de las células T de múltiples maneras, pero a diferencia de CTLA-4, no interfiere de manera directa con la coestimulación, sino que interrumpe la transmisión de señales a nivel intracelular, al inhibir la señalización a través del receptor de la célula T. PD-1 incluye en su región citoplasmática dominios inhibidores ITIM y ITSM. Estos dominios inhibidores se fosforilan y reclutan a la fosfatasa SHP-2, que a su vez, defosforila mediadores tempranos asociados a la transmisión de señales a través del TCR (**Figura 9**)^{45,46}.

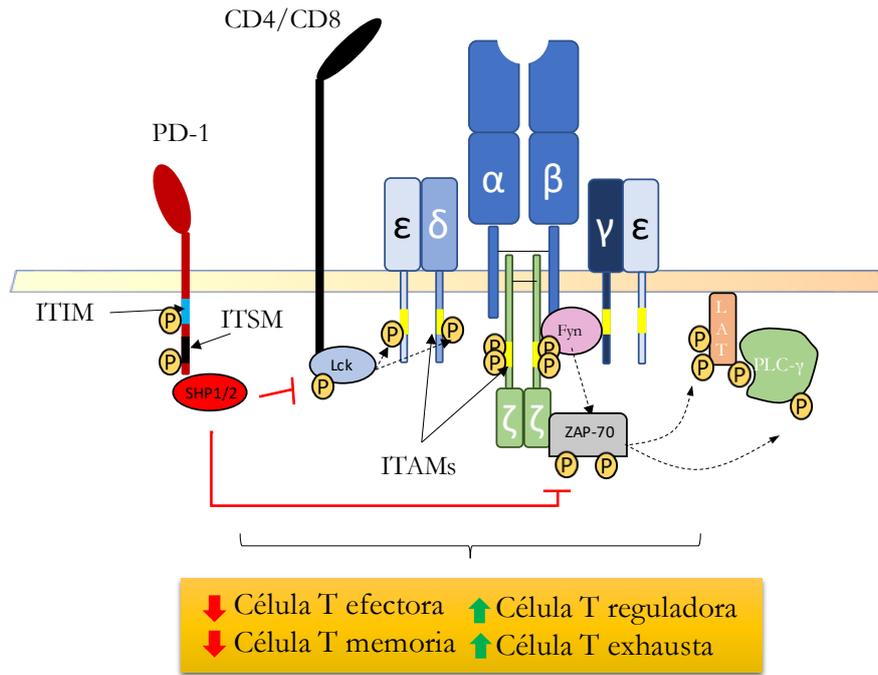


Figura 9. Mecanismo general de coinhibición mediado por PD-1. Tras la activación de las células T, a través de la señalización mediada por el complejo TCR/CD3 y de receptores coestimuladores, aumenta la expresión de PD-1 en las células T. La interacción con su ligando (PD-L1/PD-L2), conduce a la fosforilación y activación de sus dominios de inhibición ITIM/ITSM, lo que induce el reclutamiento fosfatasa SHP-2 y, probablemente, SHP-1. Como consecuencia, Lck y Zap-70 son desfosforiladas, interrumpiendo la cascada de señalización. La inhibición ocasionada por PD-1, altera el metabolismo celular incrementando la oxidación de los ácidos grasos en las células T. Estos procesos interrumpen la diferenciación de las células T naive hacia células T efectoras y de memoria, a la vez que potencia la diferenciación a células Treg y células T exhaustas. Adaptado de Bardhan et al. (2016)⁴⁷.

En contraste con lo que sucede en ratones deficientes en CTLA-4, los ratones deficientes en PD-1 y PD-L1 no desarrollan una enfermedad autoinmune letal, solo un proceso inflamatorio específico de órgano (miocarditis inflamatoria autoinmunitaria)⁴⁸. Esto sugiere que CTLA-4 y PD-1 actúan a distintos niveles en la activación de las células T⁴³. Por otro lado, el ligando PD-L1 no solo es capaz de interactuar con PD-1, sino que también lo hace con CD80 en configuración *cis* en las APC. De esta manera, se interrumpe no solo la señalización coinhibidora mediada por PD-1/PD-L1, sino que también se interrumpe la interacción CTLA-4/CD80. Además, esta configuración PD-L1/CD80, no impide la activación de las células T a través de CD28/CD80^{49,50}.

1.2.2.3 La interacción LAG-3 con sus ligandos

LAG-3 (*lymphocyte-activated gene-3*) es una molécula de superficie que presenta gran homología estructural con CD4, pero con una identidad inferior al 20% a nivel de aminoácidos. LAG-3 interactúa con mayor afinidad que CD4 con moléculas MHC de clase II. Se expresa principalmente en células T activadas, pero también en algunas subpoblaciones

de células NK y células B^{6,51}. En condiciones agudas, su expresión en células T activadas es transitoria, sin embargo, en ambientes inmunosupresores permanece elevada⁵².

Tras la activación de las células T, LAG-3 se une al complejo TCR regulando negativamente la transducción de señales⁶. Para esta transmisión de señales es esencial un residuo de lisina dentro de un motivo conservado “KIEELE” en la región intracelular de la molécula⁵³.

La deficiencia de LAG-3 por sí sola no induce autoinmunidad en cepas de ratón no susceptibles, que no tengan una deficiencia o alteración previa, y no afecta a las células T, sino que reduce la citotoxicidad mediada por células NK⁶. Es probable que éste sea el motivo por el cual la capacidad para limitar el crecimiento tumoral en ratones deficientes en LAG-3 sea reducida⁵⁴. Sin embargo, la deficiencia de LAG-3 en ratones NOD o la deficiencia combinada con PD-1, sí acelera o agrava la autoinmunidad^{6,55}.

Además de las moléculas MHC de clase II, se han encontrado otras tres proteínas que interactúan con LAG-3 y que se expresan en el microambiente tumoral, LSECtin (*Liver sinusoidal endothelial cell lectin*), Gal-3 (Galectina 3) y FGL-1 (*Fibrinogen-like protein 1*). En este ambiente, la interacción de estas moléculas con LAG-3 conduce a la supresión de la función de las células T, tanto CD4 como CD8, y al aumento de la expresión de la citoquina inmunosupresora IL-10 por parte de las células Treg⁶. FGL-1, recientemente ha sido identificado como un nuevo ligando de LAG-3, es secretado por el tumor para escapar al control del sistema inmunitario. FGL-1 inhibe la activación de las células T y los ratones KO para esta molécula, presentan un fenotipo autoinmune. En los modelos tumorales estudiados, el bloqueo de la interacción FGL-1/LAG-3 por anticuerpos monoclonales estimula la respuesta inmunitaria antitumoral⁵⁶.

1.2.2.4 La interacción TIM-3 con sus ligandos

TIM-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin-containing protein 3*), cuya expresión está regulada por T-bet, un factor de transcripción de células T CD4⁺ *helper* 1 (Th1), fue identificado como marcador de superficie específico de células Th1 y células T CD8^{+57,58}. De la misma manera que otros receptores coinhibidores, se expresa también en células T reguladoras (Tregs), monocitos, macrófagos y células dendríticas (DC). Estructuralmente, la familia de proteínas TIM tiene en común un dominio de tipo inmunoglobulina variable (IgV), seguido por un dominio mucina, una región transmembrana y una región citoplasmática. En la región citoplasmática de TIM-3, no se ha identificado ningún motivo de señalización inhibitor conocido, pero sí contiene residuos de tirosina que permiten el reclutamiento de Fyn y de

una proteína adaptadora de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), a través de las cuales se transmitirían las señales⁵⁹.

El principal ligando de TIM-3 es la galectina 9 (Gal-9), una lectina de tipo S que interacciona con el dominio IgV de TIM-3. Esta unión desencadena una serie de señales coinhibidoras que conducen a la apoptosis de células Th1 y células T CD8 *in vitro*⁶. El bloqueo TIM-3/Gal-9, generalmente, induce la hiperproliferación de células efectoras asociadas con un aumento de la producción de citoquinas por los Th1y un incremento en la citotoxicidad de células T CD8^{6,59}.

Estudios sobre la estructura cristalina de TIM-3 revelaron sitios potenciales de unión para otras proteínas independientes de Gal-9⁶⁰. Desde entonces, se han descubierto varias moléculas capaces de interactuar con TIM-3, entre las que se incluyen la fosfatidil serina (PS), HGMB1 (*high mobility group protein B1*) y Ceacam-1³⁹.

1.2.2.5 La interacción TIGIT/CD112/CD155

TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*, también conocida por Vstm3 y WUCAM) es un nuevo miembro de la IgSF. A través de la búsqueda de genes con expresión restringida a las células T y que tuvieran una estructura similar a la de otros receptores inmunomoduladores, dos grupos identificaron de manera independiente a TIGIT⁶¹. Se trata de una proteína transmembrana de tipo 1, que contiene un dominio extracelular de IgV y un dominio ITT (*immunoglobulin tail tyrosine*), seguido de un motivo ITIM en su región citoplasmática⁶.

La ruta de señalización mediada por TIGIT presenta similitudes a la vía CTLA-4/CD28, al competir con la molécula coestimuladora CD226, por la unión a CD155 y CD112 (dos receptores de poliovirus, PVR)⁶². Mientras que CD226 se expresa ampliamente en la mayoría de las células inmunitarias, TIGIT se expresa en células T activadas y de memoria, en células Tregs y en células NK y NKT^{11,33}.

El mecanismo de inhibición de las células T, mediado por TIGIT no está claro. Algunas evidencias sugieren que TIGIT puede inhibir directamente la activación de las células T, a través de la señalización mediada por los dominios ITT o ITIM que posee en su cola citoplasmática⁶. Sin embargo, también puede inhibir indirectamente la activación de células T, al oponerse a la señal coestimuladora positiva mediada por CD226, ya sea a través de la competencia por la unión a CD112 o a CD115, o bien interrumpiendo la cascada de señalización desencadenada por CD226⁶³. La afinidad de unión de TIGIT por CD155 es mucho mayor a la de éste por CD226. Otro mecanismo extrínseco empleado por TIGIT

para llevar a cabo su función reguladora, sería a través de la interacción con CD155, induciendo la expresión de IL-10 y bloqueando la producción de IL-12 por las células dendríticas⁶⁴.

De la misma manera que ocurre con LAG-3, la deficiencia de TIGIT no induce autoinmunidad, en cambio su bloqueo agrava enfermedades autoinmunitarias. Los ratones deficientes en TIGIT, son más susceptibles al desarrollo de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) y el bloqueo de TIGIT acelera la enfermedad. La enfermedad de injerto frente a huésped (GvHD), también se vuelve más agresiva cuando las células T son deficientes en esta proteína. Por el contrario, el aumento de la función de TIGIT en las células T, mejora el curso de la patología en modelos preclínicos murinos de enfermedades autoinmunes⁶².

1.2.3 El receptor coinhibidor PD-1H (*Programmed death-1 homologue*)

En los últimos años se han ido descubriendo un número importante de *immune checkpoints* que abren nuevas vías en la inmunoterapia contra el cáncer. La proteína PD-1H (*Programmed Death-1 homologue*) es uno de los hallazgos más recientes que pertenece a este grupo de reguladores de la respuesta inmunitaria^{65,66}. Esta molécula fue identificada entre 2010 y 2011, por dos grupos independientes, como un nuevo *immune checkpoint* perteneciente a la familia B7. En la literatura, la podemos encontrar con diversas denominaciones como B7-H5, Dies1, DD1 α , Gi24 o SISP1, aunque habitualmente la mayoría de autores se refiere a ella como VISTA (*V-domain Ig Suppressor of T cell Activation*)⁶⁵⁻⁶⁸. Se trata de una molécula coseñalizadora, que actúa como regulador negativo de la respuesta inmunitaria, al inhibir la activación de las células T (**Tabla 2**)^{67,69}.

Tabla 2. PD-1H actúa como coinhibidor de la respuesta inmunitaria mediada por células T

Tipo celular	Sistema	Resultado	Cita
PD-1H sobre-expresado en BMDC	Células T CD4 ⁺ DO11.10 activadas por OVA	Supresión de la activación CD4	66
PD-1H expresado en células tumorales A20	Células T CD4 ⁺ DO11.10 activadas por OVA	Disminución de la proliferación	
PD-1H.Ig	CD4 y CD8 activados por anti-CD3	Suprime la proliferación	
	CD4	Supresión de la proliferación y producción de citoquinas	6
	<i>In vitro</i>	Promueve la inducción de células Treg	70
PD-1H KO	PD-1H KO	Activación espontánea de las células T Nivel de citoquinas elevado en suero Inflamación crónica multiorgánica	71
Células T-PD-1H KO	<i>In vivo/in vitro</i>	Incremento de la proliferación antígeno específica y de la producción de citoquinas	

Sus características estructurales y su patrón de expresión únicos, lo distinguen de otros miembros de la familia B7^{66,72}. Además, su función no es redundante a la de otros receptores coinhibidores, por lo que es una diana ideal para la terapia antitumoral⁷³.

1.2.3.1 Secuencia y estructura de PD-1H

La proteína murina, mPD-1H, es una proteína transmembrana de tipo I compuesta por 309 aminoácidos, codificada por el gen *Vst1*⁶⁶. Este gen, se localiza en el cromosoma 10 (10q22.1), alejado de la agrupación del resto de miembros de la familia B7⁷⁴. En la proteína a la que da lugar, podemos diferenciar tres regiones: una región extracelular (ECD), una región transmembrana (TM) y una región intracelular (IC). La región extracelular, inusualmente larga comparada con otros miembros de la familia B7, contiene un único dominio de tipo inmunoglobulina variable (IgV) de 136 aminoácidos unida a un dominio tallo de 23 residuos, a los que le sigue una región transmembrana de 21 aminoácidos, que termina en una región intracelular de 97 aminoácidos (**Figura 10**)^{65,66,75}. En el caso de la proteína humana, igual que la murina, se trata de una proteína transmembrana de tipo I de 311 aminoácidos⁷⁶.

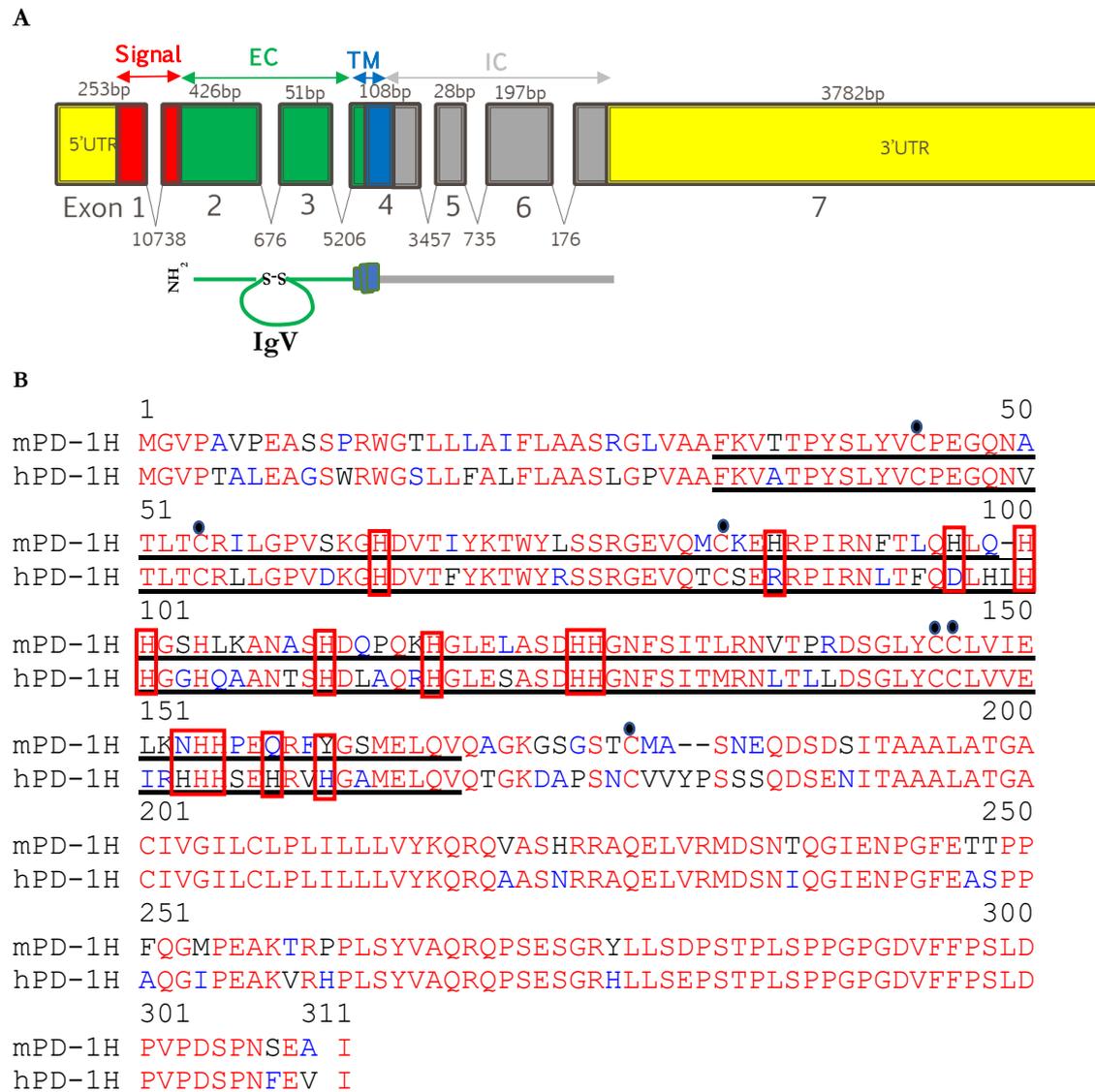


Figura 10. Organización genómica, secuencia y alineamiento de PD-1H. **A.** El gen *Vsir*, cuya expresión genera la proteína PD-1H murina, contiene siete exones que codifican: la región 5'UTR localizada en el exón 1 y, a continuación, entre los exones 1 y 2 se encuentra el péptido señal; la región extracelular se localiza en los exones 2, 3 y 4; en el exón 4 también está la región transmembrana; la región intracelular comprende parte del exón 4, los exones 5 y 6, y parte del exón 7, y la región 3' UTR se encuentra en el exón 7. **B.** La proteína de PD-1H, murina (superior) y humana (inferior), tienen un grado de homología del 76%, llegando al 90% en su región citoplasmática. La secuencia de aminoácidos correspondiente al péptido señal, la región extracelular, la región transmembrana y la región citoplasmática, se indican sombreados en azul, verde, amarillo y gris, respectivamente. Dentro de la región extracelular, subrayada, se muestra la secuencia correspondiente al dominio IgV y sombreada en violeta corresponde a la región equivalente al CDR3. En rojo se muestran los aminoácidos conservados y en azul aquellos que no son homólogos, con un punto se indican los seis residuos de cisteína conservados y, encuadrados en rojo los residuos de histidina presentes en la región extracelular.

Una de las razones por las que el dominio IgV de PD-1H es único, es el hecho de que posea una cadena beta más que los clásicos dominios IgV, así como un elevado número de residuos de histidina y cuatro residuos de cisteína adicionales, ausentes en el resto de miembros de la familia, que forman puentes disulfuro intramoleculares^{72,75}. El lazo no

estructurado de 21 residuos de aminoácidos, que se forma entre las cadenas C y C', también es exclusivo de esta molécula⁷⁴. Se cree que estas estructuras, obligarían a que la disposición de la proteína en la superficie de la membrana fuera inusual, limitando el acceso a posibles ligandos (**Figura 11**). El hecho de que estas características estén conservadas entre especies, sugiere que juegan un papel importante regulando la función de la proteína⁷⁵.

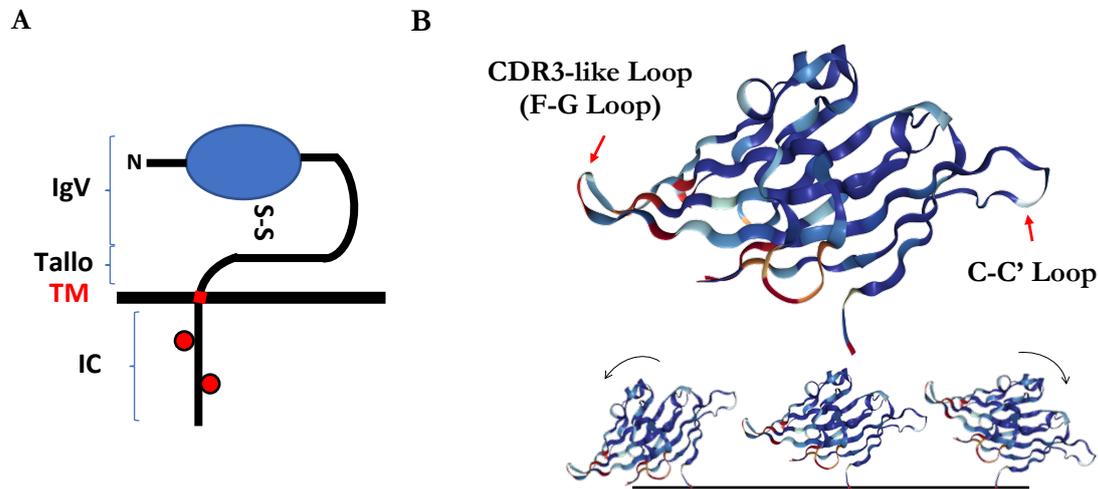


Figura 11. Modelo de la estructura de PD-1H. **A.** Conformación básica de la proteína de membrana. Los puntos rojos indican posibles sitios de unión para la proteína quinasa C. **B.** Posible disposición de la proteína expuesta en la superficie de la célula. Las flechas rojas señalan, a la izquierda, la región CDR3, responsable de la interacción con otras moléculas, y, a la derecha, la cadena beta adicional que tiene PD-1H en su región extracelular. Adaptado de Slater et al. (2020)⁷⁵.

La homología de la secuencia de su dominio IgV con el de otros miembros de las familias CD28 y B7, es lo que la convierte en un miembro más de la superfamilia de las inmunoglobulinas^{12,77}. Sin embargo, en su región intracelular no presenta los clásicos motivos inhibidores ITIM o ITSM, sino que contiene sitios potenciales de unión a la proteína quinasa C y la caseína quinasa 2, así como residuos de prolina que podría funcionar como puntos de anclaje para proteínas adaptadoras^{42,69,74}. Las características de su cola citoplasmática y su expresión, tanto en APCs como en células T, sugieren que PD-1H podrían inhibir la activación de las células T actuando como receptor (**Figura 12**). Su expresión en las APC, puede interactuar con ligandos afines en las células T, que se están estudiando en la actualidad, y que podrían estar implicados en la señalización negativa.

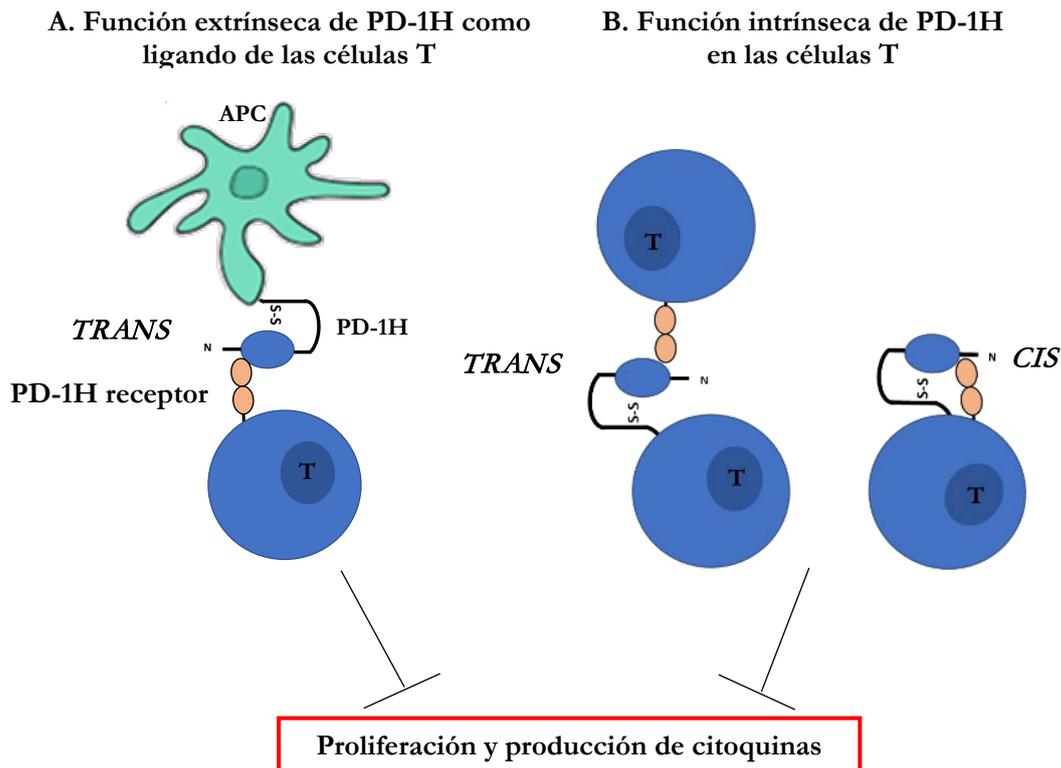


Figura 12. Función como ligando/receptor de PD-1H en la regulación de la activación de las células T. La función inhibitoria de PD-1H se lleva a cabo a través de su expresión tanto en células T como en APC. **A.** PD-1H expresado en APC, actuaría como ligando interaccionado en *trans* sobre un receptor desconocido en las células T. **B.** Mientras que PD-1H expresado en las células T, podría interaccionar en *trans* con un receptor en las propias células T vía interacción célula T-célula T o, en *cis*, sobre la misma célula T, si ligando y receptor se expresan en la misma célula. Adaptado de Xu et al. (2018)⁷⁸.

1.2.3.2 Patrón de expresión de PD-1H

La expresión de PD-1H, a diferencia a la de otras moléculas coinhibidoras, se restringe principalmente a células hematopoyéticas (**Tabla 3**). Son las células de origen mieloide, las que presentan los mayores niveles de expresión, destacando la elevada expresión en microglía y neutrófilos. Seguidos por otros subconjuntos mieloides, incluidos monocitos, macrófagos, basófilos y células dendríticas⁷⁴. En los linfocitos T, se observa una expresión diferencial entre las poblaciones de células T CD4 y CD8, siendo mayor en la primera, especialmente en las células naive y las Tregs FoxP3⁺. Sin embargo, no se ha detectado expresión en los linfocitos B^{65,66}. Se ha observado diferencia de expresión también al comparar los mismos linajes celulares en diferentes órganos linfoides⁶⁷. Mientras la expresión de la mayoría de los receptores coinhibidores es mínima y aumenta tras activación de las células T, PD-1H se expresa constitutivamente a niveles significativos en las células T naive. PD-1H puede atenuar la activación temprana de las células T, potenciando que las células T naive permanezcan en un estado de quiescencia, sin anular por completo el proceso de

diferenciación y expansión clonal, que se induce como respuesta ante un estímulo antigénico^{79,80}. La expresión de PD-1H en las células T naive, contribuiría de esta manera al mantenimiento de la tolerancia periférica⁸⁰.

Tabla 3. Comparación de la expresión de PD-1H en diferentes tipos celulares humanos y murinos.

Tipo celular	Expresión constitutiva de PD-1H		Expresión inducible de PD-1H	
	Humano	Ratón	Humano	Ratón
Células T CD4 ⁺ naive	+	++		
Células Treg CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	+	++	N/D	++
Células T CD8 ⁺	+	+	N/D	N/D
Células B	-	-	-	-
Células NK	-	-	N/D	N/D
Macrófagos	N/D	+++	++	N/D
Monocitos	+++	+++	++	N/D
Neutrófilos	+++	+++	N/D	N/D
Células dendríticas	+++	+++	N/D	++
MDSC	+++	+++	N/D	++

NOTA: N/D: información no disponible. Adaptado y recogido por Deng et al. (2016)⁴³.

Su expresión en las células Treg, parece influir en su diferenciación y su función supresora. Además, la expresión de PD-1H en estas células en el microambiente tumoral, es bastante elevada, lo que indica que podría desempeñar un papel en la inmunosupresión específica de tumor, inhibiendo la función de las células T. *In vitro*, el bloqueo de PD-1H puede revertir esta supresión. Sin embargo, el bloqueo de PD-1H afecta tanto a células Treg en las que su expresión es alta, como en aquellas en las que su expresión es baja. Además, en estas condiciones, en las que PD-1H está bloqueado, también aumenta la proliferación de las células T, incluso en ausencia de células Treg. Esto sugiere que PD-1H, podría no estar implicado directamente en la supresión dirigida por estas células. En este sistema, PD-1H podría funcionar como un receptor en las células T y un ligando expresado por Tregs⁸¹.

En cuanto a cómo se regula la expresión de PD-1H, hay poca información al respecto. Algunos estudios han revelado, que los factores de transcripción p53 y HIF (factor inducible por hipoxia)-1 α , aumentan la expresión de PD-1H⁷⁴. El grupo de Yoon y colaboradores, determinaron que el control de p53 sobre el aclaramiento mediado por fagocitosis de las células muertas, era a través de la inducción de PD-1H⁸². Mientras que el grupo de Deng y colaboradores, demostró que en condiciones hipóxicas en el microambiente tumoral, HIF-1 indujo la expresión de PD-1H y que cuando las células se cultivan en cámaras hipóxicas, la influencia de PD-1H es mayor⁸³. Por otro lado, los factores de transcripción Fos, JunD y NF κ B, que también se sobreexpresan bajo condiciones inflamatorias, son represores

potenciales de la expresión de PD-1H, ya que poseen sitios de unión en la secuencia del gen *V_β*. Por lo que, la unión de estos factores de transcripción reprimiría la expresión del gen PD-1H⁸⁰.

1.2.3.3 Actividad funcional de PD-1H como ligando expresado en APCs

Varios hallazgos sugieren que PD-1H inhibe las respuestas de las células T, actuando como un ligando de un receptor todavía poco caracterizado presente en la superficie de éstas.

La proteína de fusión soluble PD-1H.Ig, es capaz de inducir *in vitro* la diferenciación de células T CD4 a células iTreg en presencia de TGF-β en células humanas y murinas, mientras que, *in vivo* se ha observado que el bloqueo de PD-1H disminuye la generación de células Treg específicas de tumor⁸¹. Por otro lado, también se ha observado la inhibición de la proliferación y producción de citoquinas de células T CD4 murinas y humanas, tras añadir PD-1H.Ig *in vitro*^{66,76}.

La expresión de PD-1H en APCs, produce una disminución en la proliferación de células T específicas de antígeno, mientras que su bloqueo conduce a un aumento de la proliferación de las células T. De esta manera, PD-1H actuaría como ligando interaccionado con un receptor presente en la superficie de las células T⁷⁸.

1.2.3.4 Actividad funcional de PD-1H como receptor expresado en células T

Son varias las evidencias que sugieren que PD-1H inhibe la activación de las células T, actuando como receptor en la superficie de éstas. Tanto *in vivo* como *in vitro*, las células T deficientes en PD-1H, responden a la activación antígeno específica proliferando activamente, lo que se asocia a la proliferación de células antígeno específicas y una mayor producción de citoquinas, en comparación con células T WT⁷⁸.

Por otro lado, la estimulación de PD-1H mediante anticuerpos agonistas limita la proliferación de células T frente a antígenos específicos, tras su activación por APCs deficientes en PD-1H. En este sistema, debido a que las APC son PD-1H deficientes, PD-1H en las células T funcionaría como un receptor independientemente de las APC, para suprimir las respuestas de las células T⁷⁹.

1.2.3.5 Papel PD-1H en la enfermedad

De la misma manera que muchos otros *immune checkpoints*, PD-1H ha sido relacionado con numerosas enfermedades autoinmunes, infecciones y procesos tumorales, lo que ha llevado a su estudio en diferentes modelos animales de enfermedad (**Tabla 4**).

Tabla 4. Influencia de PD-1H en diferentes modelos murinos de enfermedad.

Enfermedad	Enfoque	Modelo	Resultados	Referencia
Trasplante	<i>PD-1H.Ig</i>	aGvHD	Previene la enfermedad	65
	<i>aPD-1H mAb (clon MH5A)</i>			
	<i>Células T (PD-1H KO)</i>	GvHD	Disminuye la supervivencia	79
Hepatitis	<i>aPD-1H mAb (clon mam82)</i>	Hepatitis aguda por ConA	Mejora supervivencia	71
	<i>PD-1H KO</i>		Desciende la supervivencia	
	<i>TCD-BM (PD-1H KO) a WT</i>		Incrementa la susceptibilidad	
Cáncer	<i>PD-1H.Ig</i>	Fibrosarcoma (MCA105)	Incremento del tamaño del tumor	66
	<i>aPD-1H mAb (clon 13F3)</i>	Melanomas (B16-OVA, B16-BL6 y PTEN/BRAF)	Reduce el crecimiento tumoral	81
	<i>aPD-1H mAb + aPD-L1 mAb</i>	Melanoma (B16-B6)	Suprime el crecimiento tumoral y mejora la supervivencia	73
		Cáncer de colon (CT26)	Regresión tumoral y mejora la supervivencia a largo plazo	
	<i>aPD-1H mAb (clon 13F3)</i>	Carcinoma de vejiga (MB49)	Reduce el crecimiento tumoral	81
	<i>PD-1H KO</i>	Glioma (GL261)	Mejora la supervivencia	71
Alergia	<i>aPD-1H mAb (clon MIH63)</i>	Hipersensibilidad de contacto inducida por 2,4-dinitro-1-fluorobenceno	Exacerba la enfermedad	84
	<i>aPD-1H mAb (clon 4C11)</i>	Asma	Atenúa la enfermedad	85
	<i>PD-1H.Ig</i>		Exacerba la enfermedad (posible bloqueo de la señalización)	
	<i>PD-1H KO</i>		Exacerba la enfermedad	
Autoinmune	<i>PD-1H KO</i>	Lupus eritematoso sistémico	Exacerba la enfermedad	86
	<i>PD-1H KO</i>	Artritis inducida por anticuerpos	Disminuye la susceptibilidad	87
	<i>aPD-1H mAb (clon MH5A o 8G8)</i>		Atenúa la enfermedad	
	<i>PD-1H /PD-1 doble KO en ratón transgénico TCR 2D2</i>	EAE	Incremental la susceptibilidad	73
	<i>PD-1H /PD-1 doble KO</i>	Enfermedad autoinmune	Incrementa la susceptibilidad	73
<i>aPD-1H mAb (clon 13F3)</i>	EAE	Exacerba la enfermedad	66	

En todos los modelos recogidos en la **Tabla 4**, PD-1H actúa como una molécula coinhibidora de la respuesta inmunitaria, pero se ha visto que esto no siempre se cumple. En pacientes con infección crónica por VIH, la sobreexpresión de PD-1H que se observa en los monocitos se correlaciona con la activación inmunitaria y la depleción de células T CD4. Esta situación conduce a un proceso inflamatorio crónico, debido a la inducción de citoquinas proinflamatorias por parte de los monocitos, que actúan como si estuvieran totalmente activados de manera sostenida. Curiosamente, esta sobreexpresión de PD-1H mejora la capacidad de los monocitos de estimular la producción de IFN- γ por células T específicas del VIH. En este sistema, la activación que se produce en estas células y la consecuente estimulación de las células T, anularía el poder inhibitorio de PD-1H sobre la respuesta inmunitaria⁸⁸.

La sobreexpresión de PD-1H no solo se ha observado en pacientes con enfermedades crónicas, sino que también se ha detectado una alta expresión de PD-1H en linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) y en células mieloides en pacientes con procesos tumorales⁸¹. Es importante destacar que se sobreexpresa en MDSCs, en macrófagos asociados a tumores (TAMs) y Tregs, lo que sugiere que PD-1H juega un papel en la evasión de la respuesta inmunitaria^{43,89}. En condiciones inflamatorias, como las que se producen en los procesos tumorales, es posible que la elevada expresión de PD-1H se induzca por la producción local de interleucinas o interferones⁹⁰. Pese a la alta expresión de PD-1H en el microambiente tumoral, en diferentes modelos tumorales animales no se ha detectado la expresión de PD-1H en células tumorales, solo en TILs (**Figura 13**)⁸¹. Hasta la fecha, son pocos los estudios que han detectado la expresión de PD-1H en las células tumorales⁹⁰. Mulati y col., fueron los primeros en detectar un alto nivel de expresión de PD-1H en células cancerosas de tumores humanos de ovario y de endometrio⁹¹. Se desconoce qué función ejercería en estas células, si bien se ha postulado que podría actuar debilitando la respuesta inmunitaria antitumoral⁷⁴. El mecanismo por el cual PD-1H lleva a cabo su función se desconoce, pero al contener residuos de prolina en su cola citoplasmática y potenciales sitios de unión para proteína quinasa C (PKC), la unión de esos mediadores podría desencadenar una cascada de inhibición por desfosforilaciones mediada por fosfatasa. Esto explicaría la reducción de la fosforilación y el reclutamiento de la proteína LAT, mediador de la cascada de activación mediada por el complejo TCR/CD3, observada *in vitro* en presencia de PD-1H.Ig en células T activadas por anti-CD3⁷³.

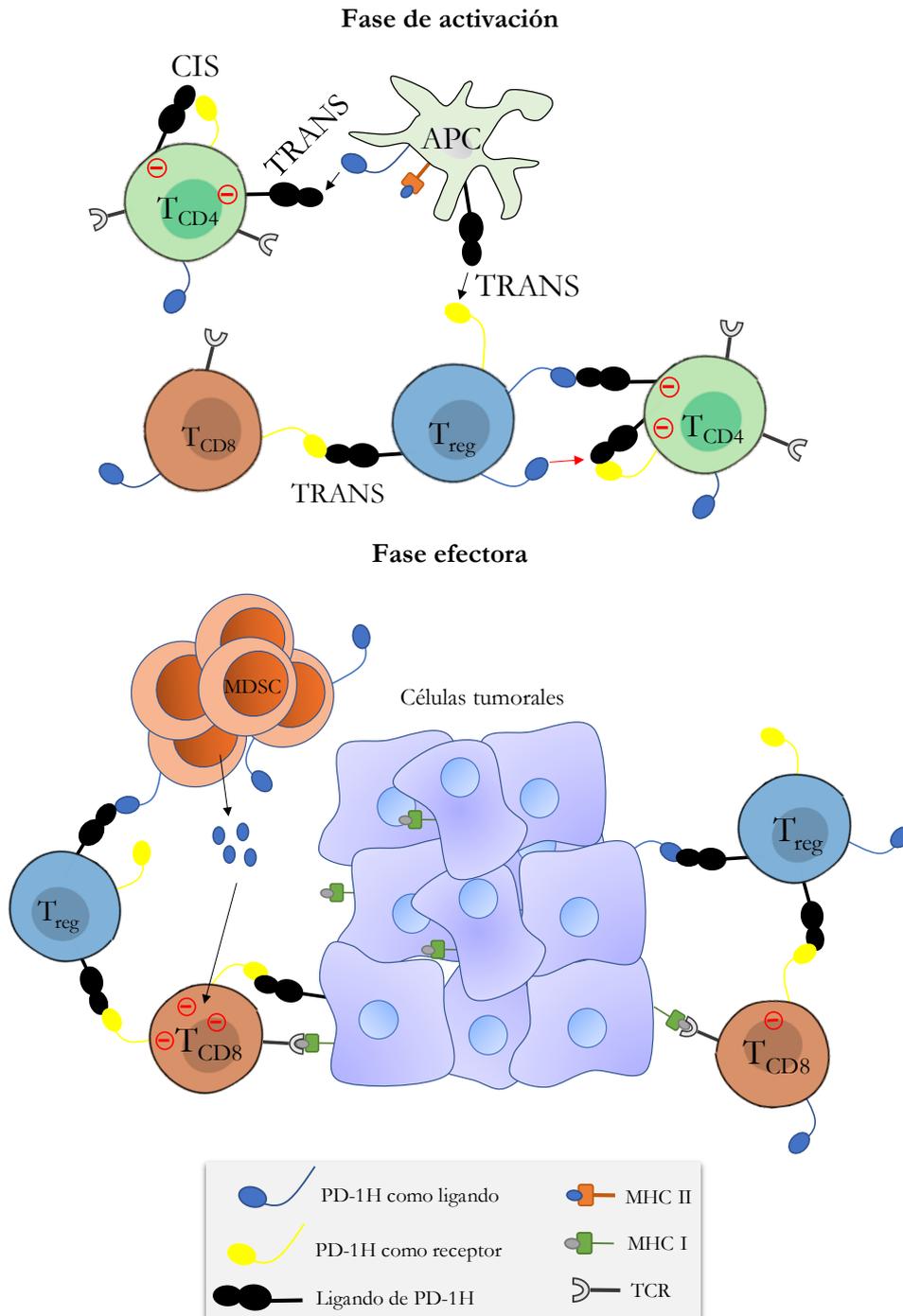


Figura 13. Modelo hipotético de actuación de PD-1H. En la fase de activación (parte superior), PD-1H actuaría tanto como ligando en las células Treg y APC, que actuaría sobre un receptor todavía desconocido en las células T CD4 y células T CD8. La interacción de PD-1H con su ligando, transmitiría una señal negativa (indicada con – en rojo) hacia el interior de las células T, que aumentaría su umbral de activación. Esta interacción podría darse *in cis*, impidiendo la interacción *in trans* (flecha roja), o producirse *in trans* con la célula adyacente. En la fase efectora (parte inferior), PD-1H actuaría como ligando y receptor en las células Treg y como ligando en las células MDSC y en las células tumorales, que actuaría sobre un receptor pendiente de caracterización expresado en las células T CD8 y T CD4. En este caso, la función de las células Treg y de las MDSC sería crear un ambiente inmunosupresor que impediría que las células T CD8 lleven a cabo su función efectora citotóxica contra las células tumorales, ayudando así a la evasión tumoral. Adaptado de Deng et al. (2016)⁴³.

1.2.3.6 PD-1H como diana terapéutica

La expresión de PD-1H en células de origen linfoide y mieloide, hace que el uso de anticuerpos frente a esta molécula, implique tanto a la inmunidad innata como adaptativa⁹². Los resultados obtenidos en estudios de PD-1H *in vivo* han sido dispares. Por un lado, el bloqueo de la interacción de PD-1H con su receptor, utilizando anticuerpos monoclonales (mAbs) antagonistas frente a PD-1H, al igual que en el caso de PD-1, induce la potenciación de la respuesta antitumoral en diferentes tipos de cánceres (melanoma, fibrosarcoma) y agrava el curso de la enfermedad autoinmune en un modelo de encefalomiелitis autoinmune inducido^{93,94}. Distintos trabajos, principalmente los realizados por el grupo dirigido por el Dr. Noelle, demostraron que el bloqueo de PD-1H, puede modular drásticamente el microambiente tumoral hacia un fenotipo mieloide de tipo proinflamatorio que favorece la infiltración de las células T específicas de tumor⁷⁴. En cuanto a la terapia inmunitaria antitumoral, la expresión de PD-1H se ha observado en el microambiente en toda clase de tumores y en distintos linajes celulares. Además, se ha observado un incremento de su expresión en el microambiente tumoral, en respuesta al tratamiento con anticuerpos monoclonales bloqueantes frente a otros *immune checkpoints*, como CTLA-4 y PD-1⁹². Estas evidencias, convierten a PD-1H en una diana prometedora en la inmunoterapia antitumoral⁷⁴.

Por otro lado, el uso de mAbs agonistas de PD-1H o el uso de la proteína recombinante soluble, consigue inhibir la enfermedad aguda de injerto contra huésped, tanto en un modelo semialogénico, como en un modelo alogénico a través de la barrera MHC de histocompatibilidad de trasplante (**Figura 14**)⁹⁵.

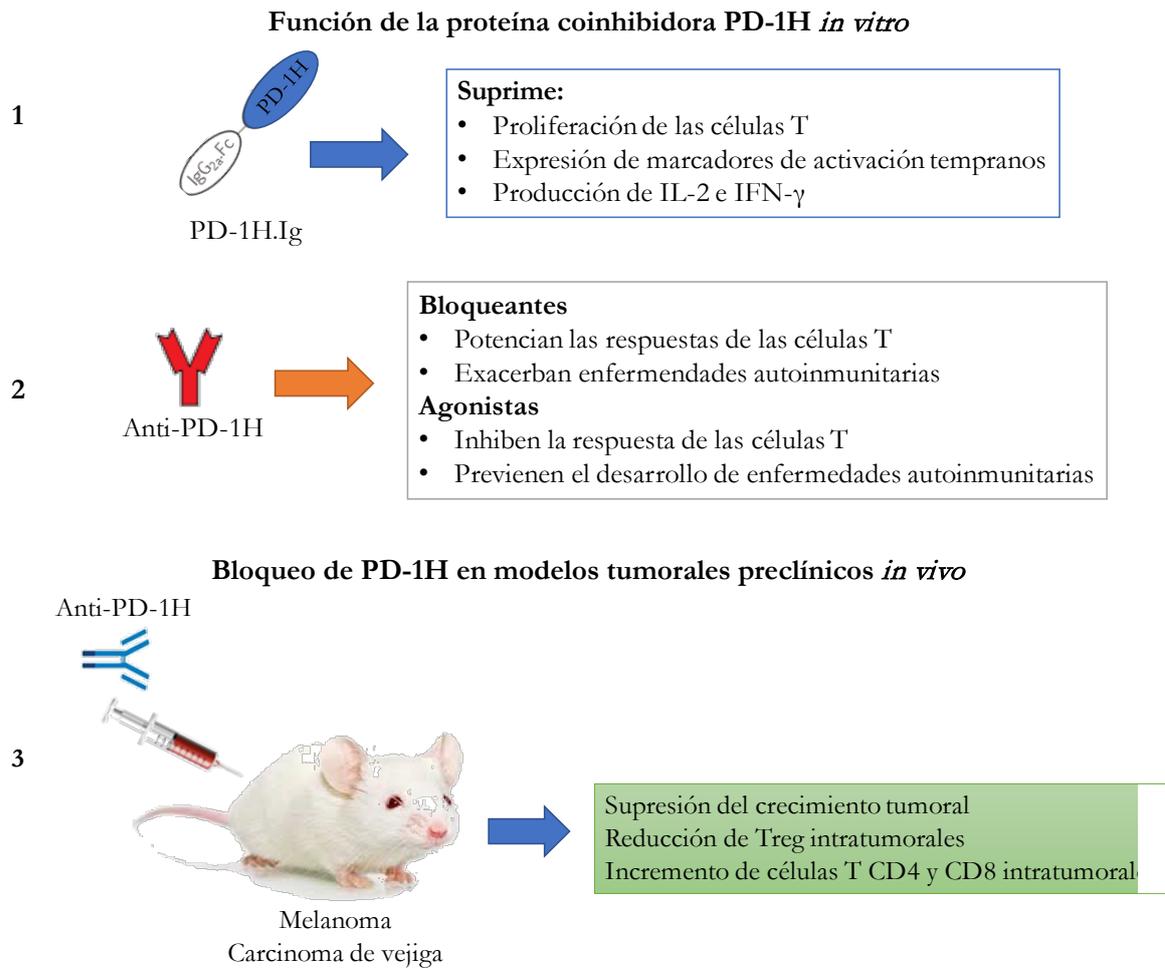


Figura 14. Función de la proteína PD-1H. En la parte superior, se indica la función de la proteína PD-1H soluble (1) y la respuesta al uso de anticuerpos bloqueantes y agonistas de la función de PD-1H *in vitro* (2). En la parte inferior, se muestra el resultado del uso de anticuerpos frente a PD-1H en modelos tumorales preclínicos de melanoma y carcinoma de vejiga *in vivo* (3).

1.3 Ligandos de PD-1H en la especie humana: VSIG3, VSIG8 y PSGL-1

1

En los últimos dos años, se han identificados tres posibles candidatos a ligandos de PD-1H en la especie humana, se trata de VSIG3, VSIG8 y PSGL-1^{72,95,96}. En el caso de VSIG3, el primero en ser relacionado con PD-1H en la especie humana, fue a través de un rastreo masivo de posibles interacciones entre las regiones extracelulares de proteínas de tipo I en la especie humana. A partir de este descubrimiento, se analizó la posibilidad de que otros miembros de la familia VSIG pudieran también interactuar con PD-1H. En un primer momento, se descartó la posibilidad de que otros miembros de la familia pudieran interactuar con PD-1H, hasta que recientemente se registró una patente en la que identificaban a VSIG8 como otro de los posibles ligandos^{95,97}. En el caso de PSGL-1, su relación con PD-1H se investigó teniendo en cuenta las características de su región

extracelular, que indicaban que tal vez el pH podría afectar a la conformación de la molécula para facilitar la interacción con otras moléculas⁹⁶.

El grado de conservación observado entre la proteína murina y humana de VSIG3 y VSIG8 es bastante elevado (>85%). Esta similitud entre proteínas de distintas especies, indicaría que es probable que cumplan las mismas funciones y puedan interactuar con los mismos ligandos. En el caso de PSGL-1, la homología observada es inferior (<70%), lo que podría significar que los ligandos con los que puede interactuar sean diferentes entre especies (**Figuras 15-17**). En las tres proteínas, el mayor porcentaje de identidad se encuentra en la región intracitoplasmática, lo que sugiere que la función de las mismas, entre especies, está conservada.

Los miembros de la familia VSIG, se incluyen dentro de la IgSF, ya que poseen dominios de tipo IgV e IgC en su región extracelular⁹⁸. Actualmente, esta familia está compuesta por 8 miembros, algunos identificados tanto en la especie humana como murina, mientras que otros solo en la especie murina. Las funciones de las moléculas de esta familia son diversas, aunque principalmente se trata de moléculas de adhesión. Recientemente, se han señalado varios miembros de esta familia como posibles dianas en la inmunoterapia antitumoral al encontrarse sobreexpresados en algunos tipos de tumores y poder actuar como ligandos de receptores coinhibidores de células T^{62,97,99-102}.

Por otro lado, PSGL-1 ha sido estudiada durante mucho tiempo como una molécula de adhesión implicada principalmente en el tráfico de células del sistema inmunitario y en la regulación de las respuestas inmunitarias de células mieloides y células T, al posibilitar el reclutamiento de las células inmunitarias, desde la sangre a los sitios de inflamación. Durante la migración de células T, PSGL-1 puede unirse a diferentes ligandos, conocidos y desconocidos, que pueden modular su estado de diferenciación dentro de los distintos tejidos. Además, recientemente, a PSGL-1 se le ha atribuido un papel como regulador negativo de la función de las células T en reposo y durante la respuesta inmunitaria adaptativa^{103,104}.

Alineamiento hVSIG3/mVSIG3

```

hVSIG3 LEVSESPGSIQVARGQPAVLPCFTTSAALINLNVIWMVTPLSNANQPEQVILYQGGQMF
mVSIG3 LEVSESPGSVQVARGQTAVLPCAFSTSAALLNLNVIWMVIPLSNANQPEQVILYQGGQMF
*****.:***** *.:*.:*****:***** *****

IgV
hVSIG3 DGAPRFHGRVGFVTGMPATNVSIFINNTQLSDTGTYQCLVNNLPDIGGRNIGVTGLTVLV
mVSIG3 DGALRFHGRVGFVTGMPATNVSIFINNTQLSDTGTYQCLVNNLPDRGGRNIGVTGLTVLV
*** *****

IgC
hVSIG3 PPSAPHCQIQGSQDIGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPTATQDQVQGTVTI
mVSIG3 PPSAPQCQIQGSQDLGSDVILLCSSEEGIPRPTYLWEKLDNTLKLPTATQDQVQGTVTI
*****.:*****.:*****:*****

hVSIG3 RNISALSSGLYQCVASNAIGTSTCLLDLQVISPQPRNIG
mVSIG3 RNISALSSGLYQCVASNAIGTSTCLLDLQVISPQPRSV-
*****.:*****.:

```

Figura 15. Alineamiento de las regiones extracelulares de las proteínas humana (superior) y murina (inferior) de VSIG3. En rojo, y con un asterisco (*), se indican los aminoácidos idénticos; con dos puntos (:), aminoácidos pertenecientes al mismo grupo polar, y con un punto (.) aquellos que ni son idénticos, ni se encuentran en el mismo grupo polar.

Alineamiento hVSIG8/mVSIG8

```

hVSIG8 VRINGDGQEVLYLAEGDNVRLGCPYVLDPEDYGPNGLDIEWMQVNSDPAHHRENVFLSYQ
mVSIG8 VRINGDGQEVMYLAEGDNVRLGCPYLDPEDLGTNSLDIEWMQVNSEPS-HRENVFLTYQ
*****.:*****.:***** * *.:*****.:*.: *****.:**

IgV
hVSIG8 DKRINHGSLPHLQQRVRF AASDPSQYDASINLMNLQVSDTATYECRVKKTTMATRKVIVT
mVSIG8 DKRIGHGNLPHLQQRVRF AASDPSQYDASINLMNLQVSDTATYECRVKKTTMATRKVIVT
****. **. *****

hVSIG8 VQARPAVPMCWTEGHMTYGNDVVLKCYASGGSQPLSYKWAKISGHHPYRAGSYTSQHSY
mVSIG8 VQARPAVPMCWTEGHMSKGNDVVLKCFANGGSQPLSYKWAKISGHSHPYRAGAYHSQHSF
*****.:*****.:*.:*****:*****.:* *****:

IgV
hVSIG8 HSELSYQESFHSSINQGLNNGDLVLKDISRADDGLYQCTVANNVGYSVCVVEVKVSDSRR
mVSIG8 HSELSYQESFHSTINQGLNNGDLLLKGINADDGLYQCTVANHVGYSVCVVEVKVSDSQR
*****.:*****.:*.:*.:* *****.:*****.:*

hVSIG8 IG
mVSIG8 VG
:.*

```

Figura 16. Alineamiento de las regiones extracelulares de las proteínas humana (superior) y murina (inferior) de VSIG8. En rojo, y con un asterisco (*), se indican los aminoácidos idénticos; con dos puntos (:), aminoácidos pertenecientes al mismo grupo polar, y con un punto (.) aquellos que ni son idénticos, ni se encuentran en el mismo grupo polar. Subrayado en azul, la versión truncada de la proteína murina correspondiente al transcrito 2 (VSIG8 T2).

Alineamiento hPSGL-1/mPSGL-1

```

hPSGL-1 -QATEYEYLDYDFLPETEPPEMLRNSTDTTPLTGPTPESTTVEPAARRSTGLDAGGAV-
mPSGL-1 QVVGDDDDFEDPDYTYNTDPPELLKNVTNTVAAH-PELPTTVMLERDSTSAGTSERATEK
      . : :: * *: :*:***:*:* *:* . * * :... :*: * . .:

hPSGL-1 -----TELTELANMGNLSTDSA-----AMEIQTTQPAATEAQTTQPVPTEAQTTPLAAT
mPSGL-1 IATTDPTAPGTGGTAVGMLSTDSATQWSLTSVETVQPASTEVETSQPAPMEAETSQPAM
      * * : :* ***** .:*.***:*:*.*:*.* * **:*: *

hPSGL-1 EAQTRLTATEAQTTPLAATEAQTTPAATEAQTTQPTGLEAQTTAPAAMEAQTTAPAAM
mPSGL-1 -----EAETSQPAPMEAETSQPAPMEADTSQPAPMEADTSKPAPT
      **: *: ** *:*:** :**:*: ** **:*:*: **

hPSGL-1 EAQTTPPAAMEAQTTQTTAMEAQTTAPEATEAQTTQPTATEAQTTPLAAMEAL---STEP
mPSGL-1 EAETSSKPAPTEAETSQPAPNEAETSKPAPTEAETSSKPAPTEAETTQLPRIQAVKTLFTTS
      **: *: ** *:*:* : **: * * **:*:*: **:*:* * :*: *

hPSGL-1 SATEALSMEPT-----TKRGLFIPFSVSSVT-----HKGIPMAASNLSVNPVPGAPD
mPSGL-1 AATEVPSTEPTTMETASTESNESTIFLGPSVTHLPDSGLKKGLIVTPGNSPAPTLPGSSD
      :***. * *** .: :*: **: : **: ** : : .* . * : *

hPSGL-1 HISVKQC
mPSGL-1 LIPVKQC
      * ****

```

Figura 17. Alineamiento de las regiones extracelulares de las proteínas humana (superior) y murina (inferior) de PSGL-1. En rojo, y con un asterisco (*), se indican los aminoácidos idénticos; con dos puntos (:), aminoácidos pertenecientes al mismo grupo polar, y con un punto (.) aquellos que ni son idénticos, ni se encuentran en el mismo grupo polar.

1.4 Efecto antitumoral del bloqueo de receptores coinhibidores en la clínica

1.4.1 Mecanismos de evasión tumoral

Los receptores coinhibidores, a través del control que ejercen regulando las respuestas del sistema inmunitario, protegen al organismo frente a reacciones autoinmunitarias, pero también limitan la capacidad de las células T de llevar a cabo ataques efectivos contra los tumores. Sin embargo, las células tumorales han ido evolucionando y adquiriendo funciones que les permiten alterar la capacidad inmunomoduladora de estas moléculas, lo que les permite evadir el control del sistema inmunitario. De manera general, se puede hablar de tres mecanismos de los que se sirven las células tumorales para sobrevivir: (I) regulación negativa de las moléculas involucradas en el procesamiento y la presentación de antígenos; (II) regulación negativa de las vías de activación inmunitaria; y (III) regulación positiva de las vías inmunosupresoras¹⁰⁵. Actualmente, el enfoque más exitoso para potenciar la actividad antitumoral en la clínica ha sido el uso de inhibidores de los *immune checkpoint*, que han logrado respuestas clínicas sin precedentes. Estos inhibidores, restauran la activación

de las células T y las respuestas antitumorales dirigiéndose a moléculas coinhibidoras como CTLA4 o PD-1 y sus ligandos^{6,60}.

1.4.2 Los receptores coinhibidores de interés terapéutico

En este sentido, se han logrado avances en la inmunoterapia clínica frente al cáncer con la aprobación de la FDA de terapias con anticuerpos monoclonales bloqueantes anti-CTLA-4 y anti-PD-1/PD-L1 (**Tabla 5**). Pero a pesar de su éxito, sólo un subconjunto de cánceres ha demostrado una respuesta clínica a estos tratamientos dirigidos contra estas moléculas³⁰. Esto se debe en gran parte, a la naturaleza e inmunogenicidad de los antígenos, así como a la carga mutacional del tumor, que permite al sistema inmunitario distinguir entre las células normales y aquellas que han sufrido alteraciones. Las mutaciones que dan lugar a la producción de esos antígenos tumorales, no se comparte entre pacientes de manera significativa, por lo que la carga antigénica e inmunogenicidad de los antígenos tumorales puede variar de unas personas a otras y considerarse específica del paciente¹⁰⁶.

Tabla 5. Anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA en el mercado. Lu et al. (2011)¹⁰⁷

Molécula diana	mAb	Compañía	Nombre comercial	Enfermedad	Año
CTLA-4	Ipilimumab	Bristol-Myers Squibb/Medarex	Yervoy	Melanoma metastásico	2011
PD-1	Nivolumab	Bristol-Myers Squibb/Ono Pharmaceutical Co., Ltd.	Opdivo	Melanoma Cáncer de pulmón no microcítico	2014
PD-1	Pembrolizumab	Merck & Co. Inc.	Keytruda	Melanoma	2014
PD-1	Cemiplimab	Regeneron Pharmaceuticals Inc.	Libtayo	Carcinoma cutáneo de células escamosas	2018
PD-L1	Atezolizumab	Roche, F. Hoffmann-La Roche, Ltd./Genentech Inc.	Tecentriq	Cáncer de vejiga	2016
PD-L1	Avelumab	Merck Serono International S.A./Pfizer	Bavencio	Carcinoma de células de Merkel	2017
PD-L1	Durvalumab	MedImmune/AstraZeneca	Imfinzi	Cáncer de vejiga	2017

A pesar de este éxito, la tasa de respuesta después del tratamiento con anticuerpos monoclonales que bloquean CTLA-4, PD-L1 o PD-1 es generalmente inferior al 30%⁷⁸. Además, en algunos pacientes, se desarrollan resistencias a estos tratamientos. En estos casos, se ha observado el aumento de expresión de otros *immune checkpoints*, como PD-1H, que podrían participar en la adquisición de estas resistencias⁹⁰. Por esta razón, cada vez es mayor

el interés que despierta la búsqueda de nuevos *immune checkpoints*, que puedan servir como dianas terapéuticas para el cáncer. En los últimos años, se han identificado varias moléculas como LAG-3, TIM-3, TIGIT y PD-1H que pueden contribuir a mejorar y reforzar la inmunoterapia frente al cáncer⁶⁰.

1.4.2.1 El receptor coinhibidor CTLA-4

Las características y la función de CTLA-4 para restringir las respuestas de las células T condujeron a la hipótesis de que el bloqueo de CTLA-4 podría ayudar a incrementar la actividad de las células T frente a los tumores. El grupo dirigido por James Allison, fue el primero en demostrar que el bloqueo mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 inducía a la regresión del tumor en un modelo murino de carcinoma de colon trasplantable¹⁰⁸. La capacidad de la respuesta al tratamiento con anti-CTLA-4 se correlacionó con la inmunogenicidad del tumor, siendo mejor en tumores más inmunogénicos. El éxito en múltiples modelos preclínicos condujo al desarrollo de Ipilimumab (Bristol-Myers Squibb), un anticuerpo monoclonal IgG1 completamente humano y el primero bloqueante de receptores coinhibidores. Después de dos ensayos clínicos de fase III en melanoma, Ipilimumab recibió la aprobación de la FDA en 2011 para el tratamiento del melanoma avanzado⁶⁰.

A pesar de los beneficios de supervivencia del Ipilimumab en el melanoma metastásico, los efectos secundarios adversos predisponen al desarrollo de diferentes cuadros de enfermedad autoinmunitaria. En la mayoría de los casos, es el tracto gastrointestinal el que sufre los efectos más directos, aunque también están implicados distintos órganos endocrinos (rotura/pérdida de la tolerancia a los antígenos específicos de tejido). El agotamiento de las células Treg y la activación sistémica de células T autorreactivas en el tejido linfóide es la causa más probable de que se produzcan estos eventos⁶⁰.

1.4.2.2 La interacción coinhibidora PD-1/PD-L1

El éxito de la terapia anti-CTLA-4 condujo rápidamente al desarrollo de nuevos anticuerpos, siendo el receptor PD-1 el segundo *immune checkpoint* para el que se produjeron anticuerpos monoclonales bloqueantes. Fueron varias las diferencias que se encontraron con respecto al tratamiento con anti-CTLA-4. En primer lugar, la terapia anti-PD-1 fue más efectiva en el tratamiento del melanoma y se obtuvieron resultados positivos, por primera vez utilizando la inmunoterapia, también frente al cáncer de pulmón no microcítico¹⁰⁹. En segundo lugar, los efectos secundarios adversos derivados de la terapia anti-PD-1 fueron menores⁴³.

Estos resultados tan prometedores, llevaron a la FDA a aprobar varios medicamentos dirigidos frente a PD-1 (Nivolumab, Bristol-Myers Squibb, Pembrolizumab, Merck) o frente a PD-L1 (Atezolizumab, Roche). Pembrolizumab y Nivolumab son anticuerpos monoclonales humanizados disponibles comercialmente que han demostrado una amplitud de utilidad clínica superior al Ipilimumab. El tratamiento con Pembrolizumab ha mejorado la supervivencia en el tratamiento de pacientes con melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma urotelial avanzado, carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello y cáncer gástrico⁴³.

Atezolizumab es el primer anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 que recibió la aprobación de la FDA para el tratamiento del carcinoma urotelial metastásico, tras los resultados prometedores obtenidos en ensayos clínicos de fase I y II. Sin embargo, los resultados obtenidos posteriormente, tras llevar a cabo los ensayos en fase III, demostraron a nivel global, que el tratamiento con Atezolizumab, no mejoraba la supervivencia de este tipo de cáncer. El Atezolizumab también está aprobado para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico, donde los ensayos clínicos en fase II y III, si han mostrado una mejoría en la supervivencia de los pacientes. Otros anticuerpos anti-PD-L1 aprobados para el tratamiento del carcinoma urotelial son Durvalumab y Avelumab. Todos estos medicamentos, dirigidos frente a PD-L1, se encuentran en ensayos clínicos activos para múltiples tipos de cáncer sólido⁶⁰.

1.4.2.3 La interacción coinhibidora LAG-3/Fgl-1

A la vista del conocimiento que se tiene de LAG-3 y su potencial para aumentar la respuesta inmunitaria antitumoral, se ha desarrollado comercialmente una proteína de fusión soluble de LAG-3 que no solo bloquea la señal inhibidora de LAG-3, sino que también aumenta la respuesta inmunitaria al inducir la activación de las células dendríticas¹¹⁰. En presencia de LAG-3.Ig, las células dendríticas tienen una mayor capacidad para inducir la proliferación de células T y la producción de interferón⁶⁰.

IMP321, fue la primera proteína soluble de LAG-3 desarrollada comercialmente. Se han completado múltiples ensayos en fase I y fase II, con IMP321 como adyuvante de vacunas, en combinación con quimioterapia y como terapia única. De momento, los efectos adversos que se han encontrado son de carácter leve y los resultados de los tratamientos han sido positivos. Actualmente, se encuentra en fase I un ensayo clínico que utiliza IMP321 en combinación con Pembrolizumab para el tratamiento del melanoma. También se está

investigando en fase I, la combinación de IMP321 más quimioterapia en pacientes con cáncer de mama metastásico⁶⁰.

Por otro lado, se ha desarrollado LAG525, un anticuerpo monoclonal bloqueante que reconoce a LAG-3, impidiendo la interacción con su ligando MHC-II, que se encuentra en estudio de fase I como terapia única y como tratamiento de combinación con un inhibidor de PD-1 para tumores sólidos⁶⁰.

1.4.2.4 La interacción coinhibidora CD112/CD155/TIGIT

Los estudios llevados a cabo sobre TIGIT, han demostrado que su expresión se correlaciona con la expresión de PD-1 y está aumentada en los TILs de múltiples tipos de cáncer. En diversos modelos murinos de tumores, el bloqueo de TIGIT disminuye la carga tumoral. La respuesta antitumoral es más efectiva si el bloqueo de TIGIT se combina con el bloqueo de PD-1 o PD-L1. Estos resultados han llevado al desarrollo de OMP-313M32, un anticuerpo monoclonal anti-TIGIT que bloquea su función y que ya se encuentra en ensayos clínicos de fase I. Este anticuerpo monoclonal, se une a TIGIT evitando la interacción con sus ligandos CD112 y CD155. Esto tiene como consecuencia, que CD226, molécula coestimuladora que se expresa en células T citotóxicas (CTLs) mejore su interacción con CD112 y CD155, potenciando la respuesta inmunitaria antitumoral⁶⁰.

1.4.2.5 El receptor coinhibidor PD-1H

Con la información que se tiene al respecto de PD-1H, con su amplio patrón de expresión en células de origen linfóide y mielóide, así como su expresión en distintos tipos de tumores, se espera que el bloqueo de esta molécula, con anticuerpos monoclonales o moléculas inhibidoras, mejore la respuesta inmunitaria anti-tumoral^{74,92}. De esta manera, se potenciaría la activación de células T específicas de tumor y su función efectora.

Con ese objetivo, se desarrolló CA-170 (Aurigene), la primera pequeña molécula antagonista oral de los *immune checkpoints* PD-L1, PD-L2 y PD-1H que se encuentra en ensayos clínicos y cuya estructura aún no ha sido revelada^{111,112}. La estructura de su precursor, AUNP-12, presenta secuencias de unión débil a PD-L1 humano, pero en el caso de CA-170 no se ha demostrado interacción con estas moléculas coinhibidoras¹¹³. En cambio, si se ha observado que CA-170 en ensayos *in vitro*, restaura la función efectora de las células T y en modelos murinos *in vivo* (melanoma B16, carcinoma de colon CT26 y MC38), mejora la activación de células T periféricas y promueve la activación de células T CD8 que infiltran el tumor^{113,114}. El desconocimiento de su mecanismo de acción y la falta de evidencias que

revelen una unión directa que impida la señalización mediada por el eje PD-1/PD-L1/PD-L2 y por PD-1H, sugiere que CA-170 podría actuar sobre la cascada de señalización desencadenada por estas moléculas¹¹³.

En enero de 2016, se lanzó un ensayo en fase I con un anticuerpo monoclonal antagonista frente a PD-1H (JNJ-61610588), para evaluar su seguridad y la eficacia de este tratamiento en pacientes con cáncer avanzado. En 2018, por falta de financiación, Janssen Research & Development finalizaron este estudio y lo traspasaron a ImmuNext In que continúa con su desarrollo⁷⁴. Por otra parte, Hummingbird Bioscience han desarrollado HMBD-002, un nuevo anticuerpo monoclonal anti-PD-1H que bloquea un dominio funcional conservado entre especies. Este anticuerpo neutralizaría la señalización mediada por hPD-1H, manteniendo su capacidad de unión por la proteína murina. Está previsto que, en la segunda mitad del 2020, comiencen los ensayos clínicos en fase 1 de HMBD-002¹¹⁵.

**HIPÓTESIS DE TRABAJO Y
OBJETIVOS**

2 Hipótesis de trabajo y objetivos

El sistema inmunitario constituye una red compleja de estructuras formada por los órganos linfoides primarios y secundarios, el tejido linfoide difuso asociado a mucosas, y todo ello interconectado por el sistema linfático y la sangre, que colaboran entre sí con el objetivo común de mantener la homeostasis en el individuo. La naturaleza de la respuesta inmunitaria va a depender del balance de señales positivas y negativas, provenientes de los *immune checkpoints*, que modulan la función de las células T, tras la fase de reconocimiento antigénico^{2,60,116}. La integración de estas señales tiene como fin último promover la eliminación selectiva del estímulo antigénico, sin llegar a alcanzar un nivel de inflamación y autoinmunidad excesivos que conduzca al daño tisular³⁶.

La mayoría de estas moléculas coseñalizadoras pertenecen principalmente a la Superfamilia de las Inmunoglobulinas (IgSF) y a la superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNFRSF)^{117,118}. Dentro de la IgSF, la familia B7 es la mejor estudiada y a ella, pertenecen las moléculas coestimuladoras CD28 e ICOS, y moléculas coinhibidoras como CTLA-4, PD-1, CD160, BTLA y PD-1H, entre otros^{2,9,13,101}. Cada una de estas moléculas se sirve de mecanismos propios para ejercer su función, actuando en la fase de *priming* en los órganos linfáticos o en la fase efectora en el sitio de la inflamación¹¹⁹. Las moléculas coestimuladoras se caracterizan por presentar dominios ITAM en su región intracelular, mientras que las moléculas coinhibidoras suelen poseer motivos ITIM e ITSM^{2,119}. Así, moléculas que ejercen funciones coinhibidoras similares, como es el caso de PD-1 y CTLA-4, difieren mucho tanto en su mecanismo de acción, como la etapa en la que participan a lo largo de la respuesta inmunitaria^{116,120}.

PD-1 homólogo (PD-1H), recibe este nombre por su homología con el dominio IgV de PD-1. PD-1H es uno de las moléculas coinhibidoras pertenecientes a la familia B7, que ha sido identificada en los últimos años^{65,66}. Su patrón de expresión y su estructura únicas, la diferencian de otros miembros de la familia B7, a la que pertenece. Sin motivos ITIM, ni ITSM en su región extracelular, se cree que la transmisión de señales se produciría a través de dos sitios potenciales de unión a la proteína quinasa C o mediante residuos de prolina que podrían funcionar como puntos de anclaje para proteínas adaptadoras^{42,69}. En los últimos años, tres moléculas se han propuesto como ligandos de PD-1H humano, VSIG3, VSIG8 y PSGL-1^{96,97,121}.

Muchos de los receptores coinhibidores de las células T, además de CTLA-4, PD-1 y PD-1H, se expresan también en células T reguladoras (Treg), cuya función es atenuar la respuesta mediada por las células T y mantener la tolerancia a lo propio¹²². PD-1H, también se expresa en MDSC, donde contribuye a inhibir la respuesta^{81,123}.

Cada uno de los *immune checkpoints* conocidos alberga propiedades únicas que hacen necesario el desarrollo de múltiples estrategias terapéuticas, ya sean en monoterapia o combinadas, con el fin de poder maximizar el potencial inmunoterapéutico de las mismas^{33,73,119,124}. Siguiendo esta hipótesis de trabajo postulamos que el bloqueo de la interacción del receptor coinhibidor PD-1H con su ligando podría incrementar la respuesta inmunitaria antitumoral y/o potenciar otras intervenciones terapéuticas en la clínica. Por lo tanto, el **objetivo general** de este proyecto de Tesis Doctoral es establecer un sistema experimental *in vitro* que nos permita evaluar las interacciones ligando/receptor de PD-1H en la especie murina. Dicha plataforma experimental servirá para el desarrollo preclínico de intervenciones terapéuticas en cáncer basadas en el uso de medicamentos biológicos (véase anticuerpos monoclonales o proteínas de fusión recombinantes), que prevengan la interacción de PD-1H con sus ligandos.

El **objetivo específico** de este trabajo ha sido el siguiente:

1. Clonar y expresar la proteína recombinante de PD-1H murino y variantes con distinto grado de oligomerización y sus ligandos conocidos como proteínas de membrana y proteínas solubles, para estudiar las interacciones ligando/receptor mediante ELISA y citometría de flujo. Este abordaje permitiría el desarrollo preclínico de una intervención terapéutica que prevenga la interacción de PD-1H con su ligando, con el propósito de aumentar la respuesta inmunitaria antitumoral.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 Materiales y métodos

3.1 Biología molecular

3.1.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo

Para la realización de los clonajes y la producción de plásmidos se utilizó la bacteria *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen). Las características genotípicas de esta cepa se indican a en la **Tabla 6**, junto con los medios de cultivos empleados.

Tabla 6. Cepa bacteriana y medios de cultivo empleados.

Cepa bacteriana	Descripción		Casa comercial
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F ⁻ , mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, deoR, araD139, Δ(araleu)7697, galU, galK, rpsL (Str ^R), endA1, nupG. Invitrogen, Thermo Fisher Scientific		Invitrogen
Medio de cultivo	LB-TB líquido	LB-TB solido	Casa comercial
Medio Luria-Bertani (LB)	12,5 g/L	12,5 g/L	Roth
Medio Terrific Broth (TB)	25,4 g/L	25,4	Roth
Agar		20 g/L agar	Roth
SOC	20 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 0,5 g/L de NaCl, 0,186 g/L de KCl, 4,8 g/L de MgSO ₄ y 3,603 g/L de dextrosa.		

3.1.2 Estrategia experimental para el clonaje de genes de interés

A lo largo de este trabajo, se desarrollaron varias construcciones genéticas para la expresión recombinante de las moléculas de interés. La metodología empleada para la obtención y comprobación de las mismas, se describe en la **Figura 18**, mientras que la **Figura 19** muestra el esquema de la estrategia general de clonaje seguida para la generación de las construcciones con las secuencias de nucleótidos de cada una de las moléculas de interés.

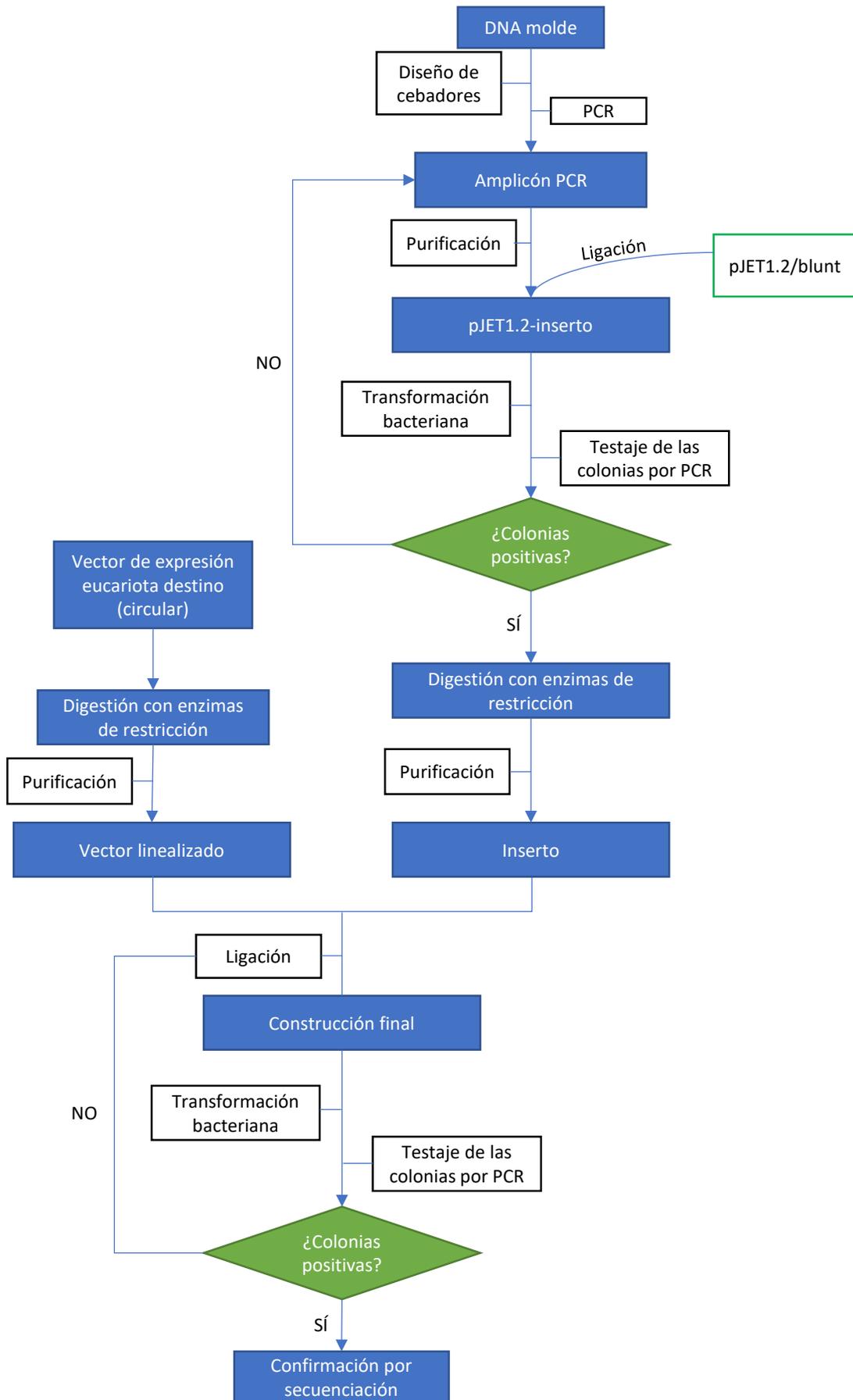
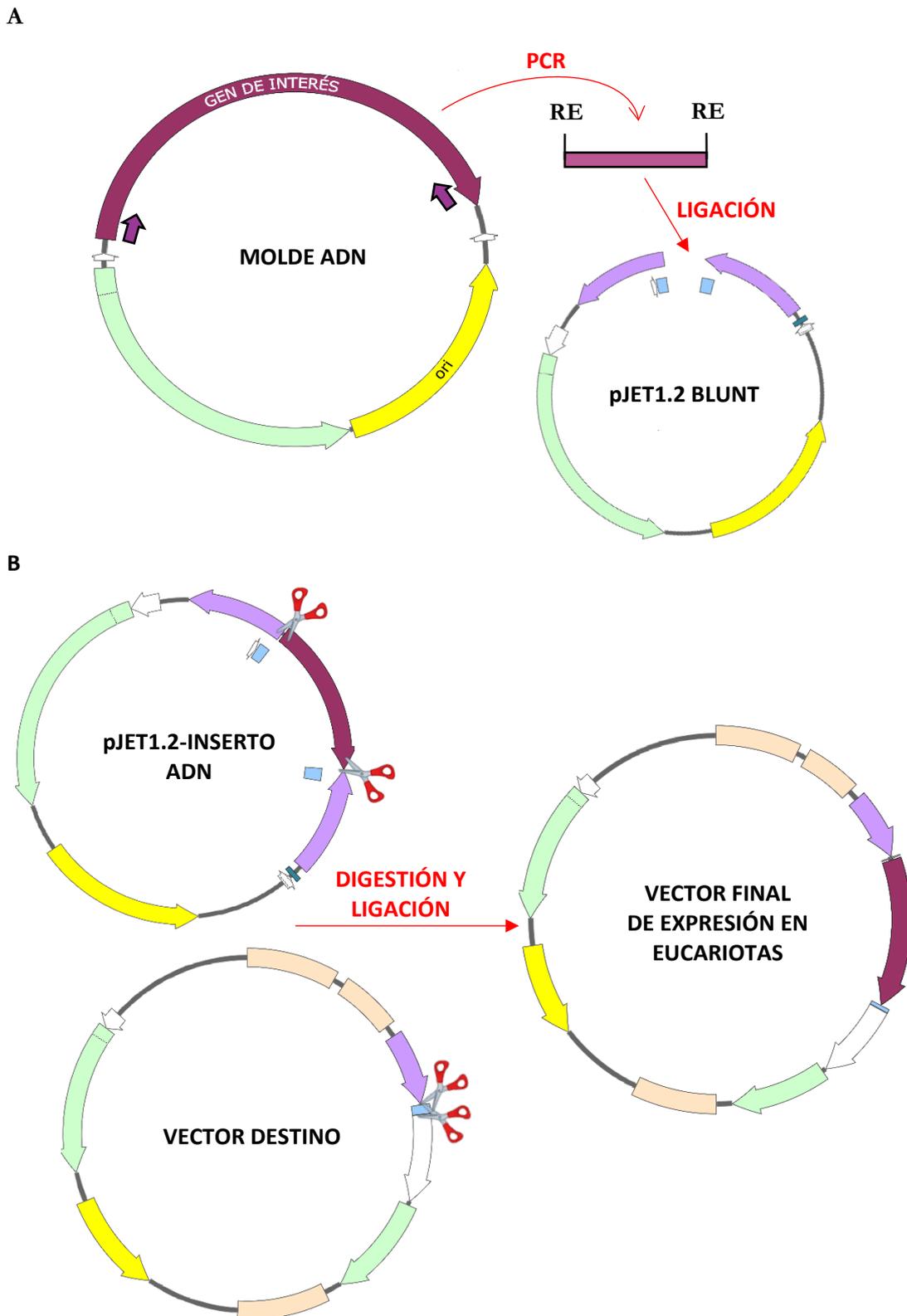


Figura 18. Estrategia general seguida para el clonaje de genes de interés. Se indica la serie de pasos y procesos seguidos para la obtención de las construcciones genéticas recombinantes.



3.1.3 Plásmidos

En la **Tabla 7**, se detallan los plásmidos utilizados en este trabajo.

Tabla 7. Plásmidos utilizados con su procedencia y descripción de sus elementos característicos.

Plásmido	Procedencia	Características
pJET1.2 Blunt	Thermo Scientific	Vector de clonación para productos de PCR de extremos romos. Contiene gen de resistencia a ampicilina (amp^R) y el origen de replicación de pMB1.
pMIG-IRES-GFP	MTA Universidad de Friburgo	Vector retroviral que contiene IRES, EGFP, origen de replicación pUC, gen de resistencia a ampicilina (amp^R), 5'LTR y 3'LTR.
pIB312	MTA	Vector que codifica para el gen completo de PD-1H murino.
pIB351	MTA	Vector de clonación de ADNc que contiene la CDS de VSIG3 en el esqueleto del plásmido pYX-Asc que porta el gen de resistencia a ampicilina (amp^R).
pMSCV-pgk-Puro	MTA Dr. Pascal Schneider	Vector retroviral que contiene el promotor PGK, el origen de replicación pUC, genes de resistencia a puomicina ($Puro^R$) y a ampicilina (amp^R), 5'LTR y 3'LTR.
pSecTag2/Hygro B (modificado)	Invitrogen	Vector de expresión eucariota que contiene los promotores del citomegalovirus (CMV), de la ARN polimerasa T7 y del virus del simio 40 (SV-40), el péptido señal de la IgK murina, las etiquetas c-myc y poli-histidinas (6xHis), los orígenes de replicación del fago F1 y del SV-40, genes de resistencia a ampicilina (amp^R) y a higromicina (hyg^R), y el origen de replicación del pUC. Modificado en el laboratorio de inmunología para incorporar el fragmento Fc de la IgG2a murina.
pIB352	MTA	Vector que codifica para el transcrito 2 de VSIG8, que se diferencia de la variante 1 en el extremo 5', lo que resulta en un transcrito que codifica para una proteína con una región N terminal más corta.
pIB363	Origene	Vector de expresión eucariota que contiene el ORF completo de la proteína VSIG8 (transcrito 1) del plásmido pCMV6-Entry. Porta los promotores del CMV, T7 y SV-40, las etiquetas c-myc y flag, la señal de poly A y el gen de resistencia a kanamicina (kan^R)/neomicina (neo^R).
pIB319a	MTA	Plásmido de expresión, que contiene la secuencia codificante para la proteína BirA de <i>E. coli</i> .
pIB313.2	Laboratorio de Inmunobiología (Gda. Natalia Varela ¹²⁵)	Vector de expresión, generado en el laboratorio de Inmunología, de la proteína recombinante soluble Flag.mPD-1H.AviTag, cuya secuencia codificante está clonada en el vector pSecTag2-HygroB.
pIB354	Laboratorio de Inmunobiología (Gda. Andrea Torices ¹²⁶)	Plásmido generado en el laboratorio de Inmunología, para la expresión de la proteína recombinante soluble mVSIG8 ECD (transcrito 2).mIgG2a.Fc-WT, cuya secuencia codificante está clonada en el vector pSecTag2-HygroB modificado.

MTA: Acuerdo de Transferencia de Materiales

A continuación, **Figuras 20-28**, se muestran los mapas de los plásmidos de partida utilizados para la generación de las construcciones:

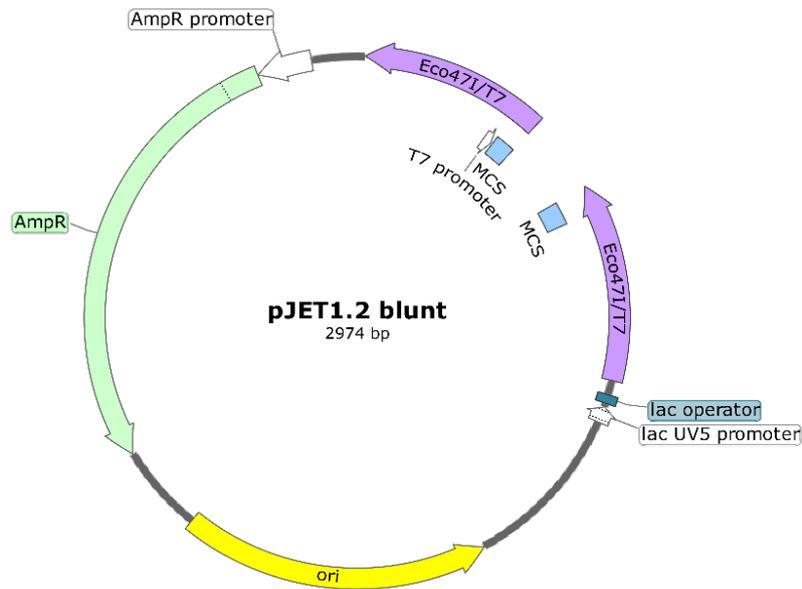


Figura 20. Vector plasmídico comercial pJET 1.2/blunt. Se emplea como vector transbordador en los clonajes de genes.

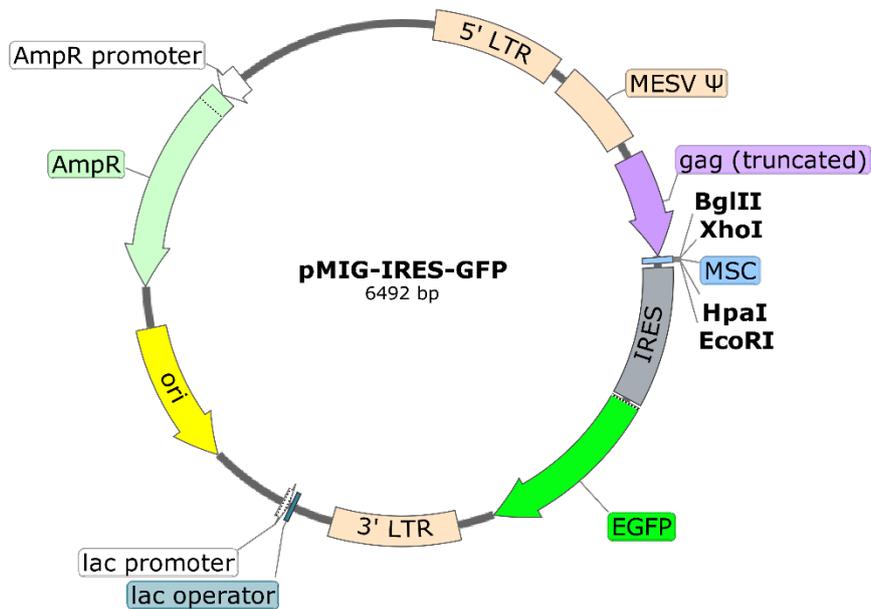


Figura 21. Plásmido pMIG-IRES-GFP. Fue empleado para el clonaje de la secuencia codificante completa de mVSIG3.

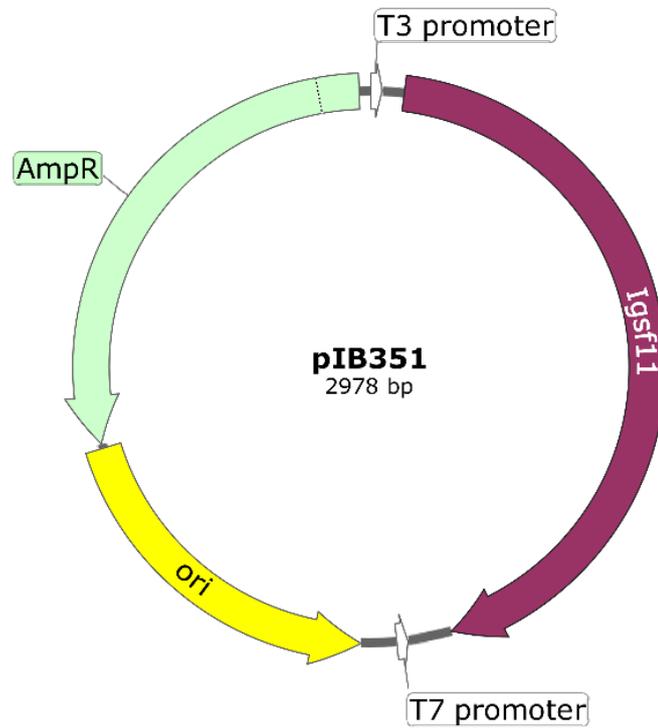


Figura 22. Plásmido pIB351. Se usó como molde para obtener las construcciones relacionadas con el VSIG3, al contener el CDS completo del mVSIG3 (mIGSF11).

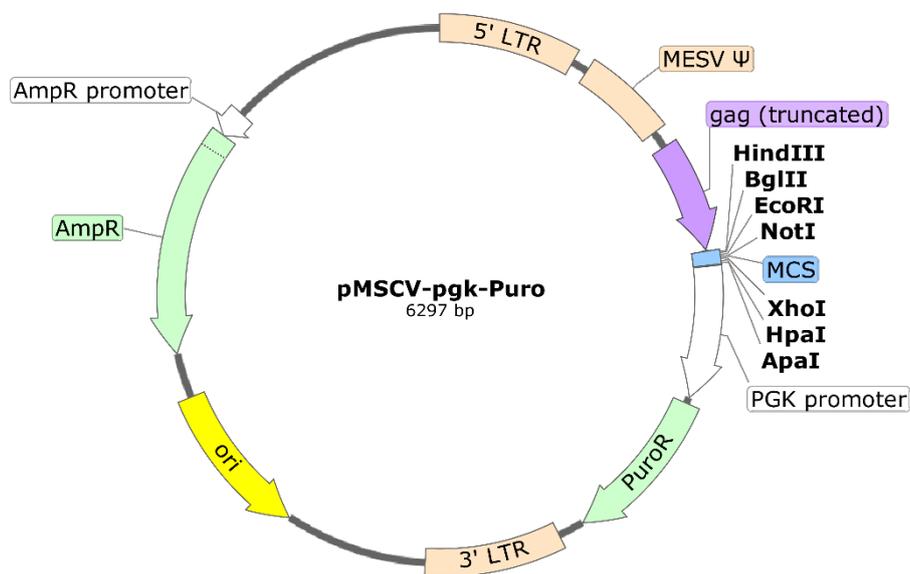


Figura 23. Plásmido MSCV-pgk-Puro. Fue empleado para el clonaje de la secuencia codificante completa del mPD-1H y del VSIG8.

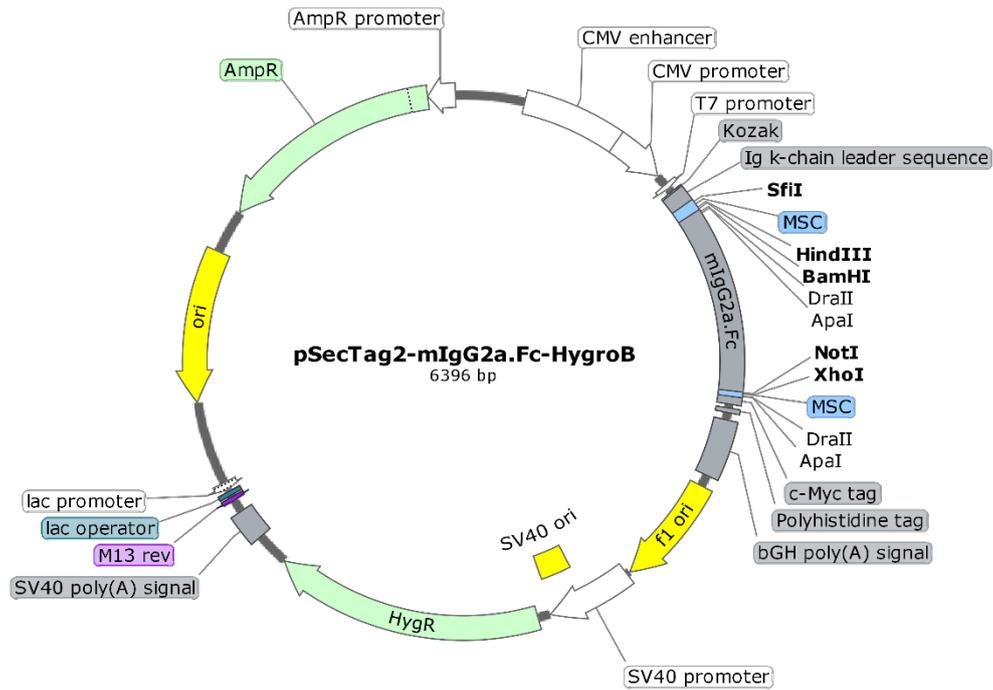


Figura 24. pSecTag2-mIgG2a.Fc-WT-HygroB. Se utilizó como vector destino para el clonaje de las proteínas solubles de mPD-1H, mVSIG3 y mVSIG8.

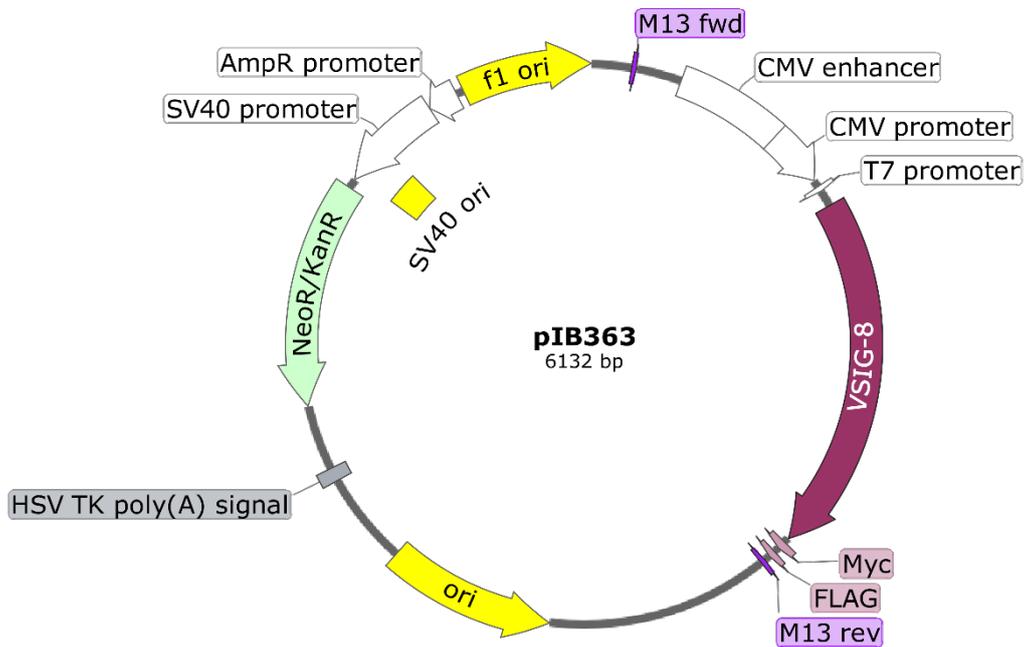


Figura 25. Plásmido pIB363. Vector comercial que codifica para el CDS completo de VSIG8. Fue utilizado como molde para la generación de la proteína completa y soluble de VSIG8 transcrito 1.

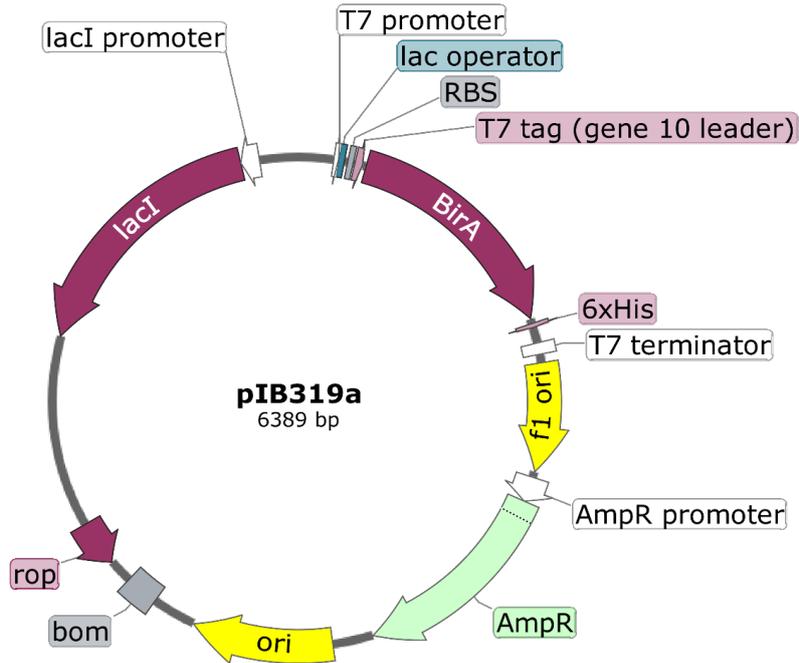


Figura 26. Plásmido pIB319a. Codifica para la proteína BirA capaz de biotinilar metabólicamente distintos péptidos aceptores de biotina.

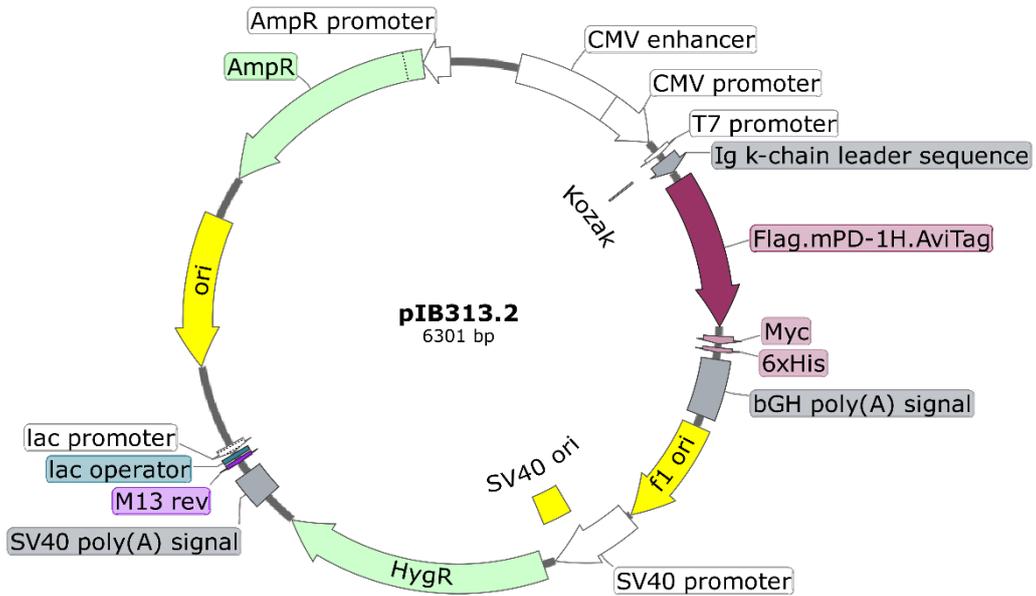


Figura 27. Plásmido pIB313.2. Vector que codifica para la proteína soluble FLAG-mPD-1H.AviTag.

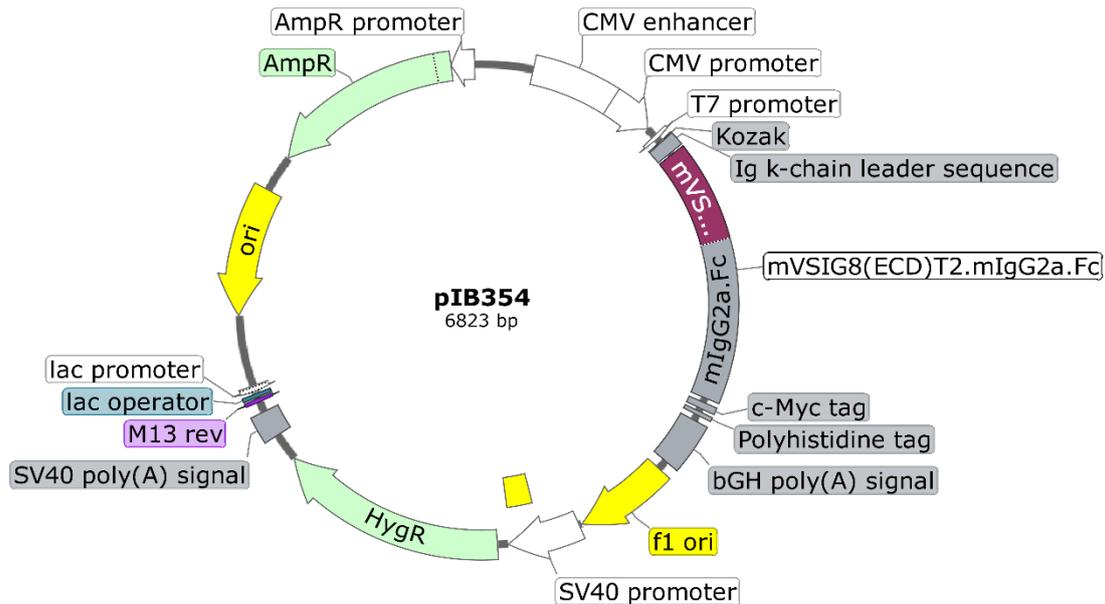


Figura 28. Plásmido pIB354. Vector que codifica para la proteína soluble mVSIG8 ECD (transcrito 2).mIgG2a-WT.

3.1.4 Extracción de plásmidos

En función de las necesidades de ADN plasmídico necesario se utilizó el kit comercial QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAagen) que permite obtener hasta 20 µg de ADN plasmídico, o el kit GeneJET® Plasmid Midiprep Kit, Protocol B (Thermo Scientific), con el que se pueden obtener hasta 200 µg. Para la extracción a menor escala, las bacterias se cultivaban en 5 ml de caldo LB-TB durante toda la noche a 37°C. Mientras que, para obtener mayores cantidades de ADN, se partía de caldos LB-TB de 25 ml. Ambos protocolos, se basan en una etapa de lisis alcalina, seguida de una precipitación de las proteínas y del material genómico. Finalmente, el ADN plasmídico del sobrenadante se hace pasar por columnas en las que queda adherido, tras lo cual se eluye con agua Milli-Q estéril o agua tratada DEPC. Tras la extracción, se tomaron alícuotas de cada muestra para cuantificar la concentración (ng/µL), mediante la medida de la absorbancia a 260 nm, y la pureza (ratio 260/280) en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). En el caso que los plásmidos se fueran a utilizar en cultivos celulares, éstos se extrajeron en condiciones de esterilidad y se tomaron alícuotas para testar la ausencia de microorganismos, antes de usarlos en las transfecciones.

3.1.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en el termociclador de Biometra modelo T.Professional Basic Gradient, que permite programar gradientes de temperatura

para optimizar las reacciones, o en el termociclador GeneAmp™ PCR System 9700 (Applied Biosystems). Los reactivos y las cantidades empleadas se resumen en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Cantidades de reactivos necesarias por reacción de PCR.

Reactivos	Unidad de reacción			Casa comercial
	PCR rutina	PCR Pfu	Concentración final	
Agua DEPC	Hasta volumen final de 25 µl		-	Braun Medical
Taq Búfer 10x	2,5 µl	-	1x	Biotools
Taq Búfer Pfu 10X	-	2,5 µl	1x	Thermo Fisher
dNTP mix (25 mM)	0,25 µl		0,25 mM	GeneOne
Cebadores (10 µM)	0,5 µl		5 pmol	Sigma
Taq polimerasa 5 U/µL	0,125 µl	-	625 mU/µl	Biotools
Taq Pfu polimerasa 2,5 U/µL	-	0,25 µl	625 mU/µl	Thermo Fisher
ADN molde	2 µl		50-100 ng	-

En las siguientes tablas, se recoge la información referente a las distintas proteínas recombinantes desarrolladas en el laboratorio durante este trabajo. En la **Tabla 9**, se resume la organización de la secuencia de aminoácidos de las proteínas, mientras que, en la **Tabla 10**, se indican las condiciones particulares de cada una de las reacciones de PCR utilizadas para la generación de las distintas construcciones recombinantes que permitieron obtener las proteínas recombinantes.

Tabla 9. Resumen de las proteínas recombinantes generadas.

Proteína recombinante	SP	ECD	TM	IC	Tag	Casete de selección	Esqueleto	Anexo I (pp.)
mPD-1H (309 AA)	AA ₁ -AA ₃₂	AA ³³ -AA ₁₉₁	AA ₁₉₂ -AA ₂₁₂	AA ₂₁₃ -AA ₃₀₉	-	Puromicina	pMSCV-puro	159-161
mVSIG3.Ig (515 AA)	AA ₁ -AA ₂₁	AA ₃₅ -AA ₂₅₂	-	-	mIgG2a.Fc WT, c-Myc, 6xHis	Higromicina	pSecTag2/hygroB	162-164
mVSIG8.Ig T1 (532 AA)	AA ₁ -AA ₂₁	AA ₂₇ -AA ₂₆₇	-	-	mIgG2a.Fc WT, c-Myc, 6xHis	Higromicina	pSecTag2/hygroB	165-167
mPSGL-1.Ig (557 AA)	AA ₁ -AA ₂₁	AA ₂₇ -AA ₂₉₂	-	-	mIgG2a.Fc WT, c-Myc, 6xHis	Higromicina	pSecTag2/hygroB	168-170
Flag.mVSIG3 (437 AA)	AA ₁ -AA ₂₂	AA ₃₁ -AA ₂₄₈	AA ₂₄₉ -AA ₂₆₉	AA ₂₇₀ -AA ₄₃₇	Flag	GFP	pMIG	171-173
mPD-1H.Ig (456 AA)	AA ₁ -AA ₂₁	AA ₃₅ -AA ₁₉₃	-	-	mIgG2a.Fc WT, c-Myc, 6xHis	Higromicina	pSecTag2/hygroB	174-175
mPD-1H.COMP (288 AA)	AA ₁ -AA ₂₁	AA ₅₂ -AA ₂₁₀	-	-	COMP, c-Myc, 6xHis	Higromicina	pSecTag2/hygroB	176-178
mVSIG8 (417 AA)	AA ₁ -AA ₂₁	AA ₂₂ -AA ₂₆₂	AA ₂₆₃ -AA ₂₈₃	AA ₂₈₄ -AA ₄₁₇	-	Puromicina	pMSCV-puro	179-181

En rojo, se indica si la secuencia correspondiente al péptido señal está presente en el vector.

SP: péptido señal; ECD: dominio extracelular; TM: dominio transmembrana; IC: dominio intracelular; Ig: mIgG2a.Fc; AA: aminoácidos; 6xHIS: tag de polihistidinas

Tabla 10. Condiciones particulares para cada reacción de PCR: construcción, cebadores y temperaturas de fusión e hibridación.

Construcción	Cebador	Secuencia (5'-3')	Temperatura de fusión	Temperatura de hibridación*
mPD-1H	pIB324F	AAAAGCTT GCCACC ATGGGTGTCC	70,9°C	55°C
	pIB324RC	GGCTCGAGTTAGATGGCTTCA	61,8°C	
pJET1.2-mPD-1H	pJET1.2F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	74°C	55°C
	pIB324RC	GGCTCGAGTTAGATGGCTTCA	61,8°C	
pIB324-pMSCV-mPD-1H-Puro	pLXSN**	CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC	62°C	55°C
	pIB324RC	GGCTCGAGTTAGATGGCTTCA	61,8°C	
mPD-1H ECD	pIB325F	AAAAGCTT GCCTTCAAGGTCAC	62°C	55°C
	pIB325RC	GTTGGATCC AGCCGTGATGCTGTCAC	73,5°C	
pJET1.2-mPD-1H (ECD)	pJET1.2F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	74°C	60°C
	pIB325RC	GTTGGATCC AGCCGTGATGCTGTCAC	73,5°C	
pIB325-pSecTag2-mPD-1H(ECD).IgG2a.Fc-WT-HygroB	pIB325F	AAAAGCTT GCCTTCAAGGTCAC	62°C	50°C
	BGH-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG	54°C	
mPD-1H SP-ECD-TM	pIB358F	AAT TAAAAGCTT ACCCTGCTCCTTGC	60°C	57°C
	pIB358R	AAGGATCC GGCCAGGGCCGCA	66°C	

Tabla 10. Condiciones particulares para cada reacción de PCR: construcción, cebadores y temperaturas de fusión e hibridación (continuación).

Construcción	Cebador	Secuencia (5'-3')	Temperatura de fusión	Temperatura de hibridación*
pJET1.2-mPD-1H (SP-ECD-TM)	pJET1.2F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	74°C	61°C
	pIB358R	AAGGATCCGGCCAGGGCCGCA	66°C	
COMP	COMP F	AAAGGATCCGACCTGGCCCCACAGATGCTGCGAGA ACTTCAGGA GACTAATGCGGCGCTGCAAGACGTGAGA	78°C	70°C
	COMP R	AAGCGGCCGCTCCGCAAGCATCACATTCCATCACCGTATTCTTCA GGAAGGTGATCTCCTTGACCTGCTGTCGCAACAGCTCTCTCAGGT CTTGC	80°C	
pJET1.2-COMP	pJET1.2F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	74°C	65°C
	COMP RC2	ATTTAAAGCGGCCGCTCCGCAAGCAT	71°C	
pIB360- pSecTag2-COMP-HygroB	T7**	TAATACGACTCACTATAGGG	48°C	50°C
	COMP RC2	ATTTAAAGCGGCCGCTCCGCAAGCAT	71°C	
pIB358-pSecTag2-mPD-1H (SP-ECD-TM).COMP-HygroB	pIB358F	AATTAAAAGCTTACCCTGCTCCTTGC	60°C	55°C
	COMP RC2	ATTTAAAGCGGCCGCTCCGCAAGCAT	71°C	
mVSIG3	pIB344F	CTCGAGGCCACCATGACTCGGCGGCGCTCCGCTCCGGCGTCTGG CTGCTCGTGTGCTGCTCGGTGTGCGAACATCCGATTACAAAGAC GATGACGATAAACTGGAAGTGTC	83°C	60°C
	pIB344RC	ATTGAATTCCTATACCAGGGACCCTGC	70,7°C	
pJET1.2-mVSIG3	pJET1.2F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	74°C	60°C
	pIB344RC	ATTGAATTCCTATACCAGGGACCCTGC	70,7°C	

Tabla 10. Condiciones particulares para cada reacción de PCR: construcción, cebadores y temperaturas de fusión e hibridación (continuación).

Construcción	Cebador	Secuencia (5'-3')	Temperatura de fusión	Temperatura de hibridación*
pIB344-pMIG-mVSIG3-IRES-GFP	pLXSN**	CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC	62°C	55°C
	pIB344RC	ATTGAATTCCTATACCAGGGACCCCTGC	70,7	
mVSIG3 ECD	pIB345F	AAAAGCTTCTGGAAGTGTCCGA	66°C	60°C
	pIB345RC	TTAGATCTAACGCTCCGGGG	65,1°C	
pJET1.2-mVSIG3 (ECD)	pJET1.2F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	74°C	60°C
	pIB345RC	TTAGATCTAACGCTCCGGGG	65,1°C	
pIB345- pSecTag2-mVSIG3(ECD).IgG2 a.Fc-WT-HygroB	pIB345F	AAAAGCTTCTGGAAGTGTCCGA	66°C	50°C
	BGH-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG	54°C	
mVSIG8	pIB366F	AAAAGCTTGGCACCATGGGAGTTCG	48°C	43°C
	pIB366RC	CCCTCGAGTTACACTAAGAGGCCGT	52°C	
pJET1.2-mVSIG8	pJET1.2F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	74°C	45°C
	pIB366RC	CCCTCGAGTTACACTAAGAGGCCGT	52°C	
pIB366-pMSCV-mVSIG8-Puro	pLXSN**	CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC	62°C	45°C
	pIB366RC	CCCTCGAGTTACACTAAGAGGCCGT	52°C	

Tabla 10. Condiciones particulares para cada reacción de PCR: construcción, cebadores y temperaturas de fusión e hibridación (continuación).

Construcción	Cebador	Secuencia (5'-3')	Temperatura de fusión	Temperatura de hibridación*
mVSIG8 ECD	pIB367F	ATCGGCC <u>CAGCCGGCC</u> <i>GTAAGGATCAAC</i>	40°C	40°C
	PIB354RC	CGTAAAGCIT <u>GCCTACTCGCTG</u>	48°C	
pJET1.2-mVSIG8 (ECD)	pJET1.2F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	74°C	44°C
	PIB354RC	CGTAAAGCIT <u>GCCTACTCGCTG</u>	48°C	
pIB367-pSecTag2-mVSIG8 (ECD).IgG2a.Fc-WT-HygroB	pIB367F	CCCGGCC <u>CAGCCGGCC</u> <i>GTAAGGATCAAC</i>	40°C	40°C
	BGH-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG	54°C	

NOTA: En negrita se indican las bases adicionales añadidas, subrayado las secuencias para las dianas de restricción, en rojo la secuencia kozak y en cursiva las bases correspondientes a secuencias de los genes. Sombreado en naranja se indican las construcciones genéticas recombinantes finales.

*Temperatura a la que se llevó a cabo la hibridación de los cebadores.

**Cebadores utilizados para secuenciación.

Las condiciones generales de PCR, indicadas en la **Tabla 11**, se modificaron para cada reacción, adecuándose a las temperaturas de fusión de cada pareja de cebadores utilizada y al tamaño del fragmento a amplificar.

Tabla 11. Condiciones generales de PCR.

Desnaturalización inicial		Ciclos (x30)						Extensión final	
		Desnaturalización		Hibridación		Extensión			
95°C	1 min	95°C	20 s	≈ Tm-5°	20 s	72°C	1 min/kb	72°C	3 min

Tm: Temperatura de fusión.

3.1.6 Digestión con enzimas de restricción

Para la consecución de las construcciones genéticas utilizadas en este trabajo y la comprobación de que éstas portaban los genes de interés, se realizaron varias digestiones con diferentes enzimas de restricción. Los insertos de interés se obtuvieron a partir de digestiones del vector transbordador pJET1.2, en el que previamente se habían clonado los amplicones de PCR.

Las diferentes digestiones se realizaron siguiendo las indicaciones de los fabricantes. A continuación, en la **Tabla 12**, se recogen las enzimas y los búferes de digestión utilizados.

Tabla 12. Descripción de las reacciones de digestión realizadas.

Enzima de restricción	Sitio de corte	Búfer	Condiciones de digestión	Casa comercial
1 µl <i>XhoI</i> (10U/µL)	5'...C/TCGAG...3'	5 µl Búfer H (10x)	90 min a 37°C	Roche
1 µl <i>HindIII</i> (10U/µL)	5'...A/AGCTT...3'	5 µl Búfer Red (10x)	90 min a 37°C	Fermentas
1 µl <i>BamHI</i> (10U/µL)	5'...G/GATCC...3'	5 µl Búfer Red (10x)	90 min a 37°C	Fermentas
1 µl <i>EcoRI</i> (10U/µL)	5'...G/AATTC...3'	5 µl Búfer único (10x)	90 min a 37°C	Fermentas
1 µl <i>BglII</i> (10U/µL)	5'...A/GATCT...3'	5 µl Búfer Red (10x)	90 min a 37°C	Fermentas
1 µl <i>SfiI</i> - (10U/µL)	5'...GGCCNNNN/NGGCC...3'	5 µl Búfer Tango (10x)	90 min a 50°C	Fermentas

Los productos de las digestiones se cargaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1%, para su purificación, o en geles de agarosa regular al 1%, para comprobar la liberación de los insertos.

3.1.7 Electroforesis en gel de agarosa

El análisis cualitativo y semicuantitativo del ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa regular. En cambio, para la purificación de fragmentos de ADN de

interés, se empleó agarosa de bajo punto de fusión. Las concentraciones de la agarosa (peso/volumen) oscilaron entre el 0,8% y el 1,5%, en función de los tamaños de los fragmentos de ADN, siendo más concentrado para los fragmentos más pequeños. Los geles se prepararon de acuerdo con las indicaciones de la **Tabla 13**, a los que se añadió RedSafe (iNtRON Biotechnology) como agente intercalante del ADN. Para las muestras, se usó el búfer de carga Orange 6X (Thermo Scientific), a una concentración final de 1x, y como marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). La técnica electroforética, se realizó en cubetas (Biorad) conectadas a una fuente de alimentación PowerPac Basic (BioRad), aplicando una corriente continua que osciló entre 80 y 90 V durante 30-40 minutos. Los geles fueron fotografiados mediante el sistema de video *Chemidoc* y el software *Quantity One*, ambos de BioRad.

Tabla 13. Relación de reactivos para la preparación de geles de agarosa al 1,2%.

Gel de agarosa (para 1,2%)	
Agarosa	1,2 g
TBE 10 x	10 mL
Agua destilada	hasta 0,1 L
Búfer Tris Borato EDTA (TBE)	
Trizma Base (Sigma)	54 g
Ácido bórico (Sigma)	27,5 g
EDTA 0,5M pH 8,0	2 mL
Agua destilada	hasta 1 L

3.1.8 Purificación de bandas de ADN en gel de agarosa

Las purificaciones de ADN a partir de bandas de gel de agarosa de bajo punto de fusión, se realizaron mediante el kit comercial QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

3.1.9 Ligación

Previo a la reacción de ligación, se determinó la concentración de ADN tanto por espectrofotometría como por electroforesis en geles de agarosa. La medición espectrofotométrica, nos dio una estimación de la concentración de ADN, mientras que la electroforesis nos permitió confirmar el tamaño molecular y comparar la intensidad de las bandas del inserto y del vector. De esta manera, teniendo en cuenta estos dos parámetros, se estimó la ratio molar (relación entre inserto-vector), para llevar a cabo las reacciones de ligación (**Tabla 14**). La ratio mínima usada fue 3:1.

Tabla 14. Relación de reactivos para las reacciones de ligación.

Ligación inserto-vector transbordador		Ligación inserto-vector destino	
Inserto	Hasta 8,5 μ L	Inserto	X μ L
Vector de clonaje (pJET1.2.) (Thermo)	0,5 μ L	Vector destino	Y μ L
T4 ADN ligasa (Roche)	1 μ L	T4 ADN ligasa (Roche)	1 μ L
Búfer ligación 2x (Thermo)	10 μ L	Búfer ligación 5x	4 μ L
Volumen final	20 μ L	Volumen final	20 μ L
10 min a 22°C. Desactivación 5 min a 70°C		20 min a 22°C. Desactivación 5 min a 70°C	

X e Y representan la cantidad de inserto y vector destino necesaria para cumplir la ratio mínima 3:1 para la ligación, que se determina para cada reacción individual.

3.1.10 Transformación bacteriana mediante choque térmico

Para la obtención de ADN plasmídico, se transformaron bacterias *Escherichia coli* TOP 10, a las que previamente se les había inducido competencia, siguiendo el método de Hanahan¹²⁸. Posteriormente, se almacenaron a -80°C hasta su uso.

La transformación de las bacterias se realizó por choque térmico. Se descongelaron células de *E. coli* competentes en hielo, a razón de 100 μ L por tubo, adicionando 50-100 ng de ADN plasmídico circular o el producto de las reacciones de ligación. A continuación, se mantuvieron en hielo durante 30 minutos, para más tarde aplicar un choque térmico de 42°C durante 45 segundos y, así, favorecer la entrada del plásmido en la célula. Inmediatamente después, se transfirieron de nuevo a hielo durante un minuto. Pasado este periodo de tiempo, se añadieron 400 μ L de medio SOC y se agitaron a 37°C durante una hora para permitir su recuperación. A continuación, se sembraron alícuotas de 200 μ L en placas de medio sólido LB-TB (medio LB y TB al 50% con agar a razón de 20 g/l) con 50 μ g/ml de carbenicilina. Finalmente, se incubaron a 37°C toda la noche.

Con el fin de identificar aquellas colonias transformadas que incorporaron el plásmido de interés, se seleccionaron varias colonias para testar por PCR. Cada colonia seleccionada, se diluyó en 50 μ l de agua milli-Q en tubos de PCR y se hirvieron durante 5 minutos a 95°C. A continuación, las muestras se centrifugaron y se tomaron 2 μ l del sobrenadante como molde para las PCR. Las colonias que resultaron positivas, aquellas que habían incorporado el plásmido de interés, se expandieron y se utilizaron para la producción de ADN plasmídico.

3.1.11 Secuenciación

La secuenciación de ADN fue realizada en el secuenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems) en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de León, donde

utilizaron el kit MegaBACE DYEamic ET dye terminator kit (Amersham Biosciences), con eliminación de terminadores mediante precipitación con etanol o mediante el kit AutoSeq 96 Dye Terminator Clean-up (Amersham Biosciences).

3.2 Cultivos celulares

El trabajo con cultivos celulares se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en cabina de seguridad biológica de clase II (Telstar BIOSTAR). Por otro lado, las incubaciones se realizaron en un incubador humidificado de Thermo Fisher Scientific con filtro HEPA, a 37°C y atmósfera de 5% de CO₂.

3.2.1 Reactivos y medios de cultivo

Los medios utilizados para el cultivo de las células se indican en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Medios utilizados y composición.

Medio	Composición
RPMI 1640	RPMI 1640 (Gibco) 10,42 g, NaHCO ₃ (Sigma) 2 g, agua Mili-Q hasta 1 L. pH 7,4.
RPMI 1640 completo	Suero fetal bovino (Gibco) 7-10%, coctel (2 mM L-glutamina (Gibco), 1 mM piruvato sódico, 10 mM HEPES, 50 µg/mL gentamicina, 50 µM β-mercaptoetanol) y RPMI 1640 (Gibco) hasta 1 L.
PBS Dulbecco's	Libre de Mg ²⁺ y Ca ²⁺ . KCl (Sigma) 0,2 g, KH ₂ PO ₄ (Sigma) 0,2 g, NaCl (Sigma) 8 g, Na ₂ HPO ₄ (Sigma) 1,15 g y agua Milli-Q 1 L.
Opti-MEM (Gibco)	Modificación del medio mínimo esencial de Eagle, al que se le ha añadido HEPES, bicarbonato sódico, hipoxantina, timidina, piruvato sódico, L-glutamina y factores de crecimiento.
Medio de congelación	Dimetilsulfóxido (Sigma) 10% en suero fetal bovino.

3.2.2 Líneas celulares y condiciones de crecimiento

Las líneas empleadas se crecieron en placas de 9 cm o 15 cm de diámetro de superficie adherente y medio RPMI 1640 completo. Se mantuvieron en el incubador y se procedió al cambio del medio cada 2-3 días, en función de la densidad celular y el color del medio observado. Durante el trabajo, se utilizaron las líneas celulares que se indican en la **Tabla 16**:

Tabla 16. Relación de líneas celulares utilizadas.

Línea celular	Descripción	Procedencia
HEK293T	Línea celular derivada de células de riñón de embriones humanos	ATCC
NIH3T3	Línea celular generada a partir fibroblastos originarios de tejido embrionario murino	ATCC
platE	Línea celular obtenida por modificación de la línea celular HEK293T.	MTA
CHO	Línea celular obtenida a partir de células de ovario de hámster chino.	ATCC
J774A1	Línea celular de macrófagos de sarcoma reticular murino de la cepa BALB/c (haplotipo H-2 ^d)	MTA
RAW264.7	Línea celular de macrófagos establecida desde un tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abselon en ratones BALB/c (haplotipo H-2 ^d).	MTA
EL-4	Línea celular de timoma murino.	MTA

ATCC: Colección americana de cultivos tipo; MTA: Acuerdo de transferencia de materiales

Todas las líneas utilizadas, se testaron periódicamente para comprobar la ausencia de micoplasma.

3.2.3 Congelación y descongelación

Para congelar las células, es necesario que éstas se encuentren en crecimiento exponencial y buena viabilidad, por lo que es importante renovar el medio de cultivo el día anterior a proceder a su congelación. Además, el proceso de bajada de temperatura se debe llevar a cabo de forma gradual para evitar que se produzca daño celular. En cambio, el proceso de descongelación se realiza de manera rápida (**Tabla 17**).

Tabla 17. Protocolos de congelación y descongelación de viales.

Congelación gradual de células	Descongelación rápida de viales
<ol style="list-style-type: none"> 1. Recoger las células en un tubo Falcon. 2. Centrifugar a 1.200 rpm durante 5 min. 3. Resuspender el pellet en medio de congelación (1 mL/vial). 4. Introducir los viales en un contenedor de congelación (Mr. Frosty, Thermo Scientific) que se mantendrá a -80°C durante al menos 5 horas. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Introducir el vial de células en agua a 37°C hasta que la descongelación sea casi completa. 2. Añadir al vial medio completo atemperado. 3. Pasar el contenido del vial a un tubo Falcon y añadir hasta 6 ml de medio completo atemperado. 4. Centrifugar a 1.200 rpm durante 5 min. 5. Tras la centrifugación, resuspender las células en medio completo y sembrarlas en placas con medio de cultivo fresco.

3.2.4 Recuento de células

Para determinar el número de células totales, se utilizó el recuento en cámara de Neubauer y el protocolo de Phelan, utilizando azul de tripán como colorante vital, para determinar la viabilidad celular¹²⁹.

3.2.5 Expresión en células eucariotas de los genes de interés

Se emplearon dos métodos diferentes para la expresión de genes de interés, en función de si el objetivo era la expresión transitoria o la expresión estable de los mismos. Para la expresión transitoria de los genes de interés, se empleó la transfección mediante lipofección, mientras que para la expresión estable se utilizó la transducción viral.

3.2.5.1 Transfección transitoria mediante lipofección

La transfección mediante lipofección, se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y ADN. El complejo está cargado positivamente en su superficie, lo que le permite interactuar con la membrana de la célula, de carga opuesta, y de esta manera, se facilita la entrada del ADN en el citosol por un proceso de tipo endocítico (**Figura 29**).

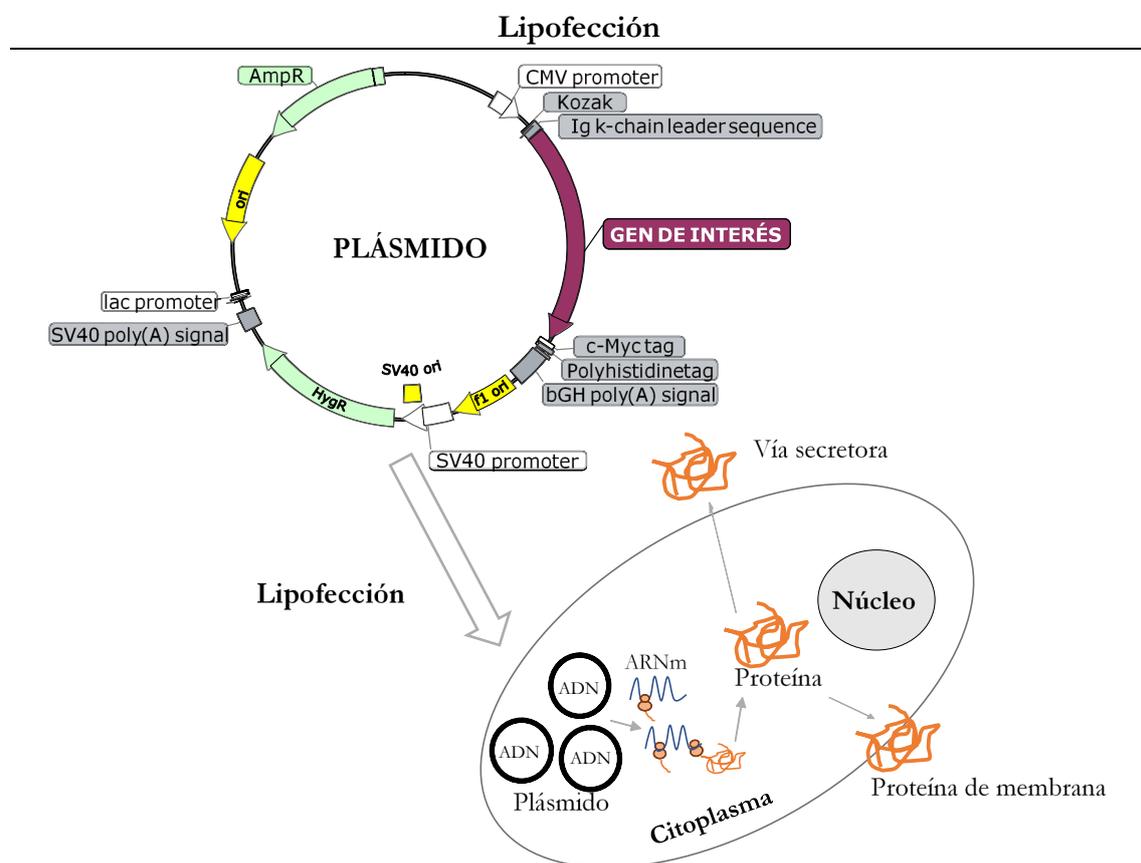


Figura 29. Transfección mediante lipofección. El plásmido se incuba con los liposomas, para formar un complejo ADN-liposomas que puede atravesar la membrana de la célula, liberando el plásmido en el citosol.

3.2.5.2 Transfección estable mediante transducción viral

La transducción viral es un método mediante el cual se consigue la expresión estable de genes de interés, ya que, en este caso, el ADN se integra en el genoma de la célula diana, en lugar de permanecer en forma de episoma (**Figura 30**).

Transducción retroviral

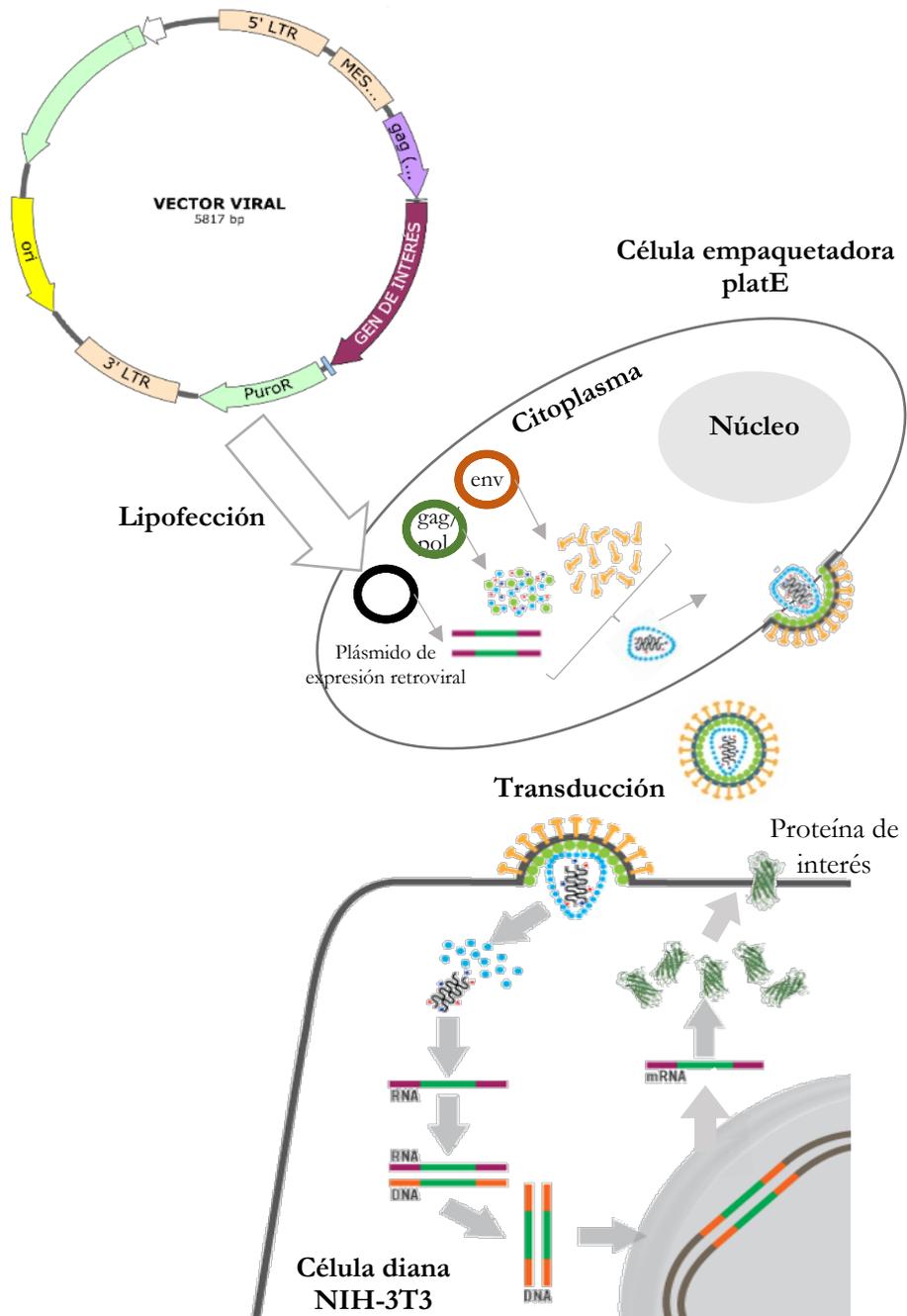


Figura 30. Procedimiento general de transducción con vectores retrovirales ecotrópicos. Para la producción de las partículas virales, se transfecta la línea celular empaquetadora platE con el plásmido retroviral que codifica el gen de interés. Aproximadamente 48 horas después de la transfección, se recogen los sobrenadantes que contienen las partículas virales y se utilizan para transducir la célula diana. Posteriormente, se seleccionan las células transducidas en función de la expresión de la molécula de interés y de la expresión de genes reporteros o de resistencia a antibióticos.

En la **Tabla 18** se detallan los protocolos empleados en este trabajo. El día previo a la transfección o a la transducción, se añadió medio completo fresco a las células y se comprobó que éstas estuvieran en fase de crecimiento exponencial.

Tabla 18. Protocolo de transfección (izquierda) y transducción (derecha) de células adherentes.

Transfección (placa 6 pocillos)	Transducción de células adherentes (placa 6 pocillos)
<ol style="list-style-type: none"> 1. Reactivos por pocillo (mezcla de transfección): <ul style="list-style-type: none"> - 200 μL OptiMEM (Gibco) - 3 μg de ADN - 9 μg de lipofectamina 2. Se incuba la mezcla 30 minutos a temperatura ambiente. 3. Durante la incubación, se retira el medio de las células a transfectar y se añaden 2 mL de RPMI basal, sin aditivos. 4. Transcurrido el tiempo, se retira el RPMI y se adiciona la mezcla de transfección junto con 800 μL de OptiMEM. 5. Se deja la placa en el incubador hasta el día siguiente. 6. Se sustituye el medio por medio RPMI completo a las 16-24 horas y se comprueba la transfección. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Se transfectan las células empaquetadoras, platE, con un vector retroviral, siguiendo el protocolo anterior. 2. A las 48-72 h se recoge el sobrenadante de la transfección, donde se han liberado las partículas virales, y se centrifuga a 2000 rpm durante 5 min para eliminar los restos no deseados. 3. Se filtra el sobrenadante con las partículas virales con membranas de 0,45 μm. 4. Se añade, a partes iguales, sobrenadante y medio de cultivo fresco a las células NIH-3T3 a transducir. 5. Se adiciona 8 μg/mL de polybrene (Sigma). 6. Se mueven las placas, con cuidado, para repartir el polímero por la superficie.

El día previo al proceso de transfección, se sustituye el medio de cultivo por medio completo libre de antibióticos de selección.

Las células empaquetadoras platE, deben cultivarse en presencia de los antibióticos puromicina (Puro) y blastidina (Blast), como marcadores de selección, a concentraciones de 5 μ g/ml y 25 μ g/ml, respectivamente. Estas células, tienen integrados en su genoma dos construcciones genéticas: pGag-pol-IRES-bs^r, que porta los genes *gag*, *pol* y el gen de resistencia a blastidina, y pEnv-IRES-puro^r, con el gen *env* y el gen de resistencia a puromicina¹³⁰.

3.2.6 Generación de líneas celulares

A lo largo de este trabajo, se generaron las siguientes líneas celulares mediante el uso de vectores retrovirales o de expresión (**Tabla 19**).

Tabla 19. Líneas celulares generadas en el laboratorio.

Línea	Proceso	Descripción
NIH-3T3-mPD-1H	Vectores retrovirales	Línea que expresa la proteína de membrana mPD-1H.
CHO-mPD-1H.Ig	Transfección	Línea que secreta la proteína recombinante soluble mPD-1H.IgG2a
NIH-3T3-Flag.mVSIG3	Vectores retrovirales	Línea que expresa la proteína de membrana mVSIG3.
CHO-mVSIG3.Ig	Transfección	Línea que secreta la proteína recombinante soluble mVSIG3.IgG2a
NIH-3T3-mVSIG8	Vectores retrovirales	Línea que expresa la proteína de membrana mVSIG8.

3.2.6.1 Determinación de la dosis mínima inhibitoria del crecimiento en distintas líneas celulares expuestas a medios selectivos

Para la generación de líneas celulares estables que expresaran las proteínas de interés, se realizaron pruebas de sensibilidad a higromicina B y puromicina, con la finalidad de determinar la concentración del antibiótico mínima capaz de inducir toxicidad y muerte de las células que no fueran transfectadas/transducidas.

Para testar la dosis mínima, se sembraron las células en placa de 6 pocillos a razón de 50.000 células/pocillo, a las que se les añadieron concentraciones decrecientes de antibiótico. Para la higromicina B, se utilizaron las concentraciones de 500 µg/mL, 400 µg/mL, 300 µg/mL, 200 µg/mL y 100 µg/mL, y en el caso de la puromicina, 10µg/mL, 5µg/mL, 2,5µg/mL, 1,25µg/mL y 0,75µg/mL. La placa se incubó a 37°C y se comprobó regularmente, mediante azul de tripán y citometría de flujo, la viabilidad de las células.

3.2.6.2 Generación de líneas celulares productoras de proteína recombinante soluble

Tras determinar la concentración óptima de antibiótico, las células CHO (SACE) transfectadas, se seleccionaron en medio con higromicina, y los transfectantes estables restantes, se clonaron por dilución límite. Utilizando placas de 6 pocillos, se transfectaron las células con las construcciones elegidas, dejando un pocillo sin transfectar como control negativo. A las 24 horas, se reemplazó el medio de transfección por medio completo fresco y, a las 48 horas post-transfección, se añadió el antibiótico a la concentración previamente determinada. Se realizaron cambios de medio cada 3-4 días y, periódicamente, se analizó la viabilidad de las células por citometría de flujo, hasta que sólo quedaron las células seleccionadas resistentes al antibiótico. En el siguiente paso, se llevó a cabo un clonaje por dilución límite en placas de 96 pocillos sembrando una célula por pocillo. El seguimiento de los clones, se efectuó a través del microscopio óptico invertido hasta que alcanzaron un tamaño suficiente para analizar mediante ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a

enzimas) sándwich la producción de proteína recombinante soluble. Aquellos clones más eficientes, a la hora de producir la proteína recombinante de interés, son los que fueron seleccionados.

3.2.6.3 Generación de líneas celulares para la expresión de proteínas de membrana

Para la generación de líneas celulares que expresaran en la superficie proteínas de interés como proteínas de membrana, se emplearon vectores retrovirales. Las células fueron seleccionadas en función de la expresión de diferentes genes de selección, resistencia a puromicina o expresión de proteína verde fluorescente (GFP). En el caso de la selección por expresión de GFP, las células fueron clonadas en placas de 96 pocillos a una célula por pocillo a las 72 horas post-transducción, siguiendo el proceso mediante microscopio de fluorescencia. En el caso de la selección con antibiótico, éste se añadió a las células a las 48 horas post-transducción y se realizaron cambios de medio cada 3-4 días. La viabilidad de las células se fue analizando por citometría de flujo hasta que sólo quedaron las células resistentes al antibiótico. Las células resistentes fueron clonadas en placas de 96 pocillos a una célula por pocillo. En ambos casos, cuando los clones alcanzaron un tamaño determinado, se analizó la expresión de la proteína de membrana por citometría de flujo.

3.2.7 Aislamiento de células hematopoyéticas

Los ratones utilizados para el aislamiento de las suspensiones celulares fueron sacrificados mediante la liberación paulatina de CO₂, tras lo cual, fueron extraídos el bazo, el timo y los nódulos linfáticos periféricos (inguinales, braquiales y axilares). Una vez obtenidos los diferentes órganos, se lavaron con D-PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ durante unos segundos en una placa y se disgregaron de manera mecánica forzando el paso de las células a través de una malla de nylon, con ayuda de unas pinzas. Para eliminar los glóbulos rojos presentes, éstos se lisaron en 1 ml de la solución de lisis ACK (amonio-cloruro-potasio), durante 2 minutos, añadiendo después 7 ml de medio completo para frenar el proceso. Tras este tiempo, las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 7 minutos, se resuspendieron de nuevo en medio completo y se contaron para dejarlas a la concentración adecuada. Esta concentración fue dependiente del uso posterior que se le dieron a las suspensiones celulares obtenidas.

3.2.8 Aislamiento de macrófagos peritoneales de ratones Balb/c

Tras la eutanasia de los ratones utilizados mediante la liberación paulatina de CO₂, con ayuda de unas pinzas y unas tijeras, se expuso la cavidad peritoneal cortando y retirando

con cuidado la piel externa. A continuación, utilizando una jeringuilla, se inyectaron hasta 5 ml de PBS o búfer de macrófagos, previamente enfriados, en la cavidad peritoneal con cuidado de no perforar ningún órgano. Tras masajear con cuidado el peritoneo, para liberar cualquier célula adherida, se insertó de nuevo la jeringuilla para recolectar el líquido, evitando succionar grasa o cualquier órgano que obstruiría la aguja. Para recoger el líquido restante, se hizo un corte en la piel del peritoneo y se utilizó una pipeta Pasteur de plástico. Por último, las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 7 minutos y se dejaron a la concentración adecuada para llevar a cabo los ensayos posteriores, resuspendiéndolas en medio completo.

3.2.9 Protocolo de activación celular

Para la activación de las suspensiones celulares obtenidas de bazo (esplenocitos) se utilizaron diferentes estímulos, entre los que se incluían la incubación con anti-CD3 y anti-CD28, la mezcla PMA-Ionomicina y concanavalina A (ConA). En cambio, las líneas celulares de macrófagos se estimularon con liposacárido (LPS). En la **Tabla 20** se resumen los protocolos de activación celular utilizados para cada uno de los estímulos.

Tabla 20. Protocolos de activación celular.

Activación con anti-CD3 y anti- CD28
1. Se diluye el anticuerpo anti-CD3 a la concentración de 2µg/ml en D-PBS.
2. Se distribuye por la superficie de varios pocillos de placa de 96 y la placa se almacena horizontalmente a 4°C toda la noche.
3. Se retira el anticuerpo y se lava la placa dos veces con D-PBS.
4. Para activar las células, los esplenocitos se resuspenden en medio completo y se dispensa en la placa a la concentración de 2x10 ⁵ cel./pocillo.
5. Se añade a cada pocillo el anticuerpo anti-CD28 a la concentración de 2µg/ml.
6. Se incuban las placas a 37°C durante 24-48h.
Activación con ConA
1. Se dispensan los esplenocitos a la concentración de 10 ⁶ cel./ml.
2. Se añaden 2µg/ml de ConA y se incuban las placas a 37°C durante 24-48h.
Activación con PMA-Ionomicina
3. Se dispensan los esplenocitos a la concentración de 10 ⁶ cel./ml.
4. Se añade PMA a 50 ng/ml e Ionomicina a 500 ng/ml y se incuban las placas a 37°C durante 24-48h.
Activación con LPS
1. La línea celular de macrófagos, J774A1 o RAW264.7, se dispensa en varios pocillos de placa de 96 a la concentración de 2x10 ⁵ cel./pocillo.
2. Se añade a cada pocillo LPS a 1µg/ml y se incuban las placas a 37°C durante 48h.

3.2.10 Citometría de flujo

La adquisición de las muestras se realizó en un citómetro modelo CyAn ADAP 9 (Beckman Coulter, Inc.). Los datos fueron recogidos utilizando el software Summit 4.3

(Beckman Coulter, Inc.) y analizados mediante el software FlowJo 10.0.8r1 (FlowJo, LLC) o el Summit 4.3.

3.2.10.1 Protocolo de tinción

De manera general, los anticuerpos marcados se incubaron junto con las células durante 15-20 minutos. En el caso de las proteínas recombinantes, la incubación fue de 40 minutos. Sobre los anticuerpos marcados con biotina, o sin marcar, y las proteínas recombinantes, se requirió una nueva incubación durante 15 minutos con anticuerpos secundarios marcados o con conjugados de estreptavidina unida a fluorocromos. Tras cada periodo de incubación, se realizó un lavado de las células con FACS buffer (PBS con un 2% de suero fetal bovino), para eliminar los anticuerpos no unidos, centrifugándose las células a 2000 rpm durante 2 minutos. Al terminar el último lavado, las células se resuspendieron en FACS búfer, se filtraron y se añadió 15 μ L de ioduro de propidio (IP) (Sigma) a cada tubo, para poder distinguir las células muertas de las vivas. Para conseguir las condiciones óptimas de adquisición, previamente se analizaron las suspensiones celulares control sin teñir y se emplearon controles de isotipo para discriminar la autofluorescencia adquirida por las células en cultivo. En la **Tabla 21** se indican los anticuerpos utilizados para las tinciones.

Tabla 21. Anticuerpos empleados para la tinción de las distintas células.

Molécula	Clon	Fluorocromo	Casa comercial	Dilución
CD80	16-10A1	Biotina	BD Bioscience	1 μ g/ml
CD86	B7-2	Biotina	BD Bioscience	1 μ g/ml
ICOS-L	HK5.3	Biotina	BD Bioscience	1 μ g/ml
H-2K ^d	SF1-1.1	Biotina	Biologend	1 μ g/ml
IA/IE	M5/114.15.2	PE	Pharmingen	1/400
PD-L1	MIH5	Biotina	eBiosciences	1 μ g/ml
PD-L2	TY25	Biotina	eBiosciences	1 μ g/ml
CD40	HM40-3	Biotina	Biologend	1 μ g/ml
OX-40	OX-86	Biotina	eBiosciences	1 μ g/ml
H-2K ^b	AF6-88.5	Biotina	Biologend	1 μ g/ml
CD3	17A2	Alexa 488	Biologend	1/400
CD3	17A2	Biotina	Biologend	1 μ g/ml
CD4	GK1.5	APC	Biologend	1/800
CD4	GK1.5	Biotina	Biologend	1 μ g/ml
CD8	53-6.7	PE-Cy7	Biologend	1/400
CD8	53-6.7	PercP	Biologend	1/400
B220	RA3-6B2	PercP	Biologend	1/400
CD49b (PanNK)	DX5	APC	Biologend	1/800
NK1.1	PK136	Biotina	Biologend	1 μ g/ml
TCR- β	H-57	Biotina	Biologend	1 μ g/ml
TCR- β	H-57	FITC	Biologend	1/400
CD25	PC61	Biotina	Biologend	1 μ g/ml

Tabla 21. Anticuerpos empleados para la tinción de las distintas células (continuación).

Molécula	Clon	Fluorocromo	Casa comercial	Dilución
CD25	PC61	PE	Biolegend	1/400
CD11b	M1/70	FITC	Biolegend	1/400
CD11c	HL3	Biotina	Biolegend	1 µg/ml
VISTA	MIH64	PE	BD Bioscience	1/400
Isotipo	-	PE	Biolegend	1/400
Flag	M2	Biotina	Sigma	1 µg/ml
Flag	L5	-	Santa Cruz	1 µg/ml
c-Myc	9E10	-	Invitrogen	1 µg/ml
c-Myc	9E10	Biotina	Invitrogen	3 µg/ml
mouse IgG1	A85-1	Biotina	Pharmigen	1 µg/ml
mouse IgG2a	R19-15	Biotina	Pharmigen	1 µg/ml
SA-PE	-	PE	Biolegend	1/800
SA-BV-421	-	BV-421	Biolegend	1/800

3.2.11 Microscopía

Se usó el microscopio Nikon modelo eclipse TS100 para observar y contar las células.

3.3 Producción de proteína recombinante soluble

Para la producción de proteína recombinante, se utilizaron las líneas celulares HEK293T y CHO SACE. La línea HEK293T permitió la producción de proteína recombinante soluble mediante transfección transitoria. Mientras que la línea CHO SACE, se utilizó para generar una línea celular que produjera de manera estable la proteína soluble.

3.3.1 Detección de proteína recombinante mediante ELISA

Tras la transfección de las diferentes líneas celulares para la producción de proteína recombinante, se comprobó por ELISA que la proteína se estuviera secretando al medio de cultivo. Para ello, se recogió sobrenadante de cultivo de células, transfectadas y no transfectadas, que se utilizó como muestra para el ELISA, siguiendo el esquema general de la **Figura 31**. El sobrenadante de las células no transfectadas, se utilizó como control negativo, mientras que, como control positivo, se usó una proteína recombinante de concentración conocida, que contenía el fragmento Fc de la IgG2a murina.

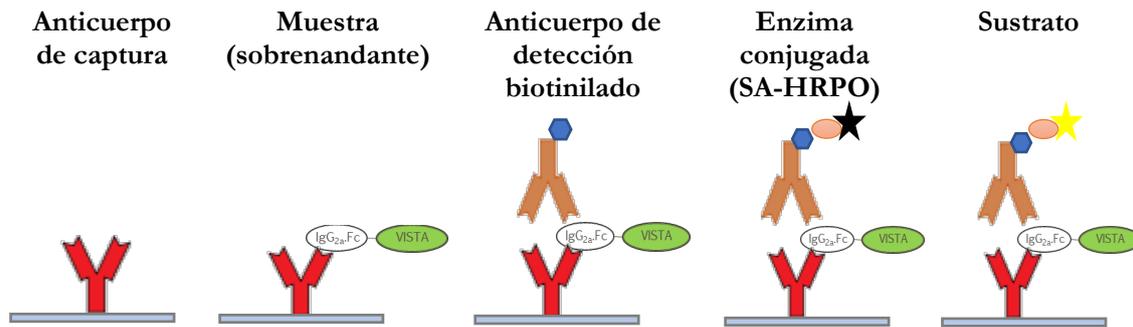


Figura 31. Secuencia de pasos del ELISA sándwich. Tras tapizar la placa con el anticuerpo de captura, se incuba la muestra de sobrenadante, cuya unión se detecta con un anticuerpo biotinilado. A continuación, se incuba con el conjugado de estreptavidina-peroxidasa (SA-HRPO) y la reacción se revela al añadir el sustrato de la enzima.

En la **Tabla 22** se indica el protocolo detallado seguido para llevar a cabo el ELISA sándwich.

Tabla 22. Protocolo ELISA sandwich para sobrenadantes.

ELISA sandwich para sobrenadantes
1. Tapizar la placa con 50 μ l anticuerpo de captura a 2,5 μ g/ml.
2. Cubrir la placa con parafilm e incubar ON a 4°C.
3. Retirar el sobrenadante y añadir 250 μ l de búfer de bloqueo , cubrir la placa e incubar durante 1 h a 37°C.
4. Retirar el búfer de bloqueo de la placa, secarla bien y añadir las muestras y los estándares. Cubrir la placa con parafilm incubar 1 hora a 37°C.
5. Retirar el sobrenadante y lavar la placa con 200 μ l de búfer de lavado 3 veces.
6. Añadir 50 μ l de anticuerpo de detección a 0,5 μ g/ml, cubrir e incubar 1 hora a 37°C.
7. Retirar el sobrenadante y lavar la placa con 200 μ l de búfer de lavado 3 veces.
8. Añadir 50 μ l de enzima conjugada. SA-HRPO (estreptavidina-peroxidasa de rábano picante) , a la placa, cubrir e incubar 15 min en oscuridad a RT.
9. Retirar el sobrenadante y lavar la placa con 200 μ l de búfer de lavado 5 veces.
10. Añadir 100 μ l del sustrato de la enzima, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), diluido en búfer de acetato sódico.
NOTA: Descongelar y atemperar el búfer acetato en el momento de usar.
11. Incubar la placa a RT en oscuridad hasta que aparece color en los pocillos control negativos (10-30 minutos).
12. Detener la reacción añadiendo 50 μ l de solución STOP (H ₂ SO ₄ 2M)
13. Leer la placa en un lector ELISA a una absorbancia de 450nm.

Una vez analizados los resultados obtenidos tras el ELISA, se estimó la concentración de la proteína producida extrapolando la información a partir de la curva patrón obtenida, para la que se usó como patrón una proteína de concentración conocida, mTL1a.Ig (**Figura 32**).

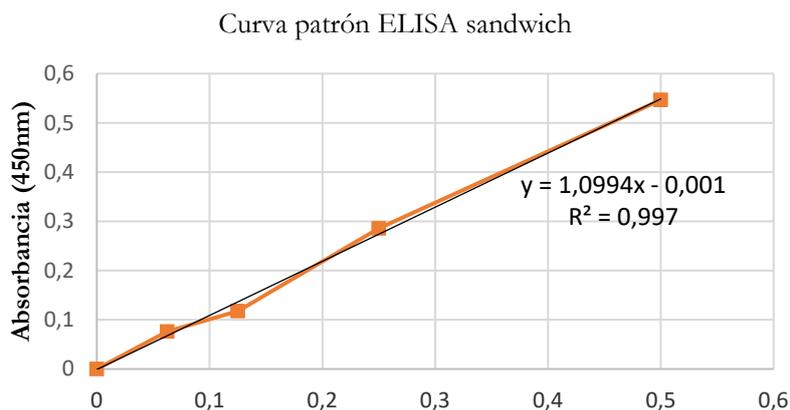


Figura 32. Curva patrón ELISA sándwich mTL1a.Ig. Para la determinación de la concentración de proteína en los sobrenadantes se utilizaron concentraciones decrecientes de la proteína recombinante de concentración conocida mTL1a.IgG2a.

En la **Tabla 23**, se resumen los anticuerpos, primarios y secundarios, y conjugados utilizados para los ensayos:

Tabla 23. Anticuerpos de captura y detección utilizados.

Molécula	Clon	Fluorocromo	Casa comercial	Dilución
Anti Flag	M2	Biotina	Sigma	0,5 µg/ml
Anti Flag	L5	-	Santa Cruz	2,5 µg/ml
Anti IgG2a	R11-89	-	Pharmigen	2,5 µg/ml
Anti IgG2a	R19-15	Biotina	Pharmigen	0,5 µg/ml
Anti c-Myc	9E10	-	Invitrogen	0,5 µg/ml
Anti c-Myc-	9E10	Biotina	Invitrogen	3 µg/ml
Anti IgG1	A85-1	Biotina	Pharmigen	0,5 µg/ml
SA-HPRO		HRPO	Pharmigen	1/800

Los reactivos necesarios para llevar a cabo el ensayo se describen en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Reactivos requeridos para el ensayo ELISA sándwich.

Reactivos	Composición
Búfer de bloqueo: PBS 1X-BSA 1% (0,5 L)	5 g albúmina sérica bovina (BSA) liofilizada (Sigma). PBS 1X (dilución 1:10 con agua destilada a partir de PBS10X de Gibco), hasta volumen final de 0,5 L
Solución estreptavidina-HRPO 1:5000	Estreptavidina-HRPO de alta sensibilidad (BD Biosciences) diluida en PBS-1X.
PBS 1X-Tween 0,05% (1 L)	0,5 mL Tween 20 (Sigma). PBS 1X
Solución de sustrato (5 mL)	25 µL de solución sustrato TMB (Thermo Fisher Scientific). 1 µL de agua oxigenada 30%. Búfer acetato sódico 0,1 M hasta volumen final de 5 mL

3.3.2 Purificación de proteínas recombinantes solubles

La cromatografía de afinidad es el método más robusto y frecuente para la purificación de proteínas. Esta técnica de separación, se basa en la unión específica de una proteína a un ligando adsorbido a una matriz inerte (fase estacionaria). La alta selectividad del proceso se produce al permitir que la molécula deseada interactúe con la fase estacionaria y quede retenida en la columna, para separarse del material no deseado que pasa a través de la misma¹³¹. La unión puede ser directa o a través del tag que se haya incorporado a la molécula de interés. De esta manera, las proteínas pueden ser purificadas por cromatografía de afinidad de manera selectiva, usando un ligando específico para una proteína que lleve un tag determinado. En el caso que el ligando específico empleado sea un anticuerpo, la técnica se denomina de inmunoafinidad. En una cromatografía de afinidad no selectiva, el ligando se une a un grupo de proteínas con afinidades por la proteína G, como es el caso de las regiones Fc de las inmunoglobulinas, o a través de metales inmovilizados (IMAC), como por ejemplo, las proteínas con colas de histidina al níquel¹³². En ambos tipos de cromatografía, selectiva o no, las proteínas se pasan a través de una columna que favorece la unión entre la proteína y su ligando. A continuación, se lava la columna para eliminar las interacciones no específicas de la matriz. La proteína unida es entonces eluída de la columna, utilizando un búfer que contiene una molécula que compite con la proteína desplanzándola o empleando condiciones que rompen todas las interacciones proteína/proteína, como una caída brusca de pH y fuerza iónica. Estos métodos pueden afectar la estabilidad de la proteína, por lo que es necesario que la proteína eluída sea neutralizada inmediatamente o diluida para minimizar el daño¹³³.

La cromatografía de inmunoafinidad se puede aplicar a una gama más amplia de proteínas y no necesitan ser marcadas con tags, mejorando la eficacia del proceso de purificación. Además de la rapidez, el uso de estrategias de purificación de inmunoafinidad puede aliviar muchos de los problemas asociados con la cromatografía convencional. Sin embargo, depende de la disponibilidad de anticuerpos con afinidad y especificidad adecuadas¹³³.

Las proteínas recombinantes producidas en este trabajo, se purificaron mediante cromatografía de afinidad e inmunoafinidad. Se utilizaron columnas con matriz de sefarosa unida a proteína G, columnas de níquel y columnas de agarosa unida a anticuerpos anti Flag M2. En la **Figura 33**, se ejemplifica el procedimiento general para la purificación mediante cromatografía de afinidad.

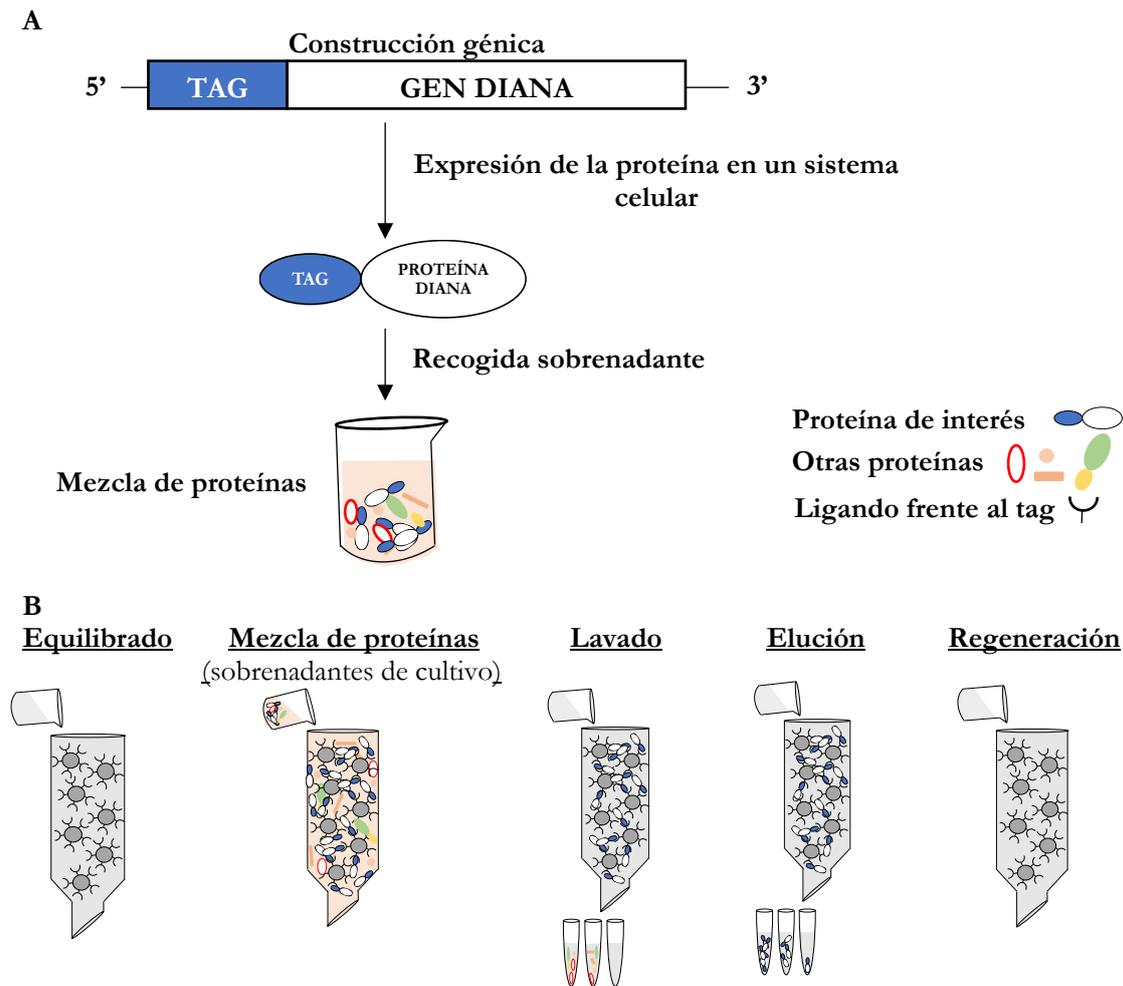


Figura 33. Estrategia general para la purificación de proteínas marcadas con tags, basado en la cromatografía de afinidad. A. Recolección de sobrenadante de cultivo tras la transfección de la construcción de interés en un sistema celular para la producción de proteína soluble. **B.** Secuencia de pasos a seguir para la purificación de proteínas solubles mediante cromatografía de inmunofinidad en columna a partir de sobrenadantes de cultivo.

El protocolo de la cromatografía de afinidad, seguido para la purificación de las proteínas recombinantes generadas, se describe en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Protocolo para la purificación de proteínas a través de cromatografía de afinidad proteína G.

Preparación de la columna
Separar aproximadamente 250 ml de búfer de unión a una botella aparte. Hacer pasar por la columna 10 volúmenes de columna de búfer de unión.
Paso por la columna
Una vez lavada la columna, pasar el sobrenadante filtrado con la proteína recombinante producida. Se dan al menos dos pases completos de todo el sobrenadante a una velocidad de 3 ml/min por el día y, se puede dejar, a 1,3 ml/min por la noche. Una vez pasado todo el volumen, se vuelve a lavar la columna con 10 volúmenes de columna de búfer de unión.

Tabla 25. Protocolo para la purificación de proteínas a través de cromatografía de afinidad proteína G (continuación).

Elución
Las eluciones se recogen en tubos de citometría a los que previamente se les añaden 200 µl de búfer de neutralización. Tras el lavado de la columna, se retirará por la parte de arriba el exceso de búfer de unión con cuidado y ayuda de una pipeta y se purgará la línea. A continuación, se conecta el búfer de elución y se recogen 8 fracciones de aproximadamente 3 ml cada una.
Limpieza
Tras la elución, se deja pasar más búfer de elución para terminar de limpiar la columna y, después, se debe pasar de nuevo búfer de unión. Una vez limpia la columna, se mantiene en búfer de unión al que se añade azida sódica a 0,02%

Para la purificación, se requirió la preparación de los reactivos indicados en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Reactivos para la purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad.

Búfer de unión: 50 mM sodium phosphate, pH 7 (Igs de ratón)	
Solución A	
NaH ₂ PO ₄ + H ₂ O	3 g
Agua destilada	500 ml
Solución B	
Na ₂ HPO ₄	3,55 g
Agua destilada	500 ml
Preparar la solución A y añadir solución B hasta alcanzar el pH de 7.	
Búfer de elución: 0.1 M Glycine-HCl, pH 2.7	
Glicina	3,75 g
Agua destilada	500 ml
Ajustar con HCl 1N hasta pH 2,7	
Búfer de neutralización: 1 M Tris-HCl pH 9	
Trizma base	24,2 g
Agua destilada	200 ml
Ajustar con HCl hasta pH 9	

3.3.3 Análisis de las proteínas recombinantes por electroforesis en geles de acrilamida

El análisis de las fracciones de proteína, tras la purificación de las proteínas recombinantes, se realizó mediante *immunoblot* después de separar las muestras mediante electroforesis en geles de poli(acrilamida) en condiciones desnaturizantes, SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Como muestra, se utilizaron las fracciones cruda, no adsorbida, de lavado y eluida de la cromatografía de afinidad.

Las muestras se prepararon mezclándolas al 50% con búfer de carga reductor y no reductor (10 µl/muestra). A continuación, se hirvieron durante 5 minutos y se cargaron en geles de poliacrilamida al 12% para separar las proteínas mediante electroforesis (**Tabla 27 y 28**). Tras la separación, se comprobaron las bandas de las proteínas en las diferentes fracciones mediante tinción de los geles con azul de Coomassie. Una vez comprobado, se llevó a cabo una nueva electroforesis con las mismas muestras para realizar el *immunoblot*. Seguidamente a la electroforesis, el gel se incubó en búfer de transferencia durante 20-30 minutos. A continuación, la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizó en el mismo búfer de transferencia durante 60 minutos a 120 V. Una vez transferidas las proteínas, las membranas se bloquearon con leche en polvo descremada al 10% disuelta en búfer TBS durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la membrana se incubó durante 1 hora con el anticuerpo biotinilado, anti-IgG2a, anti-Flag M2 o anti-c-Myc, diluido en leche descremada al 5% en TTBS. La membrana se lavó durante 45 minutos con TTBS y, por último, se incubó 30 minutos con estreptavidina-HRPO en leche descremada al 5% en TTBS. Tras lavar de nuevo con TTBS, se llevó a cabo la detección de los complejos antígeno-anticuerpo mediante ECL, sustrato comercial de la peroxidasa. Este compuesto consta de dos reactivos, que se mezclaron a partes iguales y se incubaron con la membrana. La presencia de actividad peroxidasa, transforma el sustrato en una señal quimioluminiscente que se capturó sobre una película fotográfica.

Tabla 27. Relación de reactivos necesarios para la preparación de geles SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) al 8%

Gel separador		Gel apelmazador	
Reactivo	Cantidad (ml)	Reactivo	Cantidad (ml)
Agua destilada	2,3	Agua destilada	0,68
Solución acrilamida bisacrilamida 30%	1,3	Solución acrilamida bisacrilamida 30%	0,17
Solución separadora 1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,3	Solución separadora 1,5 M Tris-HCl pH 8,8	0,13
Solución 10% SDS	0,05	Solución 10% SDS	0,01
Solución 10% persulfato amónico	0,05	Solución 10% persulfato amónico	0,01
Temed	0,003	Temed	0,001

Tabla 28. Protocolo y reactivos necesarios para la tinción y decoloración de geles de poliacrilamida.

Tinción	
1. Una vez finalizada la electroforesis, retirar el gel del casete y colocarlo en un recipiente hermético de plástico.	
2. Añadir 50 ml de la solución de tinción	
3. Incubar toda la noche a temperatura ambiente en agitación continua.	
Decoloración	
1. Desteñir en 50 ml de solución 30% metanol-10% acético-60% agua destilada durante una hora en agitación continua.	
2. Repetir el procedimiento dos o tres veces más hasta que aparezcan las bandas teñidas de azul y el fondo casi transparente.	
Lavado	
1. Incubar durante 1 h en agua destilada.	
2. Fotografiar o escanear.	
Solución Coomassie blue	
Coomassie blue R-250 (0,25%)	0,625 g
Metanol	200 ml
Ácido acético	50 ml
Agua destilada	250 ml

En las **Tablas 29 y 30** se recoge la información necesaria para la elaboración de los reactivos que se utilizaron en la electroforesis y en el *immunoblot*.

Tabla 29. Reactivos necesarios para la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Preparación de los geles	
Reactivo	Preparación
Solución acrilamida bisacrilamida 30%	Pesar 30 g de acrilamida y 0,8 g de bis-acrilamida Disolver en 100 ml de agua bidestilada Filtrar por papel Whatman o esterilizar por filtro de 0,22 micras
Gel apelmazador (stacking) búfer: 0,5 M Tris-HCl. pH 6,8	6,06 g de Trizma Base en agua bidestilada (50 ml) Ajustar el pH a 6,8 con HCl y llevar a un volumen final de 100 ml.
Gel separador (resolving) búfer: 1.5 M Tris-HCl pH 8.8	18,18 g de Trizma Base en agua bidestilada (50 ml) Ajustar el pH a 8,8 con HCl y llevar a un volumen final de 100 ml.
Solución 10%SDS	10 g de SDS en 100 ml de agua destilada
Solución 10% persulfato amónico	0,1 g de persulfato amónico en un Eppendorf con 1 ml de agua destilada. Preparar fresca cada vez que se necesite.
Temed	BIO-RAD
Preparación del búfer de electroforesis	
Reactivo	Preparación
Running buffer de electroforesis (2x)	0.05 M de Tris 12,0 g
	0.38 M Glicina 57 g
	0.2% SDS 4 g
	Agua destilada 2 l
	El pH debería ser entre 8,2 y 8,3. No ajustar. Antes de usar diluir ½ para obtener el búfer 1X.

Tabla 29. Reactivos necesarios para la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (continuación).

Preparación de las muestras	
Reactivo	Preparación
Búfer de carga (2x)	No reductor 3,55 ml Agua destilada 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (pH 7,58) 2,5 ml Glycerol 2,0 ml 10% (w/v) SDS 0,2 ml 0,5% (w/v) azul de bromofenol En un volumen final de 9,5 ml
	Reductor Añadir 50 µl de β-mercaptoetanol a 950 µl de búfer no reductor.

Mezclar la muestra diluida ½ con búfer de carga (no reductor o reductor).

Tabla 30. Reactivos requeridos para el *immunoblot*.

Reactivo	Preparación
Búfer de transferencia 25 mM Tris + 192 mM Glicina + metanol al 20%	3,03 g Tris 14,4 g Glicina Hasta 800 ml de agua destilada 200 ml metanol
TBS 1x	Disolver 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl y 3 g de Trizma base en 800 ml de agua destilada. Ajustar primero el pH a 8 con HCl 1N y, después, el volumen a 1 L con agua destilada.
TTBS 1x	TBS 1x más 0,1% Tween 20 (Sigma)
Solución de bloqueo	10% Leche descremada (polvo) en TBS 1x.
Solución de lavado	5% Leche descremada (polvo) en TTBS 1x.
Anticuerpo	Rata anti-ratón IgG2a-biotina (0,5 µg/ml) Ratón IgG1 anti-Flag M2-biotina (0,5 µg/ml) Ratón IgG1 anti-c-Myc Rata anti-ratón IgG1-biotina (0,5 µg/ml)
Enzima	SA-HPRO (1/2500)
Sustrato	ECL (Amersham)

RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Patrón de expresión de PD-1H en células hematopoyéticas y linfoides en condiciones homeostáticas y tras la activación con estímulos policlonales

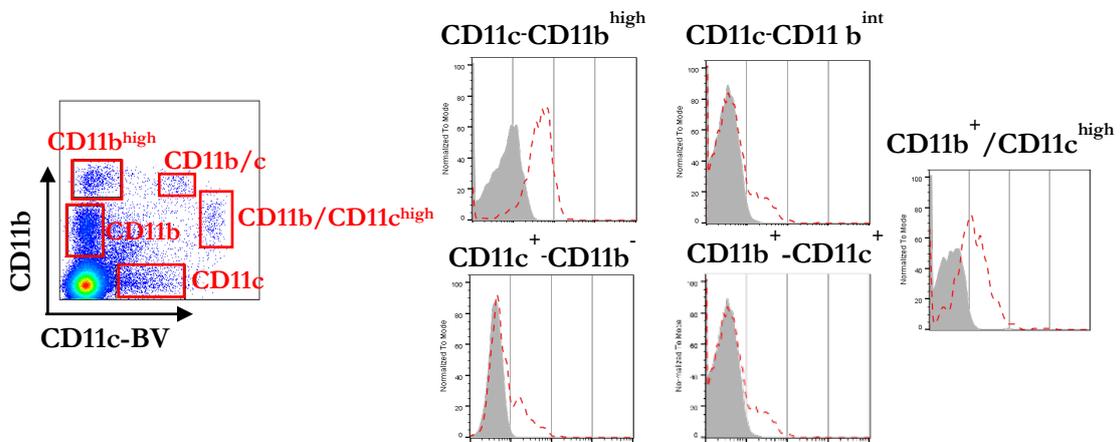
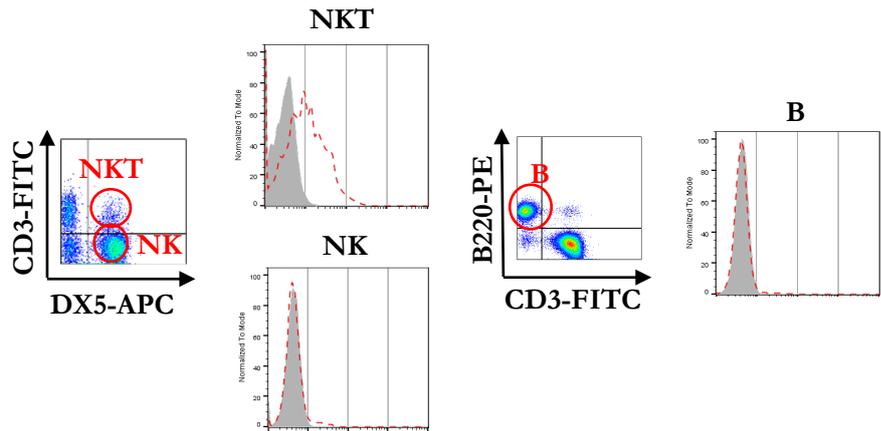
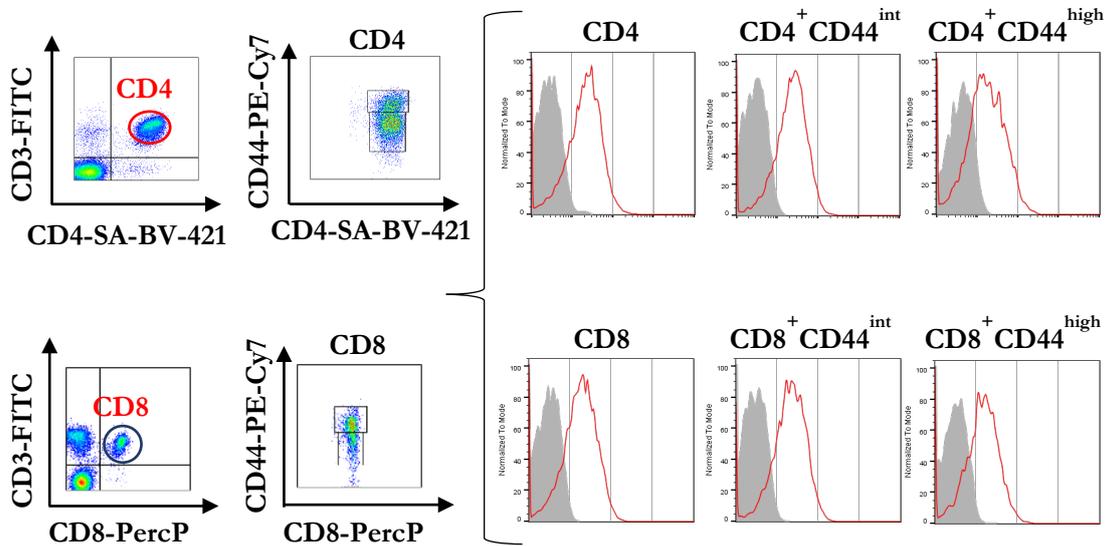
Analizamos la expresión de mPD-1H de membrana en distintos tipos celulares obtenidos de timo (órgano linfoide primario), bazo y nódulos linfáticos periféricos (órganos linfoides secundarios), para determinar la distribución de la expresión de la proteína en las diferentes poblaciones celulares del sistema inmunitario. Se prepararon suspensiones celulares mediante disgregación mecánica de estos órganos y, posteriormente, se lisaron los glóbulos rojos. Las células se tiñeron con un cóctel de anticuerpos para distinguir las distintas poblaciones celulares en estos compartimentos tisulares y se analizó la expresión de PD-1H.

La expresión de PD-1H se detectaba tanto en células de origen linfoide como mieloides, encontrándose una mayor expresión de la proteína en las células T y en las células mieloides CD11b^{high}. En cambio, las células B y NK mostraron una tinción negativa para este receptor (**Figura 34A**). También se comprobó cómo la expresión de PD-1H variaba en los mismos tipos celulares analizados en diferentes órganos linfoides, siendo mayor en las células T CD4 y CD8 del bazo, que en las células T inmaduras del timo (**Figura 34B-D**). La expresión de PD-1H no aumentó tras la estimulación linfocitaria, con anti-CD3 en combinación con anti-CD28, siendo mayor en células frescas que en células mantenidas en cultivo. *In vitro* la expresión de PD-1H se redujo tanto en las células T CD4 como en las células T CD8 (**Figura 34E**).

A

Bazo

■ Isotipo PE
 □ Anti PD-1H-PE



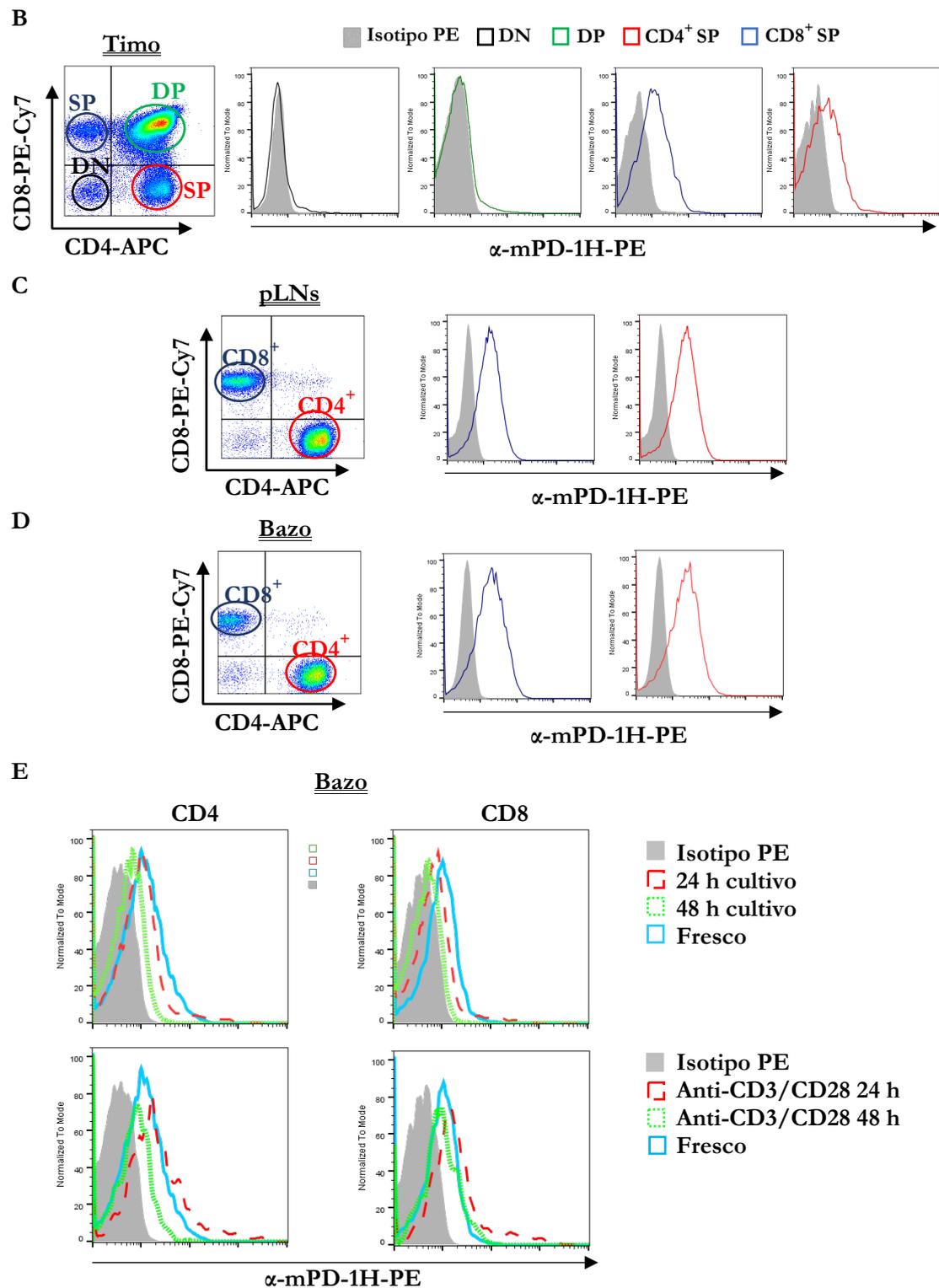


Figura 34. Patrones de expresión de PD-1H en células hematopoyéticas de ratones Balb/c.
A. En el bazo, PD-1H se expresa constitutivamente tanto en las células T, como en las células mieloides y NKT, mientras que no se detecta expresión en células B o NK. **B.** Las células dobles negativas (DN) y dobles positivas (DP) para CD4 y CD8 del timo no expresan PD-1H. La expresión de PD-1H en las células T naive CD4 SP y CD8 SP del timo es menor a la que se detecta en pLN's (**C**) y bazo (**D**). **E.** La expresión de PD-1H en células T, CD4 y CD8 de bazo, disminuye con el tiempo en cultivo y no aumenta en células estimuladas con anti-CD3 (2 µg/ml), unido a placa, y anti-CD28 (2 µg/ml) soluble. Se muestran datos de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados.

A continuación, estudiamos si la expresión de PD-1H aumentaba con otros estímulos policlonales más potentes, como la ConA y la combinación de PMA más ionomicina. Se analizó la expresión de PD-1H, tras la estimulación linfocitaria a tiempos más cortos, para analizar la evolución temprana de la expresión de mPD-1H. Se observó que se produce un incremento de expresión del receptor en las primeras 2-4 horas. Este aumento de expresión fue ligeramente superior en las células estimuladas con PMA en combinación con ionomicina que en el control (**Figura 35**).

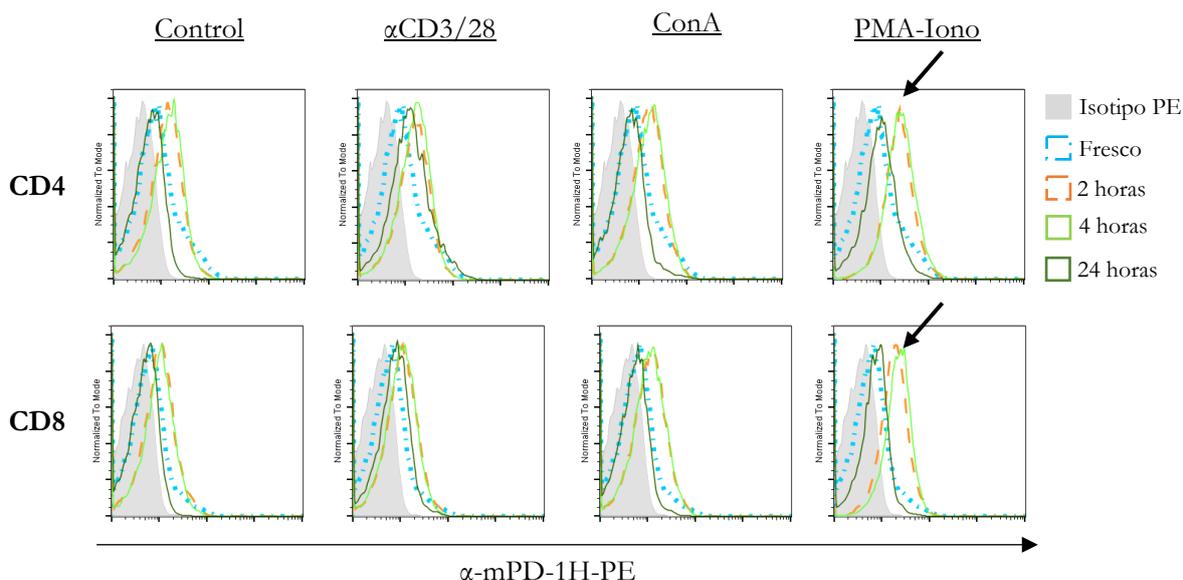


Figura 35. Aumento de la expresión de mPD-1H tras dos horas en cultivo. La expresión de PD-1H en células T, CD4 y CD8 de bazo, aumenta hasta su máximo tras dos horas en cultivo *in vitro*. Esta expresión, fue ligeramente superior en las células estimuladas con PMA (50 ng/ml) y Ionomicina (500 ng/ml), para luego decaer hasta los niveles basales observados en el análisis de las células recién extraídas. No se observa ninguna diferencia, entre las células no estimuladas y las estimuladas con anti-CD3 (2 µg/ml), unido a placa, y anti-CD28 (2 µg/ml) soluble o con ConA. Se muestran datos de un experimento representativo de dos experimentos independientes realizados.

4.2 Expresión de PD-1H en líneas celulares de macrófagos murinos

Como la mayor expresión de mPD-1H se observa en células mieloides CD11b del bazo, a continuación, analizamos la expresión de PD-1H en células obtenidas de la cavidad peritoneal y evaluamos si la expresión variaba en función de la línea de macrófagos analizada.

Dentro de la cavidad peritoneal se observó como la expresión de PD-1H variaba en función de la subpoblación de células CD11b analizada, siendo más elevada en aquellas que expresaban un nivel más alto de CD11b (**Figura 36**).

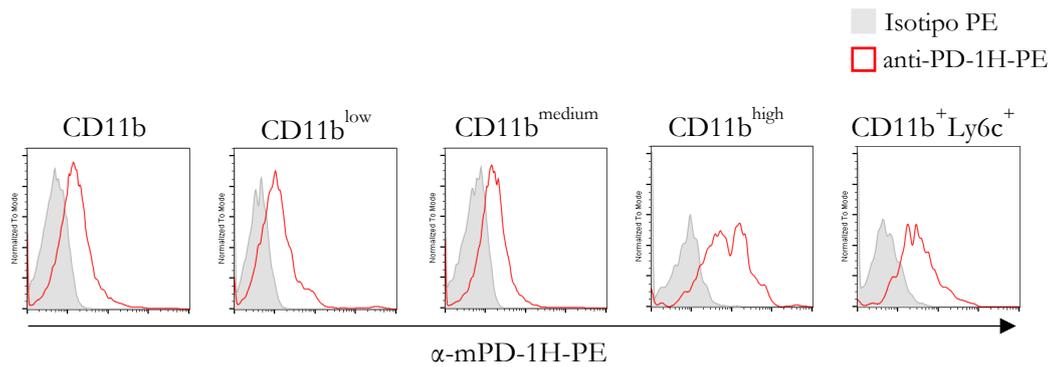
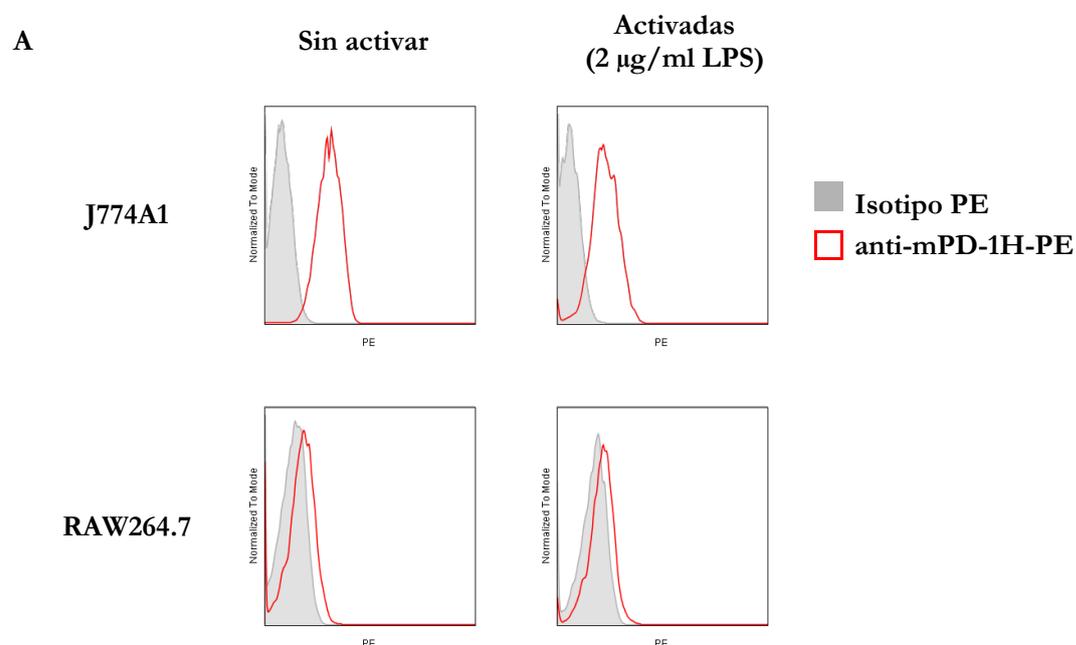


Figura 36. Expresión de PD-1H en células mieloides CD11b de la cavidad peritoneal de ratones Balb/c. La expresión constitutiva de PD-1H en células CD11b varía en función de la subpoblación analizada, siendo más elevada en las células CD11b^{high}. Se muestran datos de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados.

En las líneas de macrófagos analizadas, se detectó que PD-1H se expresaba de manera constitutiva en la línea de macrófagos J774A1, mientras que en la línea RAW264.7, la expresión detectada fue mínima (**Figura 37A**). En ambos casos, la expresión de PD-1H no aumentó tras la exposición a LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 48 h. Por otro lado, a la concentración utilizada (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) no se detectó la unión de la proteína Flag.mPD-1H ni en células en reposo, ni tras la activación, lo que sugiere que el ligando del receptor PD-1H está ausente en estas dos líneas celulares estudiadas (**Figura 37B**).



B

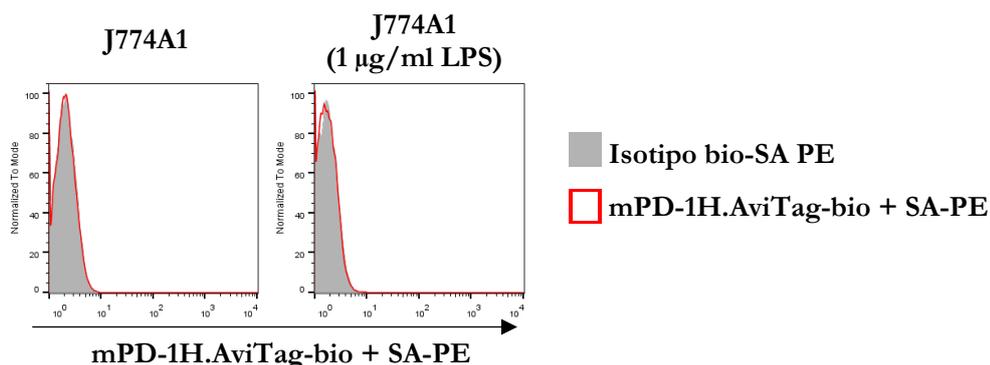


Figura 37. Expresión de mPD-1H en las líneas de macrófagos J774A1 y RAW264.7. A. La línea J774A1 expresa niveles superiores de mPD-1H en comparación con la línea RAW264.7, en las que únicamente se detecta una ligera expresión. El nivel de expresión de mPD-1H no aumenta con la activación mediante estimulación con LPS (2 µg/ml) durante 48 horas. Como isotipo control, se utilizó un anticuerpo rata IgG2a marcado con PE y, para detectar la expresión de PD-1H, se utilizó el anticuerpo monoclonal rata IgG2a anti mPD-1H marcado con PE. B. No se detecta unión de la proteína recombinante biotinilada mPD-1H.AviTag a la concentración utilizada (2 µg/ml) a los macrófagos J774A1. Para detectar la unión de la proteína recombinante mPD-1H.AviTag-bio, se utilizó SA-PE. Como control de isotipo, usamos isotipo bio-SA-PE. Se muestran los datos representativos de un experimento.

4.3 La proteína soluble mVSI3.Ig no muestra afinidad detectable por mPD-1H de membrana en citometría de flujo

4.3.1 Estrategia de clonaje y expresión de la proteína mPD-1H de membrana

Se diseñó una pareja de cebadores para amplificar la secuencia codificante de la proteína de membrana mPD-1H, flanqueada por las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI* en los extremos 5' y 3', respectivamente. El amplicón de la PCR correspondía al tamaño esperado de 947 pares de bases (pb), por lo que se cortó la banda del gel y se purificó para su clonaje en un vector retroviral. Finalmente, se obtuvo una construcción retroviral que contenía la secuencia que codificaba para la proteína de membrana mPD-1H y un gen de resistencia a puromicina. Para asegurar que la construcción obtenida contenía la secuencia correcta para la expresión de la proteína mPD-1H, se secuenció el vector por el método Sanger (**Anexo I, Figura I**).

Una vez comprobada, por secuenciación, que la construcción estuviera en un marco de lectura correcto, se utilizó para transfectar de manera transitoria mediante lipofección la línea celular empaquetadora platE, que porta en su genoma dos construcciones con los genes *gag*, *pol* y *env* necesarios para la producción de partículas virales. Las partículas virales producidas fueron centrifugadas y filtradas (0,45 µm), y el sobrenadante se usó para transducir la línea celular NIH-3T3. Tras 10 días de selección con puromicina, la línea

generada se testó con el anticuerpo anti-VISTA-PE (clon MIH64, BD Biosciences) y se confirmó la expresión de la proteína mPD-1H en la superficie. Se realizó un clonaje por dilución límite a una célula/pocillo para aislar un clon derivado de la línea celular que expresaba la construcción recombinante (**Figura 38**).

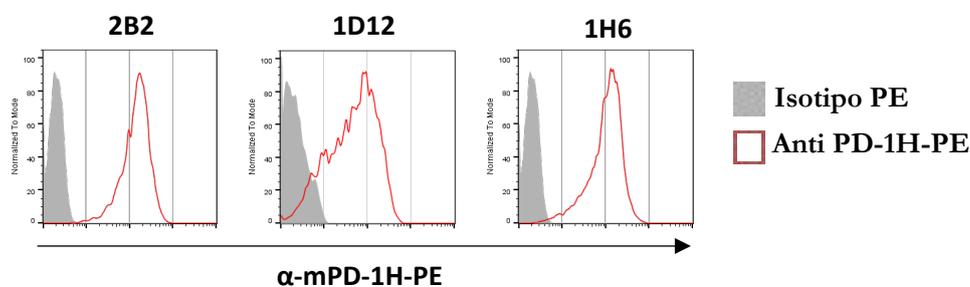


Figura 38. Detección de la proteína de membrana recombinante mPD-1H en la línea celular transducida NIH-3T3. Validación de la unión del anticuerpo anti-PD-1H-PE (clon MIH64) a la línea NIH-3T3 que expresa PD-1H murino de membrana por citometría. La línea roja representa la unión del anticuerpo anti-PD-1H-PE y, en gris, se representa el isotipo control, anticuerpo rata IgG2a marcado con PE.

4.3.2 Estrategia de clonaje y expresión de la proteína recombinante soluble mVSIG3(ECD).mIgG2a (mVSIG3.Ig)

Se diseñó una pareja de cebadores para amplificar el dominio extracelular de la proteína mVSIG3, flanqueada por las dianas de las enzimas *HindIII* y *BglII* en los extremos 5' y 3', respectivamente. Se obtuvo una banda de 665 pb, que coincidía con el peso esperado que, a continuación, se purificó y clonó en el pIB49, dando lugar al vector pSecTag2-mVSIG3·ECD-mIgG2a.Fc.HygroB. Se confirmó la correcta generación de la construcción recombinante vector pSecTag2-mVSIG3(ECD).mIgG2a.Fc-HygroB, tras secuenciar una de las colonias que contenía la construcción **Anexo I, Figura II**).

La construcción generada se utilizó para transfectar mediante lipofectamina la línea celular HEK293T en placas de 15 cm de diámetro y, así, obtener un volumen de sobrenadante de 150-300 ml. A partir de este volumen, se purificó la proteína por cromatografía de afinidad, dializándose y concentrándose frente a PBS. Mediante *immunoblot* se confirmó la producción de la proteína de interés. En condiciones reductoras, se obtuvo la banda esperada de un peso aproximado de 56,7 kDa para mVSIG3.Ig, aunque se observaron bandas más pequeñas, que podrían ser resultantes de fragmentaciones de la proteína. En condiciones no reductoras, se observaron diferentes bandas de peso molecular mayor al esperado, que pueden ser debidas a la agregación de la proteína y a los patrones de glicosilación (**Figura 39**).

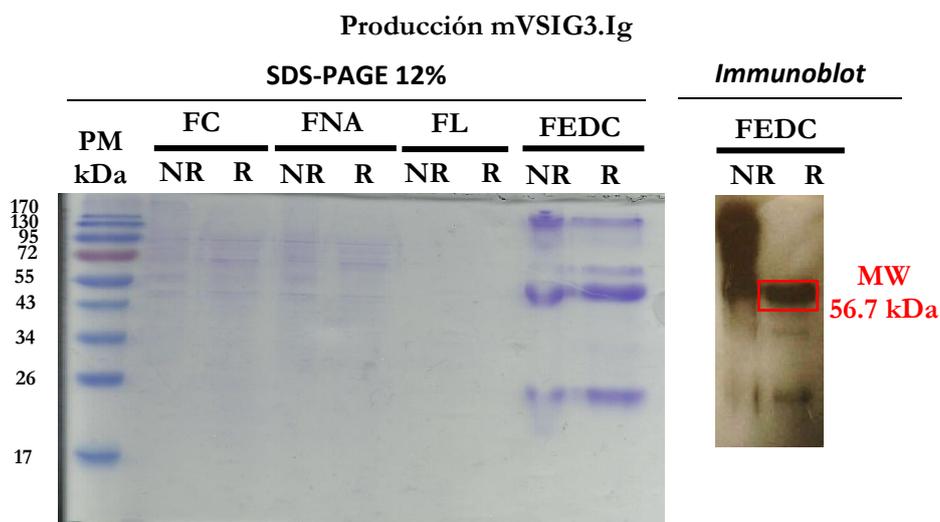


Figura 39. Comprobación de la proteína soluble mVSIG3.Ig. A la izquierda, se muestra la tinción con azul de Coomassie del gel tras la electroforesis, y a la derecha de la figura, se muestra la confirmación de la purificación de la proteína recombinante por *immunoblot*. Se cargaron las muestras en condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR) correspondientes a cada una de las fracciones del proceso de purificación: cruda (FC), no adsorbida (FNA), lavado (FL) y la eluida, dializada y concentrada (FEDC). El *immunoblot* confirmó la correcta producción de la proteína recombinante. Se utilizó un anticuerpo monoclonal biotinilado rata anti ratón frente al fragmento Fc de la IgG2a murina y la reacción se reveló utilizando estreptavidina-HRPO. Encuadrada en rojo, se indica la banda correspondiente a la conformación más sencilla de VSIG3.Ig en condiciones reductoras (R).

4.3.3 Generación de la línea celular de expresión estable de la proteína recombinante soluble mVSIG3.Ig

Se transfectó de manera transitoria mediante lipofección la línea CHO (SACE) para la expresión de la proteína recombinante soluble VSIG3.Ig utilizando el plásmido de expresión generado previamente. Este vector incorpora un gen de resistencia a higromicina B, que nos permitió seleccionar transfectantes estables de expresión para la proteína, utilizando este antibiótico como elemento de presión de selección para la integración de los vectores en el ADN celular. Tras la selección, se llevó a cabo un clonaje por dilución límite de la línea generada y se comprobó, por ELISA sandwich, la producción de la proteína soluble secretada al medio de cultivo (**Figura 40**).

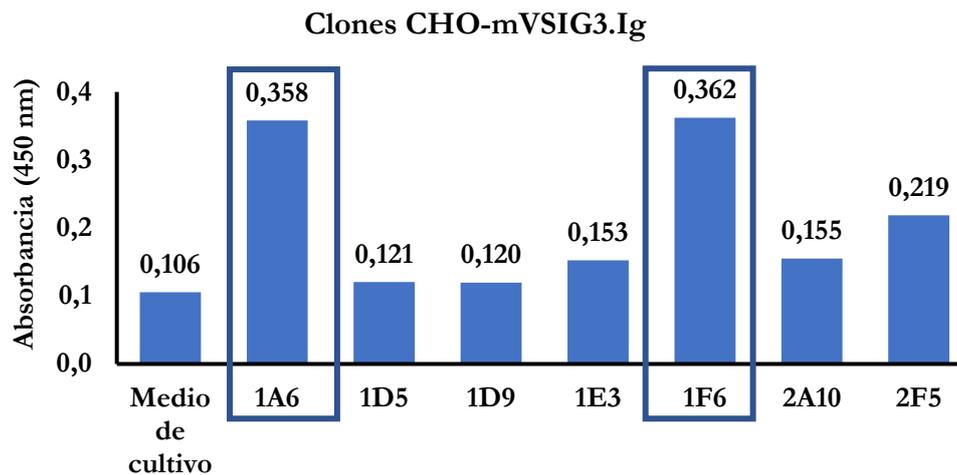


Figura 40. Detección de la proteína recombinante soluble mVSIG3.Ig. El ensayo ELISA sandwich muestra la detección de la proteína soluble mVSIG3.Ig en sobrenadantes de células CHO transfectadas con la construcción pSecTag2-mVSIG3-IgG2a-HygroB. Encuadrados en azul, se indican los clones seleccionados. La proteína fue capturada y detectada utilizando anticuerpos contra dos epítomos distintos del fragmento Fc de la IgG2a murina y el anticuerpo secundario marcado con biotina se reveló con estreptavidina unida a HRPO.

4.3.4 Determinación de la interacción entre mVSIG3.Ig y PD-1H de membrana por citometría de flujo

Generada la proteína soluble y la línea transducida con expresión estable de PD-1H de membrana, se analizó la interacción del ligando VSIG3.Ig con el receptor PD-1H por citometría de flujo. La línea celular NIH-3T3 que expresaba la proteína de membrana mPD-1H (clon 1D12) se incubó con diferentes concentraciones de mVSIG3.Ig, uno de sus posibles ligandos identificados en la especie humana, aunque no pudimos detectar unión productiva entre estas dos proteínas en citometría de flujo (**Figura 41**).

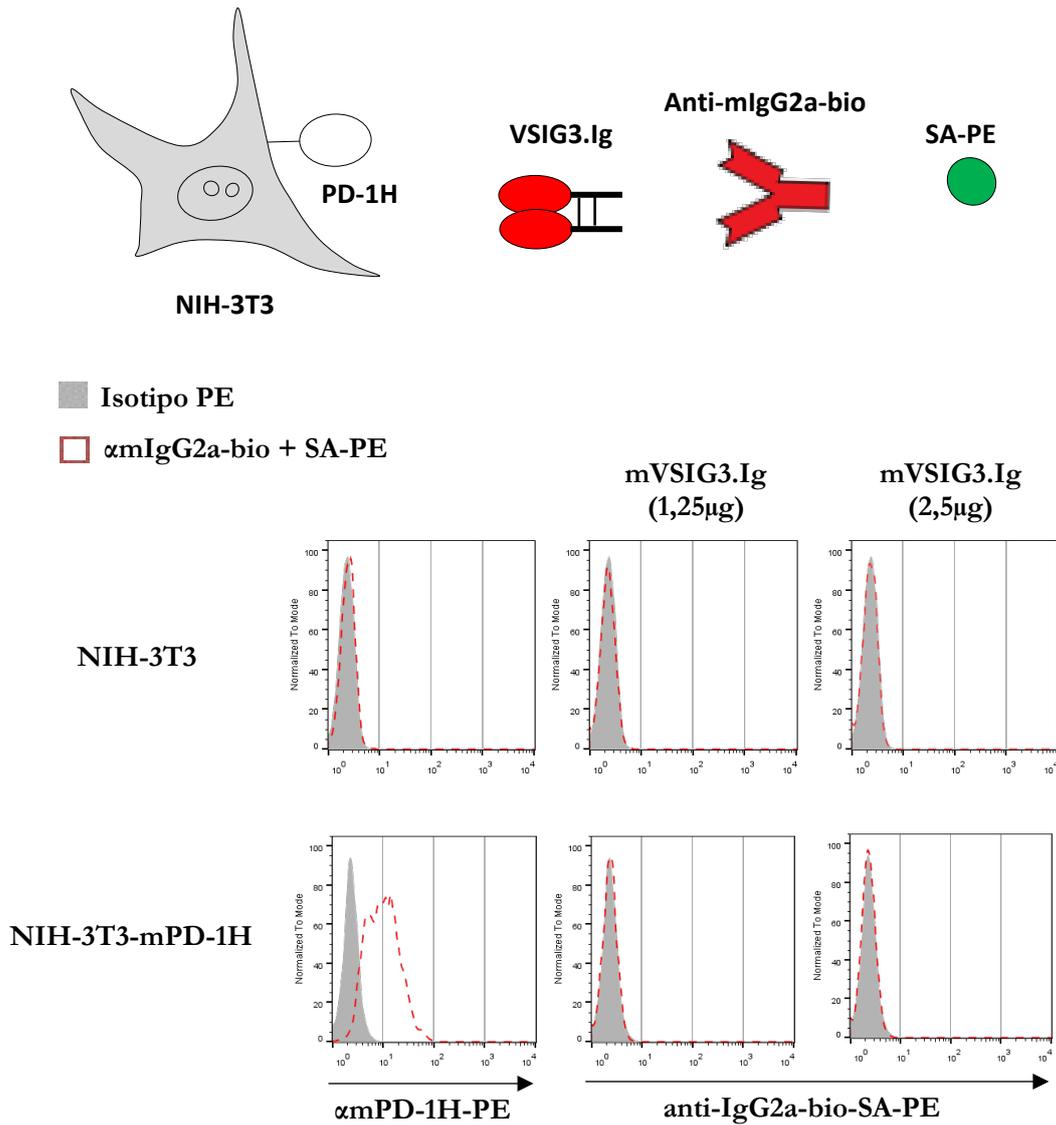


Figura 41. mVSIG3.Ig soluble no muestra afinidad de unión por PD-1H murino de membrana. Se incubaron dos concentraciones de mVSIG3.Ig (1,25 y 2 µg) con las líneas celulares NIH-3T3 y NIH-3T3-mPD-1H (clon 1D12), sin detectarse unión por citometría de flujo. Para revelar la unión de la proteína VSIG3.Ig, se utilizó un anticuerpo biotinilado frente al fragmento Fc de la IgG2a murina y la reacción se incubó con estreptavidina-PE. En gris, el isotipo control, anticuerpo rata IgG2a marcado con PE, y en rojo el anticuerpo monoclonal rata anti ratón IgG2a.Fc biotinilado revelado con SA-PE. Se muestran datos representativos de cinco experimentos independientes.

4.4 Las proteínas solubles mVSIG8.Ig (transcritos 1 y 2) no muestran afinidad detectable por mPD-1H de membrana en citometría de flujo

4.4.1 Estrategia de clonaje y expresión de la proteína recombinante soluble mVSIG8 región extracelular (transcritos 1 y 2).mIgG2a (mVSIG8.Ig)

La construcción pSecTag2-mVSIG8 (ECD transcrito 1).IgG2a.Fc-HygroB se llevó a cabo a partir del clonaje de la secuencia del dominio extracelular de mVSIG8, flanqueado por las dianas de las enzimas 5'-*SfiI* y 3'-*HindIII* y amplificada con unos cebadores diseñados

específicamente, en el vector pIB49 (pSecTag2-mIgG2a.Fc-WT-hygroB). En la **Figura III del Anexo I** se muestra la comprobación de la correcta generación de la construcción quimérica, mediante el alineamiento de la secuencia genética teórica y la obtenida experimentalmente.

Para la obtención de las proteínas solubles mVSIG8.Ig T1 y mVSIG8.Ig T2, esta última, previamente generada en el laboratorio por Andrea Torices, se procedió de la misma manera empleada para la producción y purificación de mVSIG3.Ig¹²⁶.

Para la comprobación de las proteínas, éstas fueron separadas y visualizadas en geles SDS-PAGE al 12%. Por un lado, tras la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de Coomassie para su visualización y, por otro, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa sobre la que identificamos las proteínas de interés mediante *immunoblot*. En condiciones reductoras, se esperó un peso aproximado de 59,4 kDa para mVSIG8 (transcrito 1, **Figura 42**) y 43 kDa para mVSIG8 (transcrito 2, **Figura 43**). En todos los casos, se obtuvo la banda esperada, aunque se observaron fragmentaciones de las proteínas. En condiciones no reductoras, se observaron diferentes bandas de peso molecular mayor al esperado, por las distintas agregaciones o glicosilaciones que pueden sufrir las proteínas.

Producción mVSIG8.Ig T1

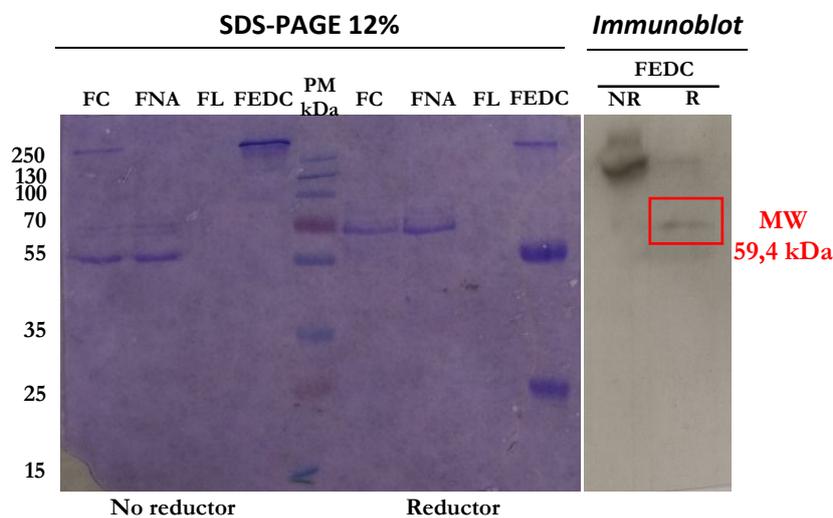


Figura 42. Comprobación de la producción de VSIG8.Ig transcrito 1. La proteína recombinante VSIG8.Ig T1, se obtuvo por transfección transitoria de la línea celular HEK293T y se purificó por cromatografía de afinidad a proteína G sefarosa. A la izquierda, se muestra la tinción con azul de Coomassie del gel SDS-PAGE 12%, y a la derecha de la figura, se muestra la confirmación de la purificación de la proteína recombinante por *immunoblot*. Para el *immunoblot*, se utilizó un anticuerpo biotilado frente al fragmento Fc de la IgG2a y, la reacción, se reveló utilizando estreptavidina-HRPO. Se cargaron las diferentes fracciones de la purificación, cruda (FC), no adsorbida (FNA), lavada (FL) y la eluida, dializada y concentrada (FEDC), en condiciones no reductoras y reductoras.

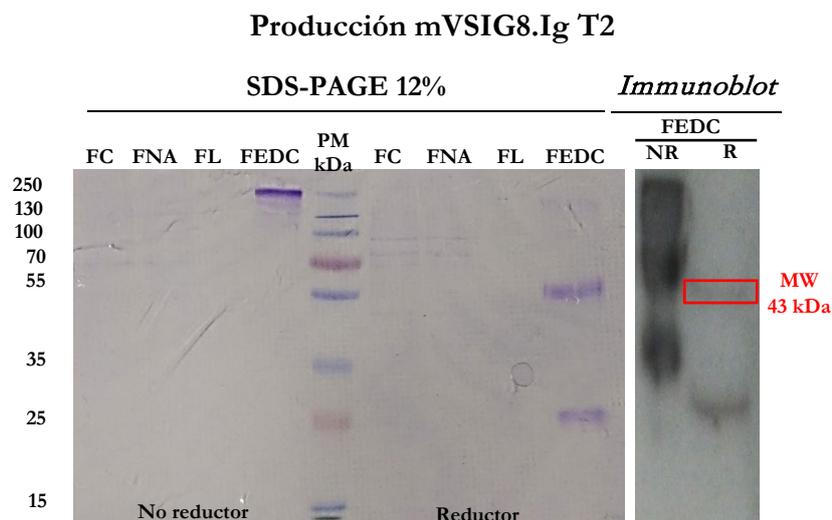


Figura 43. Electroforesis SDS-PAGE e *immunoblot* de mVSIG8.Ig T2. A la izquierda, se muestra la tinción con azul de Coomassie del gel SDS-PAGE 12% y a la derecha, la confirmación, por *immunoblot*, de la purificación de la proteína recombinante mVSIG8.Ig T2 producida por transfección transitoria de la línea celular HEK293T. Para el *immunoblot*, se utilizó un anticuerpo biotinilado frente al fragmento Fc de la IgG2a y la reacción, se reveló utilizando estreptavidina-HRPO. Se cargaron alícuotas de cada una de las fracciones del proceso de purificación: cruda (FC), no adsorbida (FNA), lavado (FL) y, eluida, dializada y concentrada (FEDC), en condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R). Encuadradas en rojo, se indica la banda correspondiente a la conformación más sencilla de la proteína en condiciones reductoras

4.4.2 Ausencia de afinidad de unión entre mVSIG8.Ig (T1 y T2) y PD-1H de membrana por citometría de flujo

Una vez obtenidas, tanto las proteínas recombinantes solubles de VSIG8, como la línea celular transducida con el receptor mPD-1H de membrana, se analizó la interacción de los ligandos VSIG8.Ig T1 y T2 con el receptor PD-1H en citometría de flujo. La línea celular NIH-3T3 que expresaba de manera estable la proteína de membrana mPD-1H (clon 1H6), se incubó con los dos transcritos de mVSIG8.Ig, sin detectarse interacción alguna entre estas proteínas en citometría de flujo (**Figura 44**).

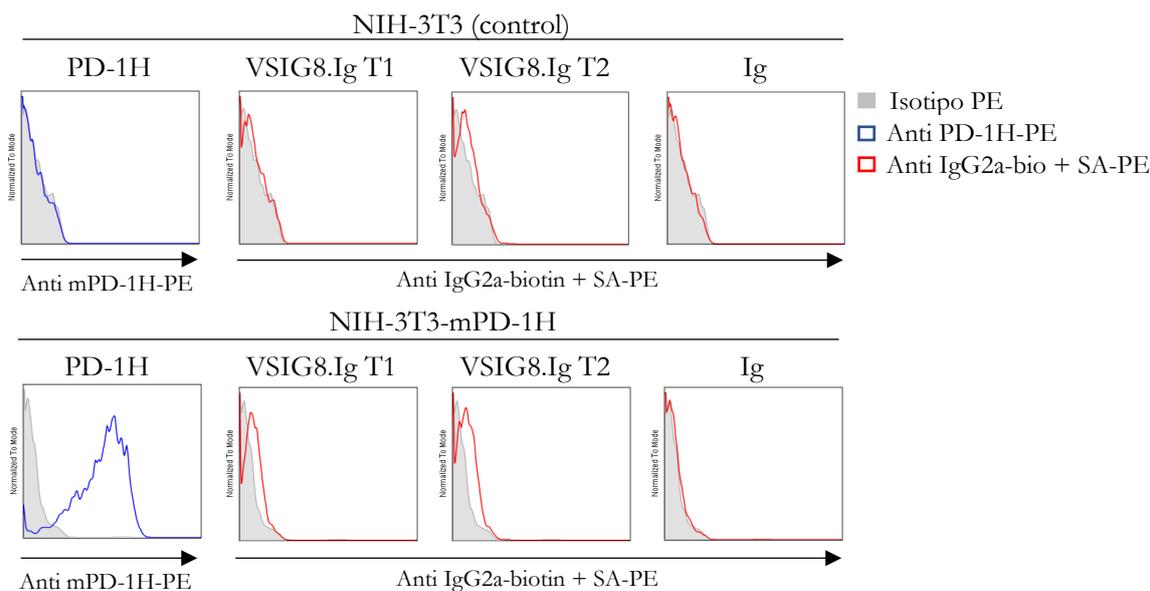


Figura 44. Ausencia de interacción detectable entre las proteínas recombinantes de VSIG8.Ig (transcritos 1, T1, y 2, T2) y mPD-1H de membrana en citometría de flujo. Se incubaron sobrenadantes de las proteínas VSIG8.Ig T1 y T2 con las líneas celulares NIH-3T3 y NIH-3T3-mPD-1H (clon 1H6), observándose una ligera interacción mediante citometría de flujo. Los sobrenadantes se obtuvieron tras la transfección transitoria de la línea celular HEK293T con las construcciones pSecTag2-VSIG8 (ECD T1).IgG2a-HygroB y pSecTag2-VSIG8 (ECD T2).IgG2a-HygroB. Para detectar la unión de las proteínas, se utilizó un anticuerpo biotinilado frente al fragmento Fc de la IgG2a murina y la reacción se reveló con estreptavidina-PE para detectar la interacción. En gris, el isotipo control (anticuerpo rata IgG2a marcado con PE); en azul, el anticuerpo anti PD-1H, y en rojo, el anticuerpo monoclonal biotinilado rata anti-ratón IgG2a revelado con SA-PE. Se muestran datos representativos de tres experimentos independientes.

4.5 La proteína soluble mPSGL-1.Ig no muestra afinidad detectable por mPD-1H de membrana en citometría de flujo

4.5.1 Estrategia de clonaje y expresión de la proteína recombinante soluble mPSGL-1

Para poder evidenciar la interacción entre mPSGL-1 y mPD-1H, se generó en el laboratorio, por el licenciado Javier Blanco Santero, una proteína recombinante soluble de mPSGL-1. Para ello, se fusionó la secuencia correspondiente a la región extracelular de mPSGL-1 con el fragmento Fc de la IgG2a de ratón contenida en el plásmido pIB49 (**Figura IV del Anexo I**).

Para la producción y comprobación de la proteína recombinante soluble PSGL-1.Ig se procedió de la misma manera que en los casos anteriores. En la electroforesis, en

condiciones reductoras, se esperó un peso aproximado de 62,3 kDa para la proteína generada. Esta banda, no se observó en el *immunoblot* seguramente debido a la pérdida del epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal utilizado. En condiciones no reductoras, como en las proteínas recombinantes solubles generadas anteriormente, se observaron bandas de peso molecular mayor al esperado, que se asocian a las distintas agregaciones o glicosilaciones que pueden sufrir las proteínas (**Figura 45**).

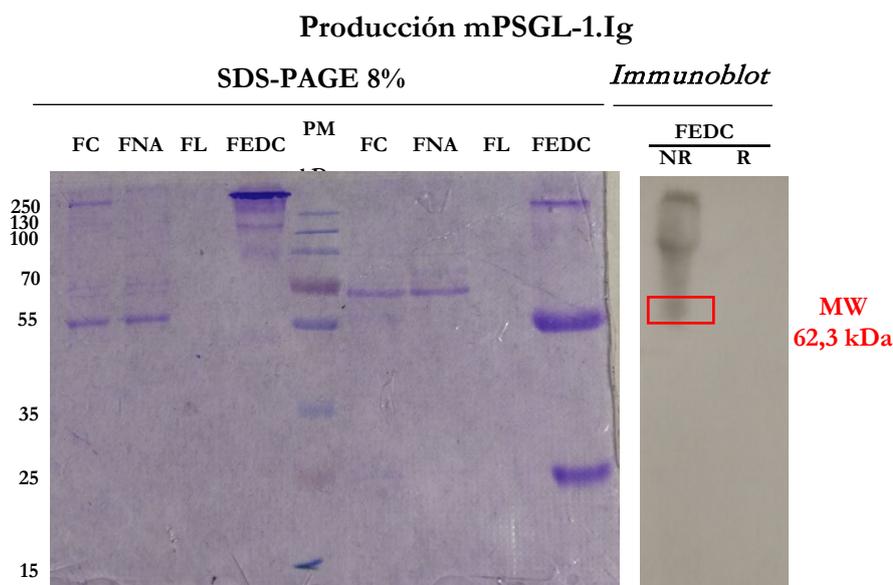


Figura 45. Electroforesis SDS-PAGE e *immunoblot* de mPSGL-1.Ig. A la izquierda, se muestra la tinción con azul de Coomassie del gel SDS-PAGE 8% y a la derecha, la confirmación, por *immunoblot*, de la purificación de la proteína recombinante mPSGL-1.Ig producida por transfección transitoria de la línea celular HEK293T. Para el *immunoblot*, se utilizó un anticuerpo biotinilado frente al fragmento Fc de la IgG2a y la reacción, se reveló utilizando estreptavidina-HRPO. Se cargaron alícuotas de cada una de las fracciones del proceso de purificación: cruda (FC), no adsorbida (FNA), lavado (FL) y eluida, dializada y concentrada (FEDC), en condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R). En rojo, se indica la banda correspondiente a la conformación más sencilla de la proteína en condiciones no reductoras.

4.5.2 Determinación de la interacción entre mPSGL-1 y mPD-1H de membrana por citometría de flujo

Una vez producida la proteína la proteína recombinante soluble mPSGL-1.Ig, se estudió por citometría de flujo la interacción de esta proteína con la línea celular NIH-3T3-PD-1H, transducida con la proteína PD-1H de membrana, a diferentes puntos de pH y en presencia de heparina, no observándose unión alguna entre ambas proteínas (**Figura 46**). La incubación de la heparina junto con las proteínas recombinantes solubles, previene la unión de éstas a los proteoglicanos de la superficie celular.

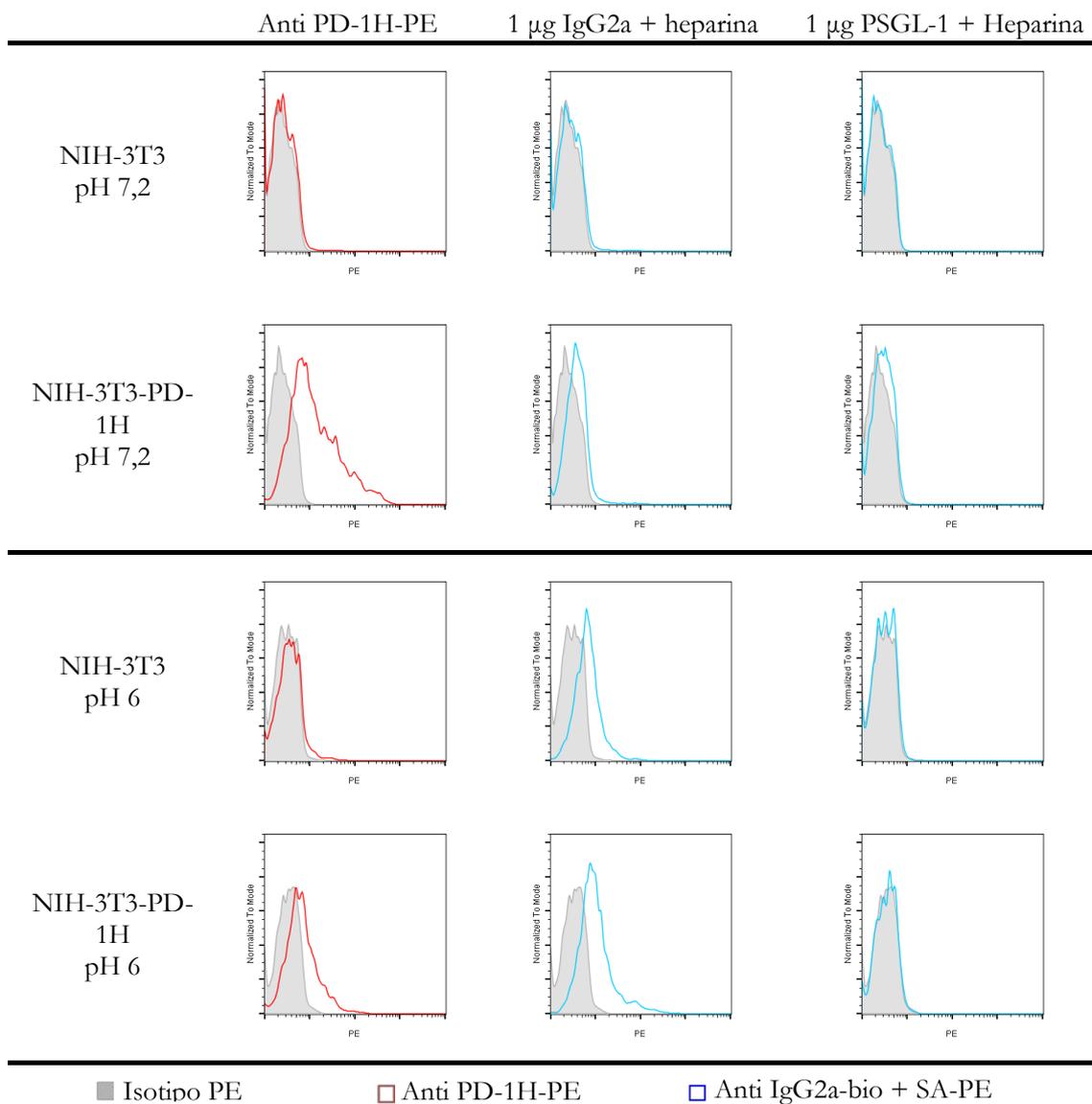


Figura 46. Interacción no detectable entre las proteínas recombinantes PSGL-1.Ig y mPD-1H de membrana en citometría de flujo. Se incubó 1 μ g de la proteína recombinante soluble PSGL-1.Ig o 1 μ g del control Ig, en presencia de 0,25 μ l de heparina (5000 U/ml), con las líneas celulares NIH-3T3 y NIH-3T3-mPD-1H (clon 1D12) a pH fisiológico y a pH 6, sin detectarse unión por citometría de flujo. Para revelar la unión de las proteínas, se utilizó un anticuerpo biotinilado frente al fragmento Fc de la IgG2a murina y la reacción se incubó con estreptavidina-PE. En gris, el isotipo control (anticuerpo rata IgG2a marcado con PE); en rojo, el anticuerpo anti PD-1H, y en azul, el anticuerpo monoclonal biotinilado rata anti-ratón IgG2a revelado con SA-PE. Se muestran datos representativos de tres experimentos independientes.

4.6 Las proteínas recombinantes solubles mVSIG3.Ig y mVSIG8.Ig (transcritos 1 y 2) no muestran afinidad específica por mPD-1H de membrana a pH ácido en citometría de flujo

Dadas las características de PD-1H, que posee una región extracelular rica en histidinas susceptibles de ser protonadas a pH ácido, se analizó la unión de las proteínas recombinantes VSIG3.Ig y VSIG8.Ig (transcritos 1 y 2) a la línea NIH-3T3-PD-1H (clon 1D12) bajo diferentes condiciones de pH. No se detectó interacción específica entre las proteínas recombinantes solubles, VSIG3 y VSIG8, con la proteína recombinante PD-1H de membrana. En su lugar, se observaron uniones inespecíficas tanto a la línea celular NIH-3T3-PD-1H como a la línea celular NIH-3T3, sin transducir, que se utilizó de control. Además, se observó que, a pH ácido, disminuía la afinidad del anticuerpo anti PD-1H (clon MIH64) a la proteína PD-1H de membrana. Estos resultados sugieren que la modificación del pH tuvo efecto en la reactividad de la proteína recombinante PD-1H de membrana al cambiar la carga de la región extracelular de la misma por las condiciones ácidas del medio (**Figura 47**).

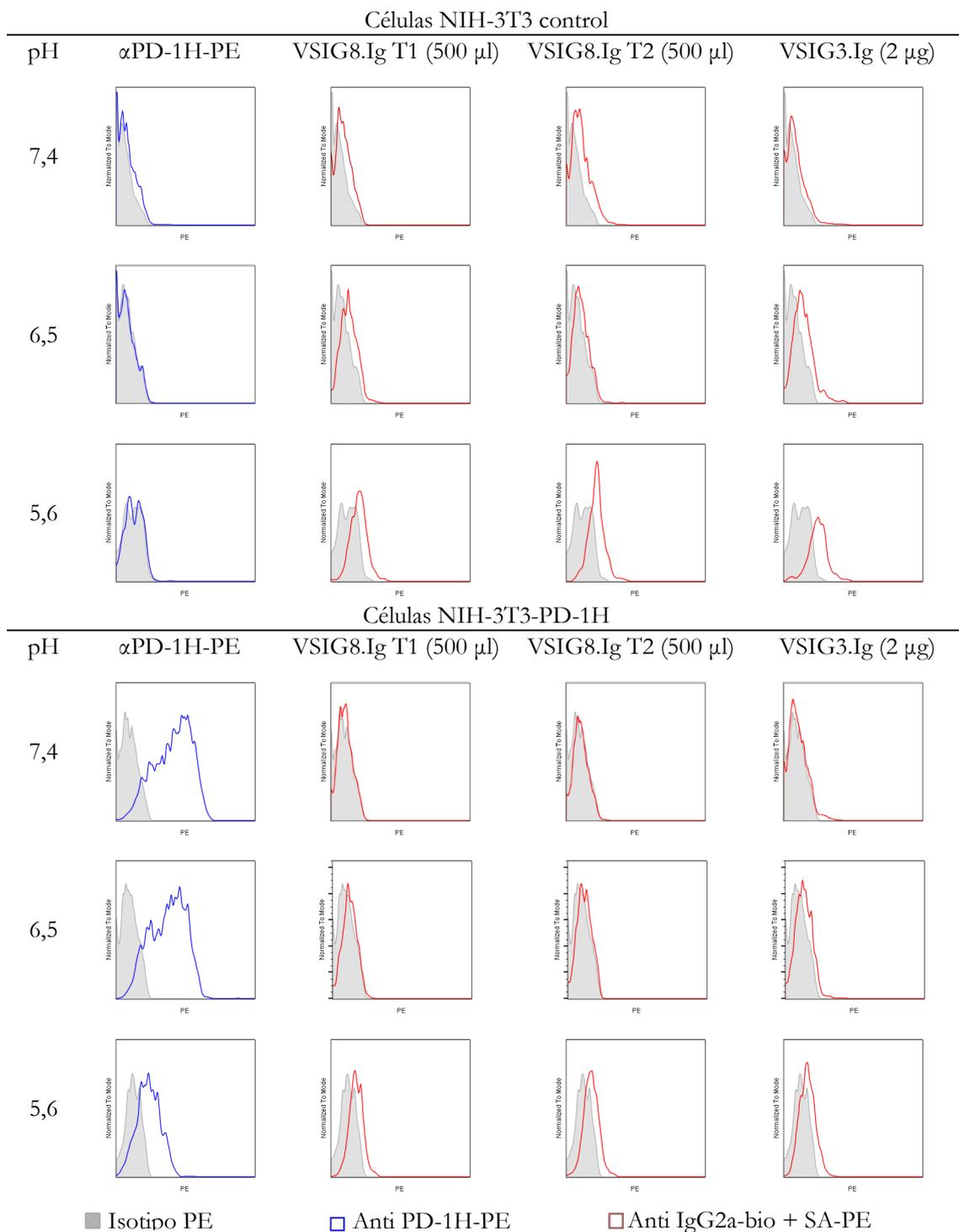


Figura 47. Interacción no detectable entre las proteínas solubles mVSIG3.Ig y mVSIG8.Ig (transcritos 1 y 2) y la proteína de membrana mPD-1H a diferentes puntos de pH. Se incubaron las proteínas VSIG8.Ig T1, VSIG8.Ig T2 y VSIG3.Ig con las líneas NIH-3T3 y NIH-3T3-mPD-1H (clon 1D12), sin detectarse unión por citometría de flujo. Para detectar la unión de las proteínas se utilizó un anticuerpo biotinilado frente al fragmento Fc de la IgG2a murina y la reacción se reveló con estreptavidina-PE. En gris, se indicó el isotipo control (anticuerpo rata IgG2a marcado con PE); en azul, el anticuerpo monoclonal rata anti-ratón PD-1H-PE, y en rojo, el anticuerpo monoclonal biotinilado rata anti-ratón IgG2a, revelado con SA-PE. Se muestran datos representativos de dos experimentos independientes.

4.7 Las proteínas recombinantes solubles mPD-1H.IgG2a, Flag.mPD-1H.AviTag y mPD-1H.COMP no muestran afinidad detectable por mVSIG3 de membrana en citometría de flujo

4.7.1 Estrategia de clonaje y expresión de la proteína mVSIG3 de membrana

Se amplificó por PCR un fragmento de 1329 pb que codifica para la proteína completa mVSIG3, a la que se añadió la etiqueta Flag (DYKDDDDK) entre la secuencia del péptido señal y el inicio de la secuencia correspondiente al dominio extracelular de la proteína. Los cebadores fueron diseñados para añadir el mencionado tag y las dianas para las enzimas *XhoI* y *EcoRI* en los extremos 5' y 3', respectivamente. Tras comprobar por electroforesis en gel de agarosa que el fragmento amplificado era del tamaño esperado, se procedió a su clonaje en el vector retroviral pMIG-GFP, obteniendo el vector pMIG-Flag.mVSIG3-IRES-GFP. En la **Figura V del Anexo I**, se muestra el alineamiento de la construcción teórica con la experimental obtenida por secuenciación del vector extraído, tras la selección de una de las colonias que incorporaron el plásmido.

La producción de las partículas virales para la generación de la línea celular estable se llevó a cabo por transfección transitoria, utilizando el método de la lipofección, sobre la línea celular empaquetadora platE. Como en los casos anteriores, las partículas virales producidas se recogieron, centrifugaron y filtraron (0,45 μm), de manera previa a la transducción de la línea celular diana NIH-3T3. Tras el clonaje por dilución límite, la expresión de GFP por la línea generada permitió la selección de los clones de interés por citometría de flujo (**Figura 48**).

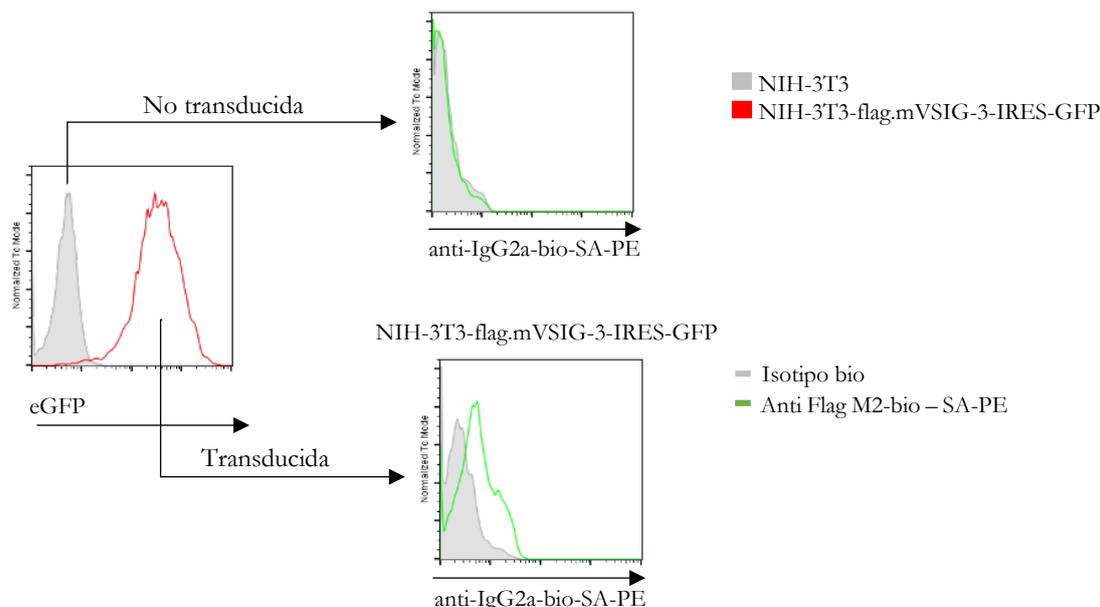


Figura 48. Expresión de la construcción genética Flag.VSIG3-IRES-GFP como proteína de fusión de membrana en la línea celular NIH-3T3. A la izquierda, se muestra la expresión de GFP de la línea transducida frente a la línea parental (sin transducir) y, a la derecha, la detección de Flag en la misma línea transducida empleando un anticuerpo monoclonal biotinilado ratón IgG1 anti-Flag M2 (verde).

4.7.2 Estrategia de clonaje y expresión de las proteínas recombinantes solubles mPD-1H.mIgG2a (mPD-1H.Ig), Flag.mPD-1H.AviTag y mPD-1H.COMP

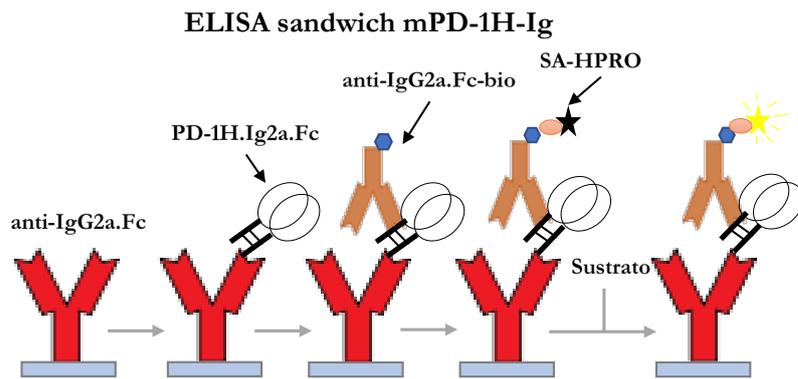
A partir de la secuencia del gen que codifica para PD-1H, se generaron tres construcciones genéticas que permitieron la obtención de tres proteínas recombinantes solubles que incluían la región extracelular de mPD-1H. La primera de ellas, pSecTag-Flag.mPD-1H.AviTag-HygroB, que fue diseñada previamente en el laboratorio como Trabajo Fin de Grado por Natalia Varela, expresa una proteína monomérica¹²⁵. Después, se obtuvo la proteína dimérica mPD-1H.Ig a partir de la construcción pSecTag-mPD-1H.IgG2a.Fc-HygroB y, por último, para incrementar la afinidad de los ensayos de unión, se generó una proteína recombinante soluble multimérica fusionando el dominio IgV de la proteína PD-1H al dominio de pentamerización de la proteína murina COMP (*Cartilage Oligomeric Matrix Protein*), configurando el plásmido de expresión pSecTag-mPD-1H.COMP-HygroB.

Las construcciones genéticas recombinantes se generaron mediante PCR a partir de una pareja de cebadores que se diseñaron y utilizaron para amplificar la secuencia correspondiente a la región extracelular de la proteína mPD-1H. A estos oligos, se les añadió en los extremos 5' y 3' las dianas para las enzimas restricción deseadas. El producto de la PCR, tras la electroforesis, dio lugar a la banda de peso molecular esperado, que se extrajo

del gel para su purificación y clonaje en el vector destino pSecTag2-HygroB. Se seleccionaron aquellas colonias transformantes que integraron cada una de las construcciones y se confirmó, mediante secuenciación, la correcta generación de las mismas (**Anexo I, Figuras VI y VII**).

La línea celular HEK293T se transfectó con el plásmido que codifica para mPD-1H.Ig, mediante el método de lipofección en placas de 6 pocillos, y se mantuvo en cultivo durante 5 días. Se recogieron muestras de sobrenadante a día 3, 4 y 5 que fueron centrifugadas y almacenadas a -20°C. La expresión del plásmido codificante de mPD-1H.Ig en las células eucariotas HEK293T confirmó que la construcción recombinante secretaba la proteína al sobrenadante, que se cuantificó mediante un ELISA sandwich usando una pareja de anticuerpos (anticuerpo de captura y anticuerpo de detección marcado con biotina) frente a diferentes epítomos del fragmento Fc de la IgG2a. A día 5, los niveles de expresión alcanzaron una absorbancia máxima de 0,868 a 450 nm (**Figura 49**).

A



B

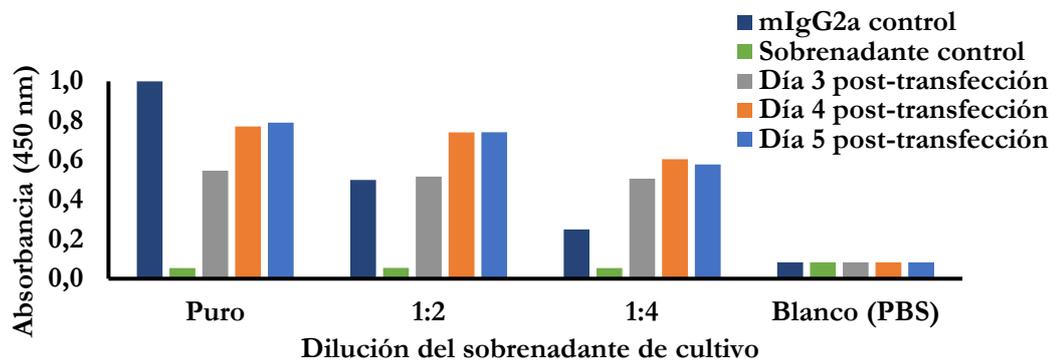


Figura 49. Detección de la proteína soluble mPD-1H.Ig mediante ELISA sándwich. A. Esquema del ensayo utilizado. **B.** Detección de la expresión de mPD-1H.Ig, en sobrenadantes provenientes de la transfección de células HEK293T, mediante ELISA sandwich utilizando anticuerpos de captura y de detección, marcado con biotina, frente a dos epítomos distintos del fragmento Fc de la IgG2a murina. La reacción fue revelada con estreptavidina-HRPO (*horseradish peroxidase*).

En la **Tabla 31**, se indica la estimación de la concentración de proteína obtenida.

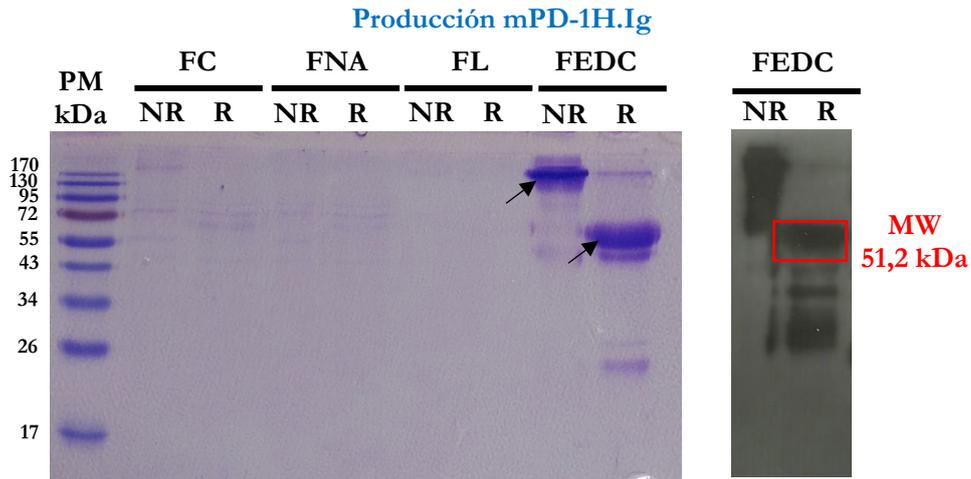
Tabla 31. Estimación de la concentración de proteína mPD-1H.Ig obtenida en los sobrenadantes tras la transfección.

Estimación de la concentración de proteína mPD-1H.Ig ($\mu\text{g/ml}$)				
mTL1a.Ig (patrón)	Medio de cultivo (control negativo)	Día 3	Día 4	Día 5
1,00	0,05	0,55	0,77	0,79
0,50	0,05	0,52	0,74	0,74
0,25	0,05	0,51	0,61	0,58
0,083	0,083	0,083	0,083	0,083

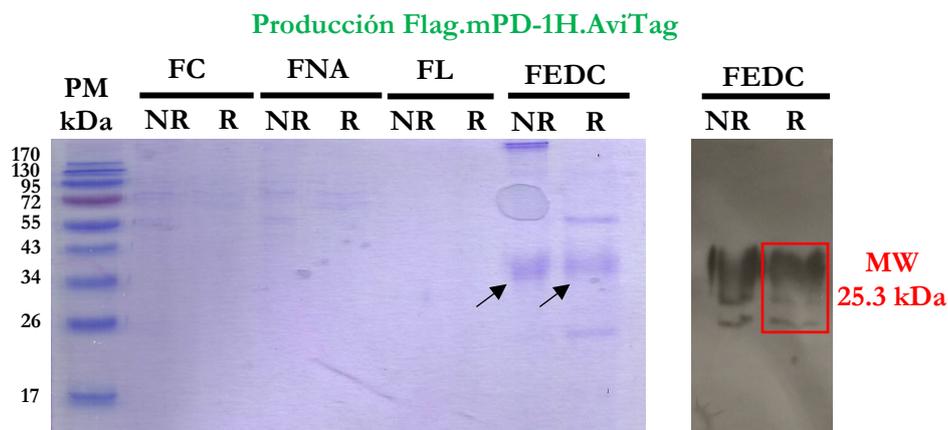
NOTA: Curva patrón $y = 1,0994x - 0,001$; $R^2=0,997$. Calculada a partir de concentraciones conocidas de mTL1a.Ig, proteína recombinante control irrelevante.

Las construcciones genéticas generadas para la producción de las proteínas solubles mPD-1H.Ig y mPD-1H.COMP, junto con la construcción para producir flag.mPD-1H.AviTag (flag.PD-1H-bio)¹²⁵, se utilizaron para transfectar células HEK293T mediante lipofectamina sembradas en placas de 15 cm de diámetro para obtener un volumen de sobrenadante final de 150-300 ml. De manera previa, se determinó que a día 5 post-transfección se seguía produciendo proteína, por lo que los sobrenadantes se recogieron tras incubarse durante 6 días. Los sobrenadantes fueron separados de las células mediante centrifugación y, posteriormente, se filtraron antes de cargarlos y pasarlos por una columna de cromatografía de afinidad de proteína G sefarosa o níquel agarosa para el caso de las proteínas con la cola IgG2a.Fc o cola de histidinas, respectivamente. Utilizamos la columna de inmunofinidad con anticuerpos anti-flag M2, para las proteínas con la etiqueta flag. Las proteínas eluidas se dializaron frente a PBS y se concentraron antes de cuantificarlas mediante un espectrofotómetro nanodrop a 280 nm. Las proteínas fueron separadas y visualizadas en un gel SDS-PAGE al 12%, el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa sobre la que identificamos las proteínas de interés mediante *immunoblot*. En condiciones reductoras, se observó un peso molecular esperado aproximado de 51,2 kDa para mPD-1H.Ig, 25,3 kDa para la flag.mPD-1H.AviTag y 31,9 kDa para mPD.1H.COMP. En todos los casos, se obtuvo la banda esperada, aunque se observaron fragmentaciones de las proteínas. En condiciones no reductoras, se observaron diferentes bandas de peso molecular mayor al esperado, que atribuimos a las distintas agregaciones o glicosilaciones que pueden sufrir las proteínas (**Figura 50**).

A



B



C

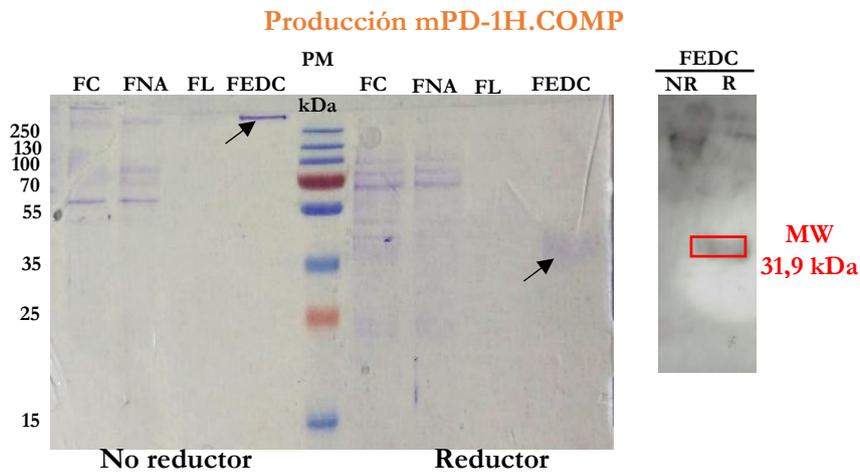


Figura 50. Electroforesis SDS-PAGE 12% e *immunoblot* de los tres formatos de proteína recombinante de mPD-1H. A la izquierda, se muestra la tinción con azul de Coomassie de los geles tras la electroforesis, y a la derecha, la confirmación, por *immunoblot*, de la purificación de las proteínas recombinantes mPD-1H.Ig (A), Flag.mPD-1H.AviTag (B) y mPD-1H.COMP (C), utilizando anticuerpos biotinilados frente al fragmento Fc de la IgG2a, frente al tag Flag y frente al tag c-Myc, respectivamente. La reacción se reveló utilizando estreptavidina-HRPO. Se cargaron alícuotas de cada una de las fracciones del proceso de purificación: cruda (FC), no adsorbida (FNA), lavado (FL) y eluida, dializada y concentrada (FEDC), en condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R). Encuadradas en rojo se indican las bandas correspondientes a la conformación más sencilla de las proteínas en condiciones reductoras.

La proteína Flag.mPD-1H.AviTag, fue producida también biotinilada (Flag.mPD-1H-bio), gracias al péptido aceptor de biotina AviTag que incorpora. Este proceso de biotinilación metabólica, fue posible mediante la co-transfección de línea HEK293T con la construcción de expresión de Flag.mPD-1H.AviTag junto con el vector de expresión que codifica para la proteína BirA ligasa. Esta enzima reconoce la secuencia AviTag y le añade moléculas de biotina presentes en el medio de cultivo. Mediante ELISA se comprobó la correcta biotinilación de la proteína producida (**Figura 51**).

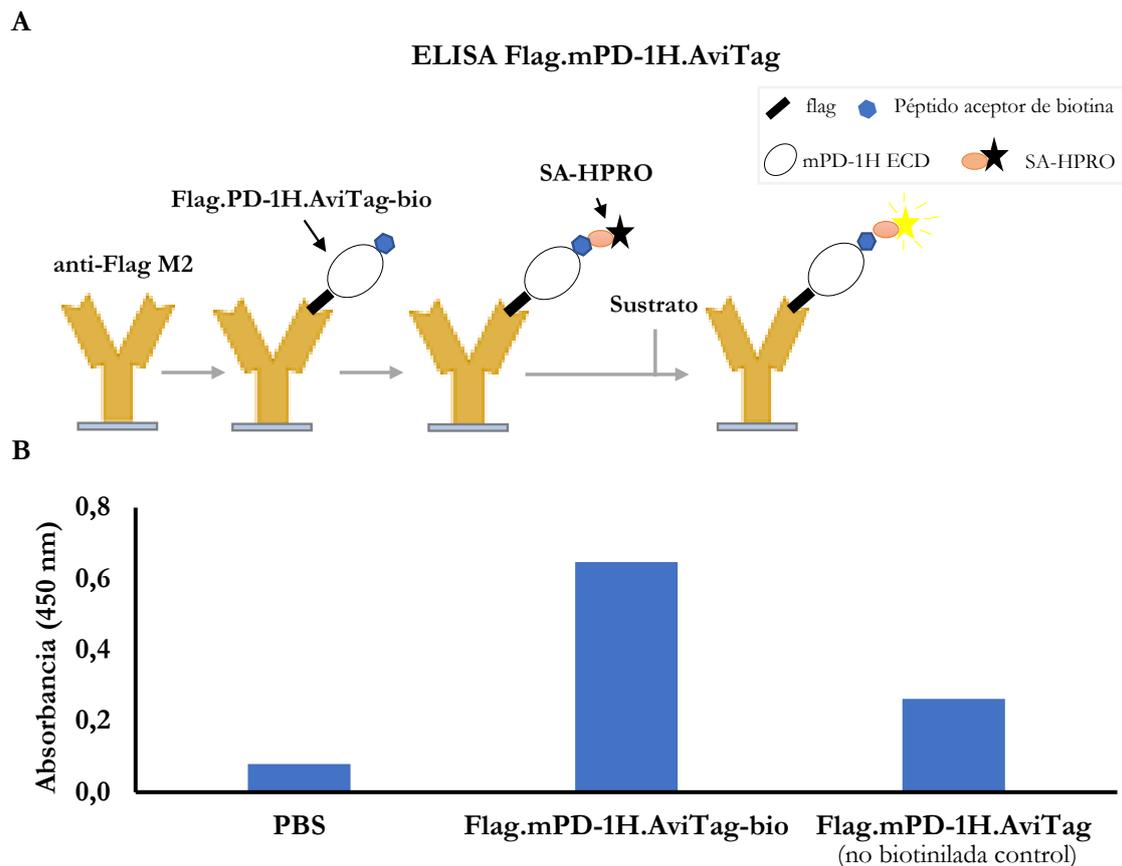


Figura 51. La proteína Flag.mPD-1H.AviTag-bio se biotinila correctamente por la proteína BirA ligasa. A. Esquema del ensayo ELISA utilizado para comprobar la unión de la biotina a la proteína recombinante. **B.** Las muestras de las proteínas recombinantes solubles, Flag.mPD-1H.AviTag (control) y Flag.mPD-1H.AviTag-bio, se capturaron empleando un anticuerpo anti-Flag M2 y se revelaron directamente con estreptavidina-HRPO. Como control negativo se utilizó PBS. La señal proporcionada por la proteína biotinilada fue superior a la obtenida por la proteína control sin biotinilar.

4.7.3 Las proteínas recombinantes solubles Flag.mPD-1H.AviTag y mPD-1H.COMP inhiben la unión del anticuerpo comercial anti-mPD-1H-PE a células transducidas con mPD-1H

La disponibilidad del anticuerpo anti mPD-1H-PE (clon MIH64, BD Biosciences) permitió comprobar el correcto plegamiento conformacional de las proteínas mPD-1H.Ig,

Flag.mPD-1H.AviTag y mPD-1H.COMP mediante ensayos de inhibición del anticuerpo frente a la línea celular transducida NIH-3T3-mPD-1H (clon 1D12). Las proteínas mPD-1H.Ig (**Figura 52**), Flag.mPD-1H.AviTag y mPD-1H.COMP (**Figura 53**) fueron preincubadas con el anticuerpo anti-mPD-1H-PE (dilución 1/400 del clon MIH64) y, posteriormente, se incubaron con la línea transducida estable que expresa la proteína PD-1H de membrana. De esta manera, si existe unión del anticuerpo anti-PD-1H a la proteína soluble mPD-1H, éste no puede reconocer la proteína de membrana PD-1H. Se confirmó el reconocimiento de las proteínas solubles por parte del anticuerpo, demostrando el correcto plegamiento, sin pérdida de la configuración nativa, y conservación del epítipo reconocido por el anticuerpo anti-mPD-1H para las proteínas Flag.mPD-1H.AviTag y mPD-1H.COMP. Mientras que, para la proteína recombinante mPD-1H.Ig, la inhibición del anticuerpo anti PD-1H-PE no fue completa, por lo que parte del epítipo reconocido por este anticuerpo podría haberse alterado en este tipo de conformación dimérica.

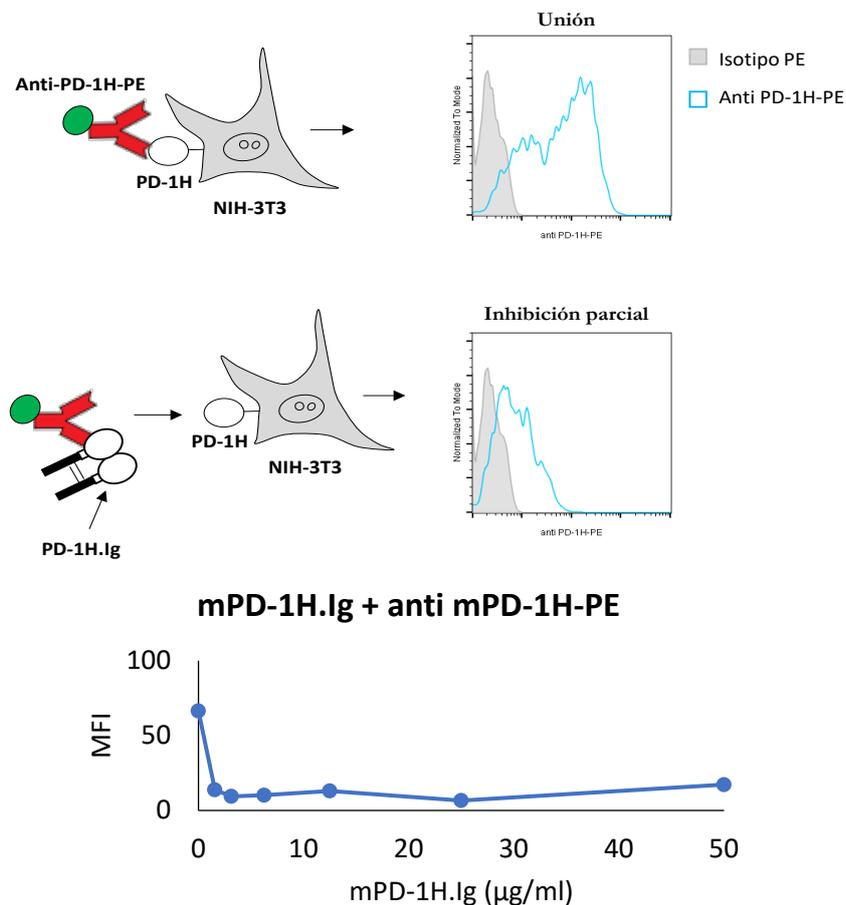


Figura 52. La proteína recombinante soluble mPD-1H.Ig inhibe parcialmente la unión del anticuerpo anti mPD-1H -PE (clon MIH64). La cantidad de 5 µg de proteína recombinante soluble mPD-1H.Ig no fue suficiente para lograr la inhibición de la unión del anticuerpo anti PD-1H-PE a células NIH-3T3 transducidas con PD-1H. En gris, indica el isotipo PE y, la línea azul, indica la unión del anticuerpo anti-mPD-1H-PE.

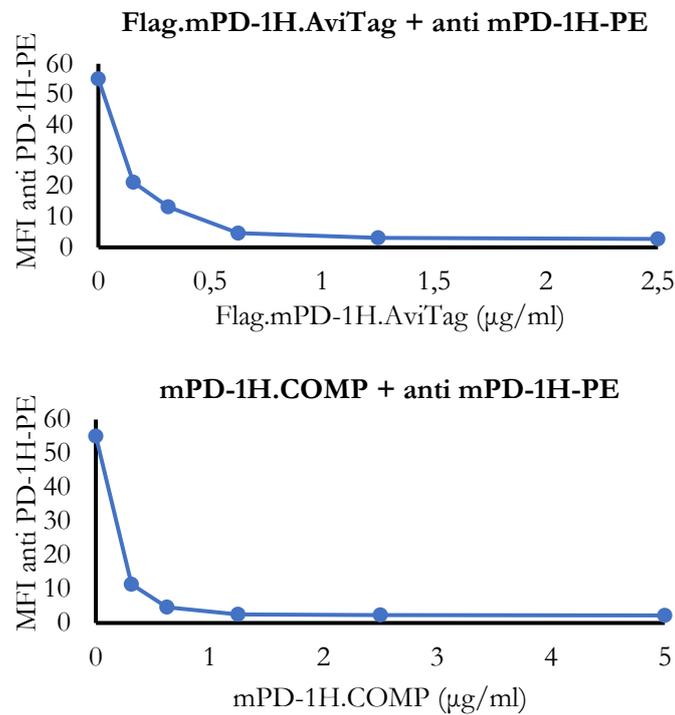
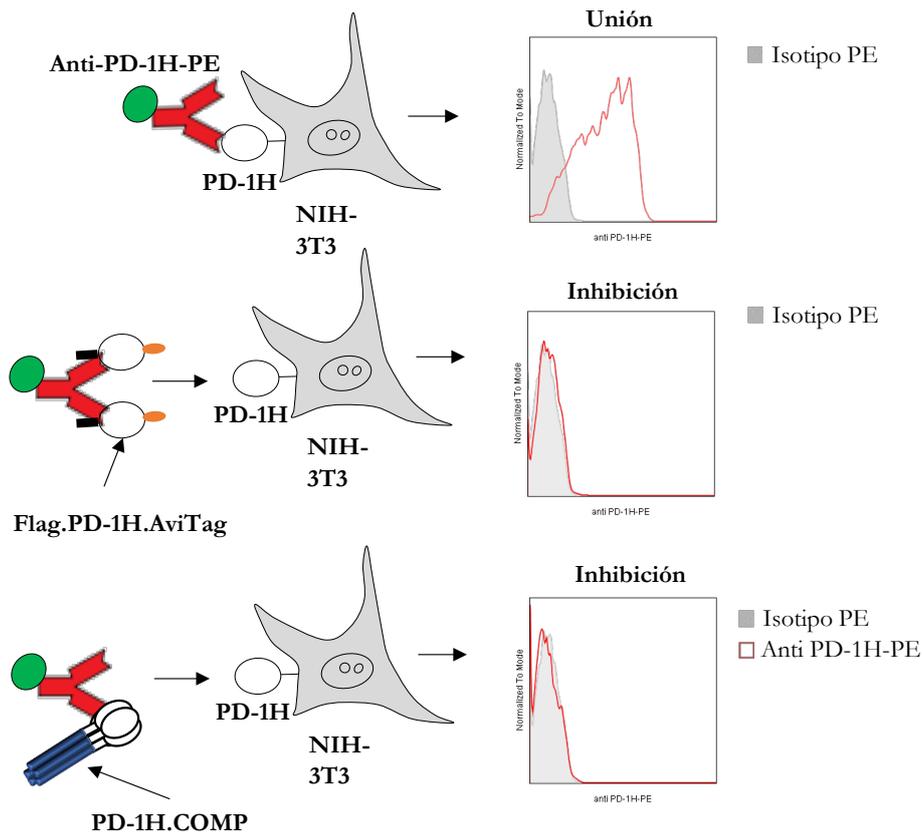


Figura 53. Las proteínas recombinantes solubles Flag.mPD-1H.AviTag y mPD-1H.COMP inhiben la unión del anticuerpo anti-mPD-1H-PE (clon MIH64). La inhibición total de la unión del anticuerpo anti PD-1H-PE a células NIH-3T3 transducidas con PD-1H (clon 1D12) se alcanzó con 1,25 µg de proteína recombinante soluble Flag.mPD-1H.AviTag y 1,25 µg de proteína recombinante soluble mPD-1H.COMP. Sombreado en gris, se indica el isotipo PE y, la línea roja, indica la unión del anticuerpo anti-mPD-1H-PE.

4.7.4 Generación de línea celular de expresión estable de la proteína recombinante soluble mPD-1H.Ig

Para la generación de la línea celular de expresión estable de la proteína PD-1H.Ig se utilizó la línea celular CHO (SACE). Esta línea celular, se transfectó de manera transitoria por lipofección con la construcción pSecTag2-PD-1H.IgG2a-HygroB. Este vector confiere a las células que lo integran resistencia a higromicina B, antibiótico utilizado para seleccionar los transfectantes estables que integraran el vector en el ADN celular. Tras la selección, se llevó a cabo un clonaje por dilución límite y se comprobó, por ELISA sandwich, la producción de la proteína soluble secretada al medio de cultivo (**Figura 54**).

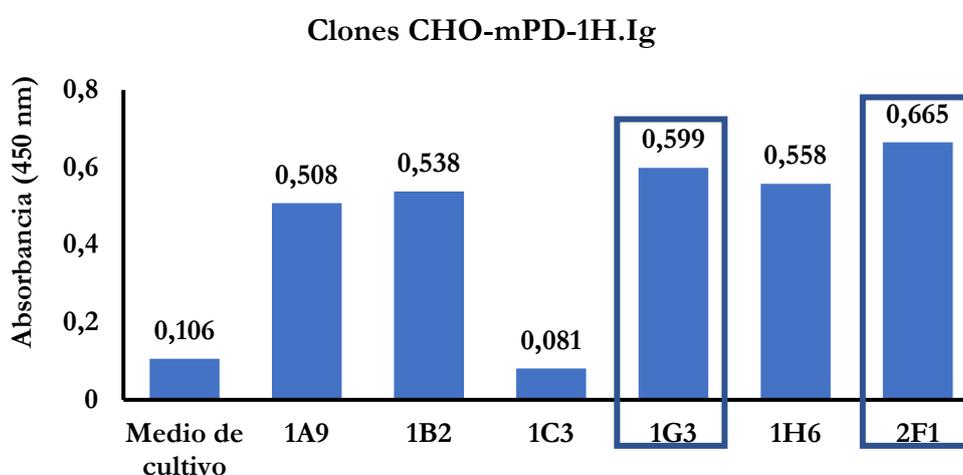


Figura 54. Detección de la proteína recombinante soluble mPD-1H.Ig. Detección de la proteína recombinante soluble mPD-1H.Ig en sobrenadantes de células CHO, transfectadas con la construcción pSecTag2-mPD-1H-IgG2a-HygroB, por ELISA sandwich. Encuadrados en azul, se indican los clones seleccionados. La proteína fue capturada y detectada utilizando anticuerpos contra dos epítomos distintos del fragmento Fc de la IgG2a murina y el anticuerpo secundario marcado con biotina se reveló con estreptavidina unida a HRPO.

4.7.5 Determinación de la interacción de mPD-1H.Ig y mPD-1H.COMP a mVSIG3 de membrana por citometría de flujo

Una vez comprobado que la proteína soluble VSIG3.Ig no interaccionaba de manera detectable con la línea celular que expresaba PD-1H de membrana, se analizó si la interacción se producía en el sentido contrario. Para ello, se utilizó una línea NIH-3T3 transducida para expresar Flag.VSIG3 en la membrana y las proteínas solubles de PD-1H. En este experimento, tampoco se detectó interacción específica alguna por citometría de flujo. Sin embargo, a pH 6 se observó unión de la proteína mPD-1H.COMP a la línea celular control, aunque también a la línea transducida con la proteína recombinante de membrana VSIG3, lo que sugería la existencia de una interacción inespecífica (**Figura 55**).

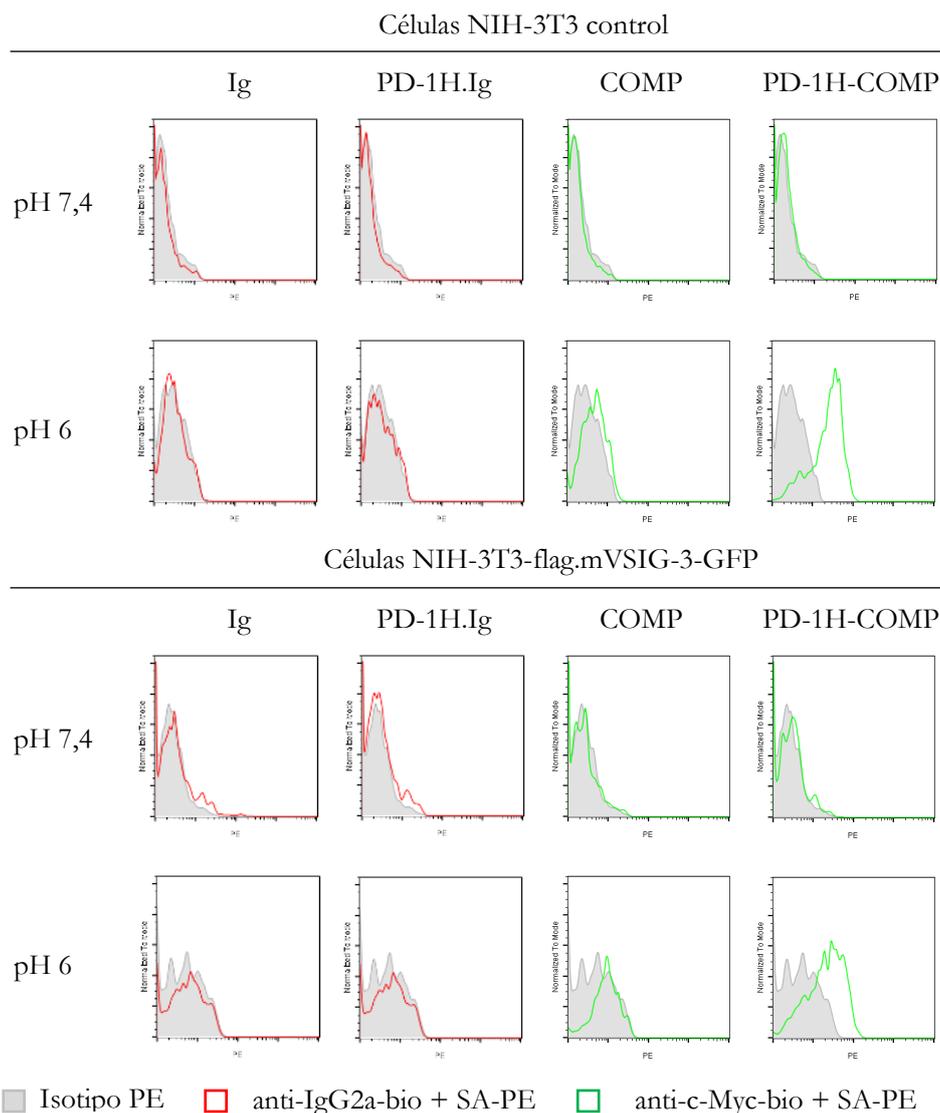
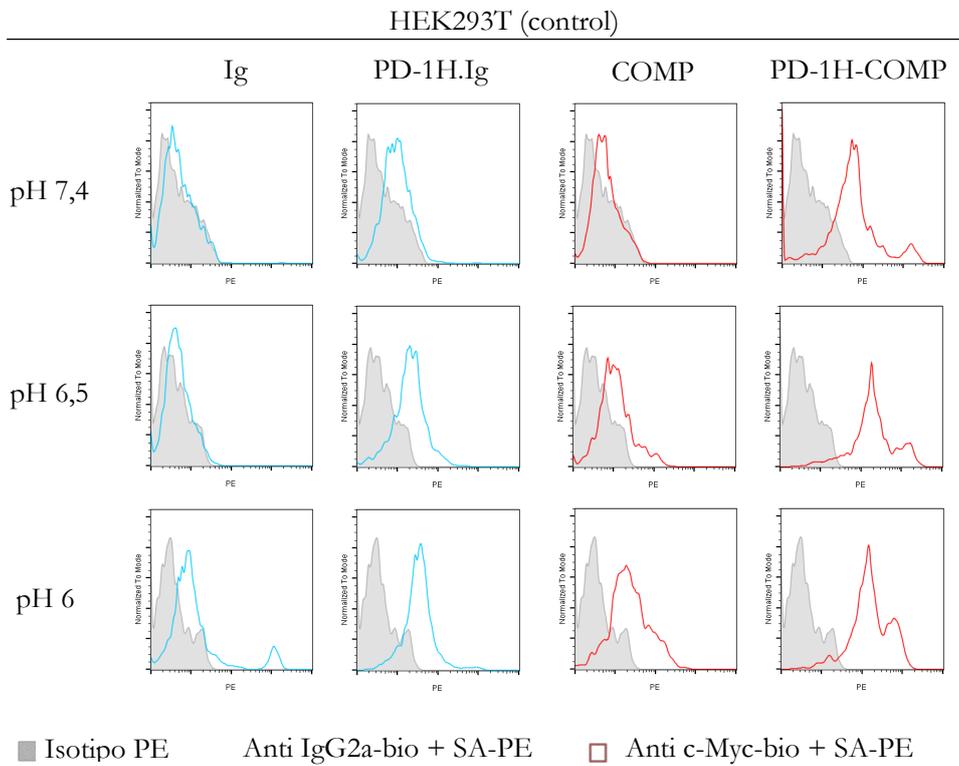


Figura 55. Las distintas variantes recombinantes de mPD-1H soluble no aumentan la afinidad de unión detectable por mVSIG3 de membrana en citometría de flujo. Se incubaron las proteínas recombinantes solubles mPD-1H.Ig y mPD-1H.COMP con las líneas celulares NIH-3T3 (control) y NIH-3T3-Flag.VSIG3-IRES-GFP sin detectarse interacción por citometría de flujo. Para detectar la unión de las proteínas solubles de mPD-1H a mVSIG3 de membrana, se utilizó un anticuerpo biotinilado frente al fragmento Fc de la mIgG2a y un anticuerpo biotinilado frente al tag c-Myc. La reacción se reveló con estreptavidina-PE. Sombreado en gris, se indica el control de SA-PE; en rojo, el anticuerpo monoclonal biotinilado rata anti-ratón IgG2a, y en verde, el anticuerpo monoclonal ratón anti-c-Myc biotinilado. Se muestran datos de un experimento.

4.8 Las proteínas recombinantes solubles mPD-1H.IgG2a y mPD-1H.COMP no muestran afinidad detectable por mPSGL-1 de membrana en citometría de flujo

Para la expresión de mPSGL-1 de membrana, se utilizó la línea celular HEK293T que se transfectó con el plásmido que contiene el gen que codifica para la proteína de

membrana mPSGL-1 clonado en el vector de expresión eucariota pCMV-SPORT. Se utilizó el método de la lipofección para la expresión transitoria de la proteína en células sembradas en placas de 6 pocillos. Para el ensayo de unión, se utilizaron las proteínas recombinantes soluble mPD-1H.Ig y mPD-1H.COMP que se incubaron con la línea celular HEK293T a las 24 horas de la transfección para la expresión de la proteína recombinante de membrana mPSGL-1 a distintos puntos de pH. Se observaron uniones inespecíficas de las proteínas recombinantes solubles a la línea celular HEK293T sin transfectar, que aumentaron en intensidad según disminuía el pH. La unión observada de mPD-1H.COMP a la línea HEK293T-PSGL-1, no se reprodujo con la proteína mPD-1H.Ig, con la que comparte la región extracelular de mPD-1H. La bajada de pH del búfer durante la incubación, induce una unión inespecífica de las proteínas solubles de PD-1H a la línea control sin transfectar y a la línea transfectada con mPSGL-1 de membrana (**Figura 56**).



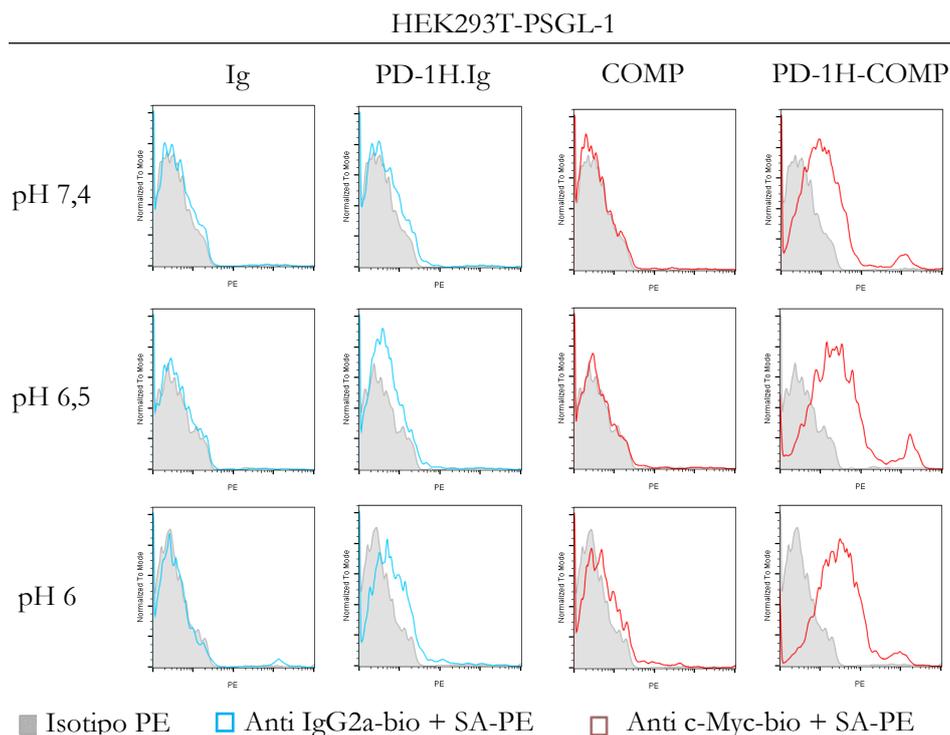


Figura 56. Interacción inespecífica entre las proteínas solubles de mPD-1H y la proteína de membrana mPSGL-1. Se incubaron las proteínas mPD-1H.Ig y mPD-1H.COMP con las líneas celulares HEK293T y HEK293T-PSGL-1, observándose uniones inespecíficas por citometría de flujo. Para detectar la unión de las proteínas se utilizó un anticuerpo biotinilado frente al fragmento Fc de la IgG2a murina o frente al tag c-Myc, y la reacción se reveló con estreptavidina-PE. En gris, se indica el isotipo control, anticuerpo rata IgG2a marcado con PE; en azul, el anticuerpo monoclonal biotinilado rata anti-ratón IgG2a.Fc y, en rojo, el anticuerpo anti-c-Myc biotinilado. Se muestran los datos representativos de dos experimentos independientes.

4.9 Las proteínas recombinantes solubles Flag.mPD-1H.AviTag y mPD-1H.COMP no interactúan en ELISA con los ortólogos murinos de los posibles ligandos de PD-1H humano

Dos proteínas de la familia VSIG, VSIG3 y VSIG8, han sido descritas como ligandos de PD-1H en la especie humana. La disponibilidad de la proteína recombinante soluble mVSIG9.Ig (mTIGIT.Ig), desarrollada en el laboratorio mediante la fusión del dominio extracelular de mTIGIT y el fragmento Fc de la proteína IgG2a murina resultado del Trabajo Fin de Grado de la graduada Rebeca Gutiérrez Cózar, nos permitió comprobar si otro miembro de esta familia podría interactuar con PD-1H en la especie murina¹²⁷. En un primer paso, la proteína fue separada y visualizada en un gel SDS-PAGE al 8%. El gel se transfirió, posteriormente, a una membrana de nitrocelulosa sobre la que se identificó la proteína recombinante soluble mTIGIT.Ig mediante *immunoblot*. En condiciones reductoras, se observó un peso molecular esperado aproximado de 49,2 kDa. En condiciones no reductoras, se observó un rastro de bandas de peso molecular mayor al esperado, que pueden

ser atribuidas a los diferentes patrones de glicosilación o grados de agregación que sufren las proteínas (**Figura 57**).

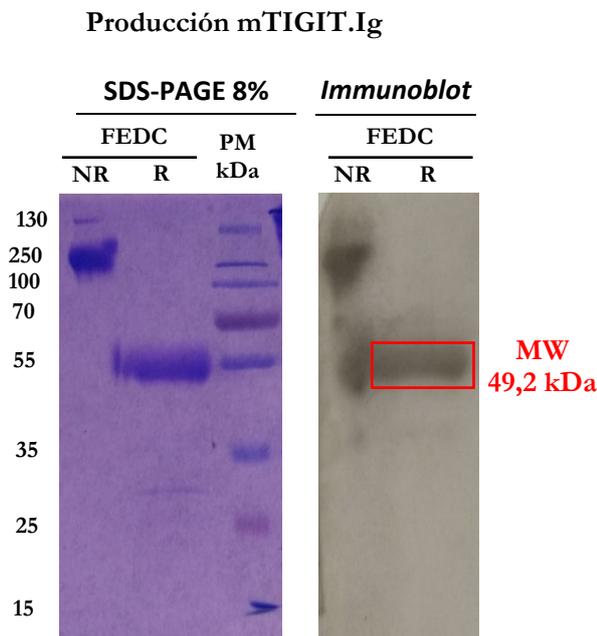


Figura 57. Comprobación de la producción de TIGIT.Ig. A la izquierda, se muestra la tinción con azul de Coomassie del gel SDS-PAGE 8% y, a la derecha de la figura, se muestra la confirmación de la proteína recombinante por *immunoblot*. Para el *immunoblot*, se utilizó un anticuerpo biotinilado frente al fragmento Fc de la IgG2a, revelando la reacción utilizando estreptavidina-HRPO. Se cargó una muestra de la proteína recombinante eluida, dializada y concentrada, en condiciones no reductoras y reductoras.

Tras producir las proteínas recombinantes solubles Flag.mPD-1H.AviTag-bio y mPD-1H.COMP, además de los posibles ligandos de PD-1H a partir de las construcciones genéticas generadas, se llevaron a cabo ensayos de tipo ELISA para analizar la interacción entre las mismas. Sobre la placa se inmovilizó bien el ligando o bien el receptor y, a continuación, se añadieron las diferentes proteínas a estudiar sin detectarse interacción alguna entre PD-1H y sus posibles ligandos (**Figura 58**).

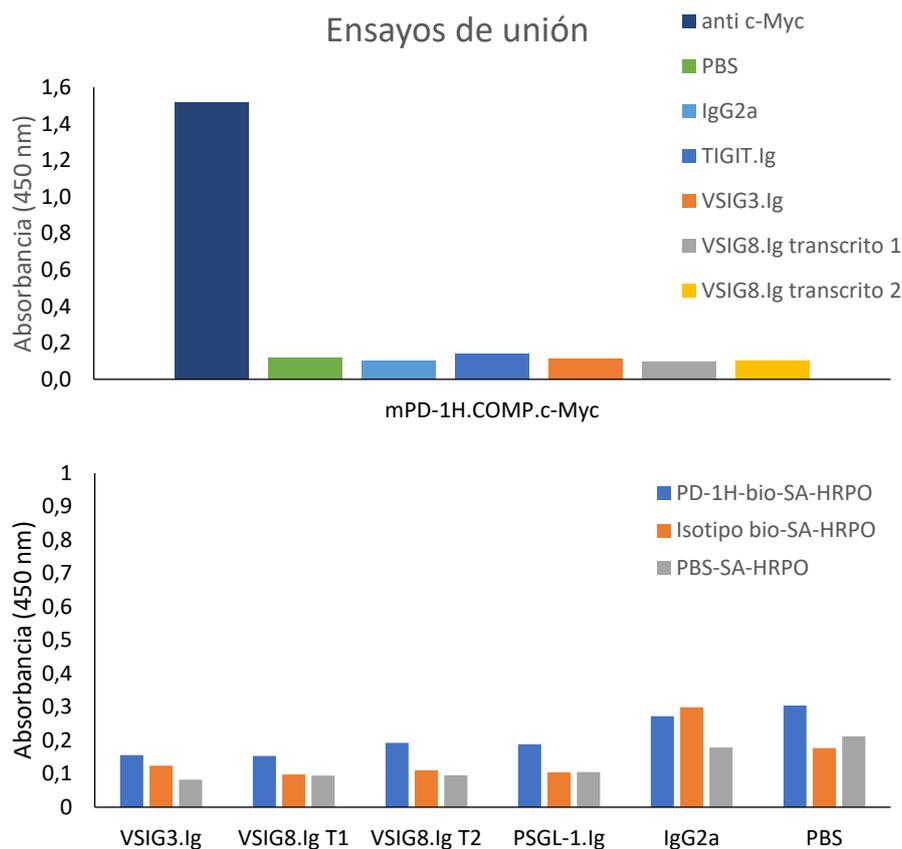


Figura 58. No se detecta interacción entre las proteínas solubles de PD-1H y sus posibles ligandos por ELISA. Para la detección de la interacción entre los posibles ligandos con PD-1H.COMP, parte superior, se inmovilizó sobre la placa de ELISA la proteína PD-1H-COMP y sobre ésta, se incubaron las distintas proteínas recombinantes solubles susceptibles de interactuar con PD-1H. En el caso de la interacción con Flag.mPD-1H-bio, parte inferior, se inmovilizaron 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cada uno de los posibles ligandos o PBS sobre la placa y, sobre ellas, se incubaron 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PD-1H-bio, isotipo bio o PBS. Para detectar la unión de los posibles ligandos solubles de PD-1H se utilizó un anticuerpo marcado con biotina frente al fragmento Fc de la IgG2a murina. La reacción fue revelada con estreptavidina-HRPO.

4.10 La proteína soluble Flag.mPD-1H-bio detecta la expresión del ligando en linfocitos T CD4

La proteína Flag.mPD-1H.AviTag biotinilada (PD-1H-bio) detectó un posible ligando específico en células T CD4, tras teñir suspensiones celulares de bazos y nódulos linfáticos periféricos obtenidos de ratones Balb/c y ratones B6 (**Figura 59**). Una vez establecida la unión de la proteína recombinante PD-1H-bio a las células T CD4, se comprobó que el nivel de unión de la misma no varió en células obtenidas de bazo de ratones B6 estimuladas policlonalmente 48 horas con ConA o con anti-CD3 más anti-CD28 (**Figura 60**).

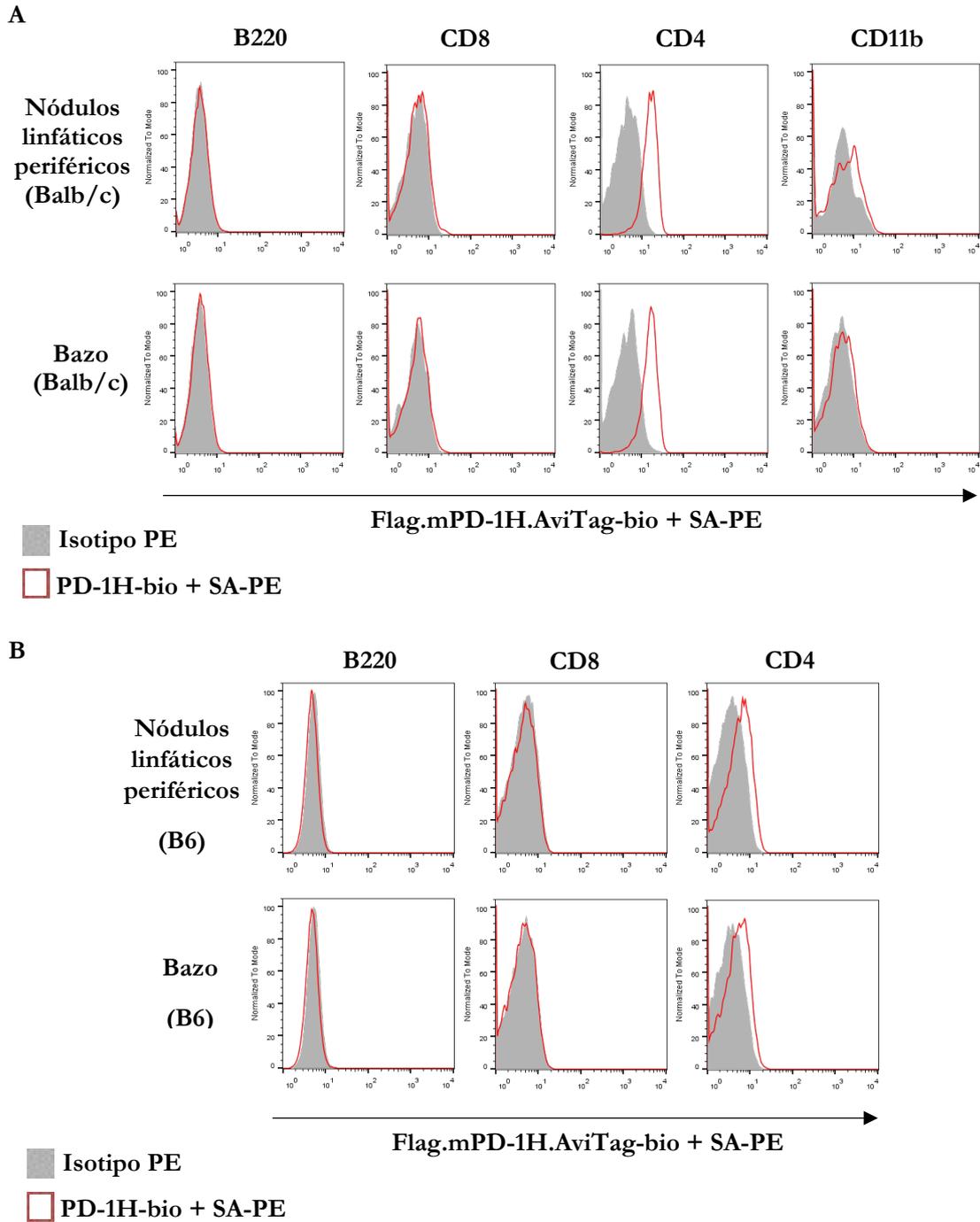


Figura 59. Unión de la proteína Flag.mPD-1H.AviTag a células T CD4, CD8, B220 y CD11b de ratones Balb/c (A) y B6 (B). Se detectó la unión específica de la proteína recombinante (2 µg) a células T CD4 de bazo y nódulos linfáticos periféricos, pero no a células B, CD8 o CD11b de ratones Balb/c y B6. Se muestran datos representativos de tres experimentos independientes.

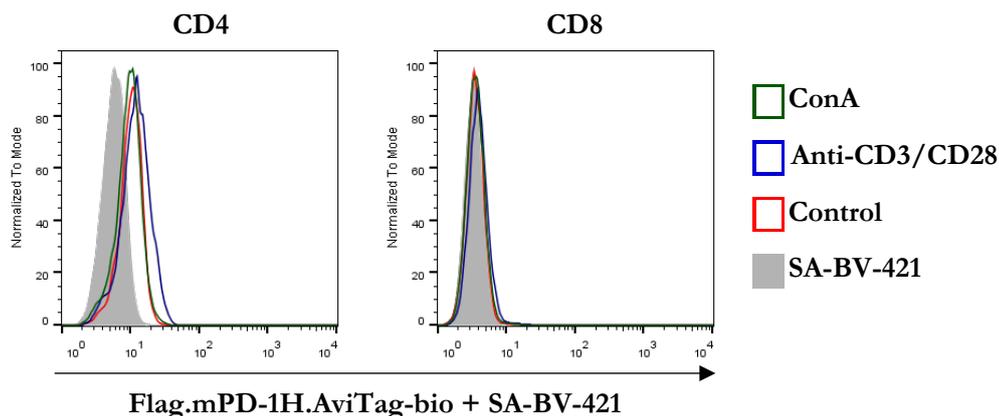


Figura 60. La unión de proteína Flag.mPD-1H.AviTag a células T CD4 no aumenta con la activación. La unión de la proteína a las células T CD4, obtenidas de ratones B6, no aumenta con la estimulación durante 48 h con ConA (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ni con anti-CD3 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) junto a anti-CD28 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se muestran datos representativos de tres experimentos independientes.

A continuación, se analizó la unión de la proteína Flag.mPD-1H.AviTag-bio en timocitos, obtenidos de ratones Balb/c, para comprobar si el ligando de mPD-1H se expresaba en timocitos inmaduros en los distintos estadios de diferenciación tímica, sin que se observase interacción alguna detectable (**Figuras 61**). La ausencia de unión detectable de Flag.mPD-1H.AviTag-bio en el timo, sugiere que la expresión del receptor de mPD-1H podría depender del estado de maduración de las células T CD4.

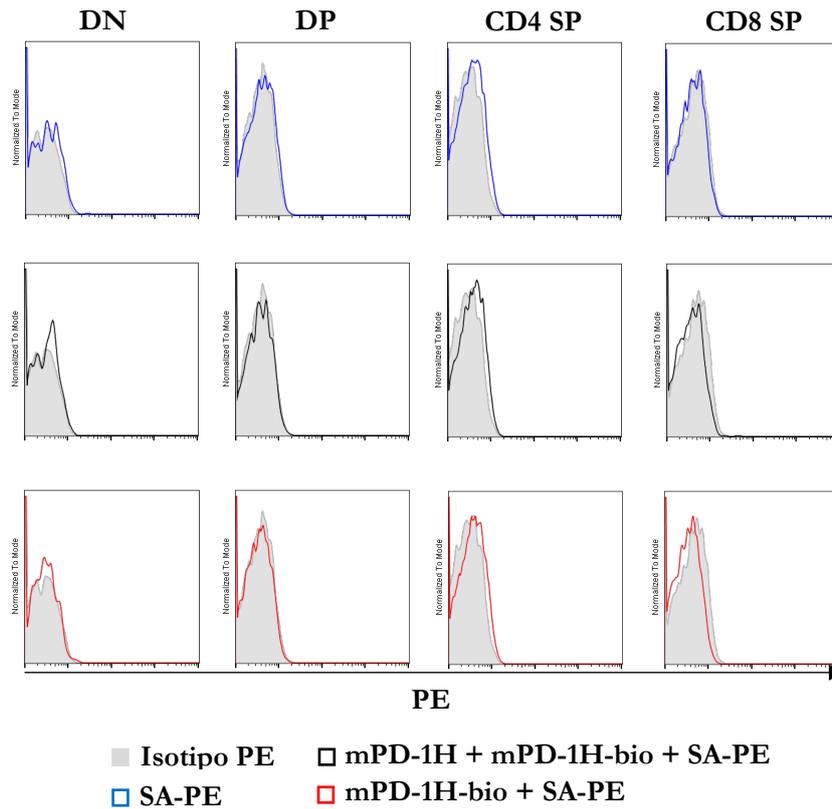


Figura 61. Unión no detectable de la proteína Flag.mPD-1H.AviTag a timocitos. No se detectó la unión de la proteína recombinante (2 μ g) a células T del timo de ratón Balb/c. DP, doble positivo para CD4 y CD8; DN, doble negativo para CD4 y CD8; CD4 SP, positivo simple CD4; CD8, positivo simple CD8. Se muestran datos de un experimento.

Ante la ausencia de interacción de la proteína Flag.mPD-1H.AviTag-bio y la baja expresión de PD-1H en timocitos murinos, se procedió a comprobar si en la línea celular de timoma murino EL-4 se observaba el mismo resultado. En este caso, no se detectó la unión de la proteína recombinante de PD-1H, ni la expresión de este receptor (**Figura 62**).

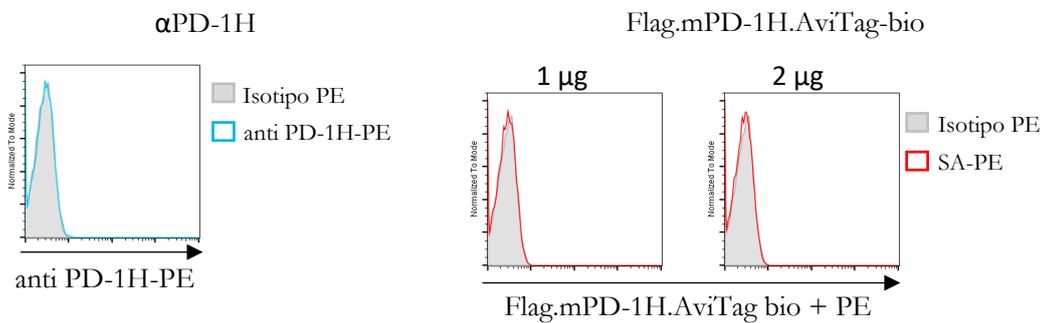


Figura 62. Ausencia de unión detectable de la proteína Flag.mPD-1H.AviTag-bio a la línea celular EL-4 que no expresa PD-1H. A la izquierda, se observa que la línea celular de timoma EL-4 PD-1H y, a la derecha, que a las cantidades utilizadas de 1 y 2 μ g de proteína recombinante biotinilada Flag.mPD-1H.AviTag no se detecta unión a la línea celular de timoma EL-4. Se muestran datos representativos de dos experimentos independientes

DISCUSIÓN

5 Discusión

En este trabajo, hemos analizado las interacciones ligando/receptor entre la proteína murina PD-1H, uno de los últimos *immune checkpoints* descubiertos, y las proteínas VSIG3, VSIG8 y PSGL-1, recientemente propuestas como ligandos de PD-1H en la especie humana. Los experimentos realizados fueron llevados a cabo con el objetivo de aumentar el conocimiento que se tiene de la vía de señalización dirigida por PD-1H. A partir de la generación de las proteínas solubles recombinantes y de membrana de las moléculas mencionadas, estudiamos mediante ensayos ligando/receptor posibles interacciones entre las mismas. Los datos presentados muestran (a) la correcta generación conformacional de tres proteínas recombinantes solubles de PD-1H murino (mono, di y pentamérica), (b) la ausencia de interacción entre los ortólogos murinos de VSIG3, VSIG8 y PSGL-1 con la proteína murina PD-1H bajo las condiciones experimentales probadas, y, (c) la identificación de un posible ligando con afinidad por PD-1H, que se expresa únicamente en células T CD4 murinas, en ratones Balb/c y B6.

5.1 Relevancia biológica y clínica de los *immune checkpoints*

Los *immune checkpoints* son moléculas que regulan positiva o negativamente el curso de la respuesta inmunitaria, ayudando a mantener la homeostasis y colaborando en la eliminación de amenazas externas, evitando reacciones no deseadas contra tejidos sanos¹³⁴. Los avances en la comprensión de las vías coinhibidoras de células T, han hecho resurgir la inmunoterapia con el desarrollo de nuevos medicamentos efectivos para el tratamiento frente al cáncer, las enfermedades autoinmunes e infecciosas y el rechazo de trasplantes⁸. En este sentido, las características distintivas de PD-1H en cuanto a su patrón de expresión, restringido a células hematopoyéticas, y su estructura, hacen de PD-1H una molécula única que puede ofrecer nuevas posibilidades para la mejora de los tratamientos frente a estas enfermedades. La expresión de PD-1H en muchos tumores (carcinomas y tumores de origen epitelial), nos ha hecho pensar que esta molécula, más que como receptor, podría comportarse como ligando coinhibidor de un potencial receptor presente en los linfocitos T CD4.

En concreto, en la inmunoterapia antitumoral, donde el bloqueo de *immune checkpoints* mediante anticuerpos monoclonales se ha convertido en la principal herramienta^{69,81}. Debido a su modo de acción, los receptores coinhibidores pueden servir a las células cancerosas como vía de escape al control del sistema inmunitario¹³⁴.

El patrón de expresión de PD-1H, está restringido a células hematopoyéticas, ya sean de origen mieloide o linfoide, a excepción de las células B y las células NK, en las que no se ha detectado expresión alguna. Su mayor expresión, se localiza en las células de origen mieloide entre las que se encuentran los macrófagos y las células dendríticas⁶⁵. En su descubrimiento, esta característica llevó a pensar que podría desempeñar un papel en la regulación del sistema inmunitario, como así se confirmó más tarde⁸¹. Los estudios que se llevaron a cabo sobre esta molécula, con células y proteínas de origen murino y de origen humano, demostraron que se trataba de un receptor coinhibidor de las respuestas inmunitarias mediadas por células T. Los experimentos en los que se usaban proteínas recombinantes solubles de PD-1H, o anticuerpos con acción agonista frente a la molécula, llevaban a la inhibición de la proliferación de las células T y a la disminución de la producción de citoquinas implicadas en la activación de las mismas⁶⁵. De igual modo, el empleo de ratones y células KO para PD-1H, daba lugar a una alteración de las respuestas inmunitarias, observándose una activación espontánea de las células T⁶⁶. Todas estas evidencias, además de confirmar el papel coinhibidor del receptor PD-1H, refutaron la idea de que PD-1H poseía un papel funcional dual, pudiendo actuar como ligando y como receptor. ya que tanto la estimulación de PD-1H en células mieloides como en células T conduce a la inhibición de la actividad de las células T¹³⁵. Pese al conocimiento que se acumula del papel coinhibidor de PD-1H, sigue sin encontrarse un ligando concreto que nos permita conocer la vía de señalización que dirigiría PD-1H. Hasta ahora, solo se han postulado tres posibles candidatos a ligando de PD-1H, pero que parecen depender mucho del contexto en el que se encuentran^{75,96}. Por ejemplo, en el microambiente tumoral, donde el pH es más ácido y hay zonas donde no llega el oxígeno produciéndose hipoxia, la expresión de PD-1H aumenta inducida por HIF, y la protonación de sus histidinas podría modificar la capacidad de la molécula para interactuar con posibles ligandos^{83,96}.

A diferencia de otras vías bien caracterizadas, como las dirigidas por la interacción PD-1/PD-L1 o CD28/CTLA-1/CD80/CD86, el desconocimiento sobre el ligando de PD-1H, lleva a que solo sea posible establecer hipótesis que traten de explicar cómo se produce la transmisión de señales a través de esta molécula coinhibidora. Se cree que PD-1H podría interrumpir la cascada de señalización positiva transmitida por el complejo CD3-TCR a través de desfosforilaciones de los mediadores que intervienen en la activación de las células T, posiblemente por la activación de fosfatasas que son reclutadas a través de proteínas adaptadoras a la cola citoplasmática de PD-1H, carente de motivos ITIM o ITSM^{65,66}. En el caso de la vía mediada por PD-1/PD-L1, la transmisión de señales para atenuar la activación

de las células T es a través de los clásicos motivos de inhibición ITIM e ITSM^{45,46}. En cambio, los mecanismos empleados por CTLA-4, son mucho más diversos, incluyendo mecanismos intrínsecos y extrínsecos, siendo la competición por CD28 por la unión a CD80/86, su mecanismo principal⁴³.

Además de sus diferentes mecanismos de acción, los patrones de expresión que tienen estas moléculas, CTLA-4, PD-1 y PD-1H, influyen en el destino de la respuesta inmunitaria antitumoral, condicionando la elección de los tratamientos antitumorales con el objetivo de lograr la mayor eficacia terapéutica posible, mitigando los efectos secundarios de daño tisular en la mayor medida posible¹³⁵. En el caso de CTLA-4, altos niveles de expresión se correlacionan con una disminución de la activación de las células T, principalmente en los nódulos linfáticos, pero también en los tejidos periféricos. Además, la expresión de CTLA-4 en las células Treg es crucial para mantener la tolerancia sistémica¹³⁴. Por lo que en el bloqueo de la interacción de CTLA-4 con sus ligandos, mediante el uso de anticuerpos monoclonales, los efectos secundarios al tratamiento son más severos que en el caso del bloqueo de otros receptores coinhibidores⁶⁰. Por otro lado, la acción inhibidora de PD-1 se produce principalmente en los tejidos periféricos, ya que su expresión se induce en células T y células B, tras su activación y, concretamente, en su fase efectora. Los ligandos de PD-1, PD-L1 y PD-L2, a pesar de expresarse de manera constitutiva a niveles basales en ciertos tejidos, también aumentan significativamente su expresión tras estímulos inflamatorios¹³⁴. En este sentido, el bloqueo del ligando de PD-1, PD-L1, ha demostrado ser muy efectivo en ensayos clínicos. Sin embargo, su eficacia depende de su expresión en el tumor o en el microambiente tumoral¹³⁶. No obstante, debe usarse con precaución con mujeres embarazadas, ya que PD-L1 se expresa trofoblastos y su bloqueo podría desencadenar efectos secundarios no deseados¹²⁰. Teniendo en cuenta las limitaciones e inconvenientes que se derivan de las terapias basadas en el uso de los anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4, anti-PD-1 o anti-PD-L1, receptores coinhibidores como PD-1H, que se expresa tanto en células mieloides como células linfoides infiltrantes de tumores, podrían ser una alternativa más segura⁶⁶. De hecho, por su capacidad para funcionar como ligando y receptor, PD-1H podría ofrecer una regulación inmunitaria más fuerte que otros *immune checkpoints*¹³⁷.

Además, en las terapias combinadas, es importante elegir adecuadamente la combinación de anticuerpos monoclonales bloqueantes de receptores coinhibidores, ya que las respuestas que se obtienen son diferentes⁴³. Esto se hace patente, al observar como el bloqueo combinado de PD-1H con CTLA-4 es más eficaz, que el bloqueo de PD-1H con

PD-1, y conduce a una mejor respuesta frente al tumor en un modelo celular de carcinoma de células escamosas. Un tumor, que se caracteriza por el elevado número de células Treg que se localizan en el microambiente tumoral¹³⁸. Los tumores crean un ambiente inmunosupresor a su alrededor, atrayendo a células Treg y células mieloides supresoras, que muchas veces expresan ligandos para receptores coinhibidores. A veces, el propio tumor, o el microambiente tumoral, también expresa los ligandos de receptores coinhibidores. Lograr el equilibrio entre la potencia de los efectos antitumorales y la gravedad de los efectos secundarios asociados al tratamiento con anticuerpos monoclonales bloqueantes de receptores coinhibidores, es uno de los mayores retos de la modulación inmunitaria¹³⁴.

5.2 PD-1H, un *immune checkpoint* con características únicas

PD-1H es un regulador de las funciones de las células T, recientemente identificado, con potencial como diana en la terapia antitumoral, así como en otras enfermedades inflamatorias^{65,66}.

Existen gran controversia entre los dos grupos que han descubierto la molécula PD-1H, acerca de si se trata de un receptor o ligando, o podría desempeñar una función dual con transmisión de señales bidireccional, debido a sus características estructurales únicas. Wang et al. (2011) sugieren que PD-1H sería un ligando, mientras que Flies et al. (2011) afirman que podría comportarse también como receptor^{65,66}. Ambas suposiciones son aceptables, considerando que a diferencia de los ligandos de la familia B7, que poseen un dominio IgV y un dominio IgC, PD-1H tiene un solo dominio IgV en su región extracelular, lo que se relaciona más con las proteínas de esta familia que actúan como receptores. Sin embargo, los análisis filogenéticos comparando la secuencia de aminoácidos de PD-1H con la de varios miembros de la familia B7, establecen que la molécula presenta una mayor homología con el ligando PD-L1. Por tanto, este debate persiste y la identificación de la pareja de interacción con PD-1H es la única vía abierta, capaz de dar nueva luz y mejorar nuestro conocimiento de cómo aprovechar esta interacción desde un punto de vista terapéutico.

Recientemente, se han publicado dos artículos que han arrojado luz sobre la estructura de PD-1H, en los que se establecen una serie de características únicas y diferenciales respecto al resto de miembros de su familia. Mediante la cristalización de la proteína, tras la eliminación de las glicosilaciones, y el empleo de herramientas bioinformáticas, describen la estructura de PD-1H que permite dilucidar su función coinhibidora de la respuesta inmunitaria mediada por células T^{72,75}. En la secuencia de

aminoácidos de PD-1H, se observan seis residuos de cisteína conservados entre especies, cuatro de los cuales son únicos en la familia B7, con la capacidad de formar tres puentes disulfuro^{66,72}. Wang et al. (2011), sugirieron la posibilidad de que los cuatro residuos de cisteína únicos que presenta PD-1H en su dominio extracelular, pudieran formar puentes intramoleculares, participando en el plegamiento de la molécula, o puentes intermoleculares, para configurarse en forma dimérica. Alternativamente, también propusieron la posibilidad de que se combinara la formación de un puente disulfuro intramolecular y dos intermoleculares, presentando un patrón de puentes disulfuro único^{66,75}. Con la nueva información disponible acerca de la estructura de PD-1H, esos residuos de cisteína formarían dos puentes disulfuro intramoleculares que ayudarían a consolidar el plegamiento de la proteína, lo que contrasta con informaciones previas en las que PD-1H conformaría un dímero por la formación de puentes intermoleculares^{72,75,82}. Esta no es la única diferencia que podemos encontrar en la estructura de PD-1H, con respecto al resto de miembros de la familia B7. Entre otras diferencias, podemos destacar, en primer lugar, la estructura de su dominio IgV, que la engloba dentro de la IgSF y que consta de diez cadenas beta y tres hélices alfa que se disponen en forma de sándwich beta, a diferencia del plegamiento típico de la familia B7, que comprende un dominio IgV con nueve cadenas beta y un dominio constante de inmunoglobulina (IgC) con siete cadenas beta^{29,72,75}. El dominio IgC, se localizaría próximo a la membrana, mientras que el dominio IgV sería distal y responsable de la interacción con su receptor. En segundo lugar, PD-1H contiene una hélice adicional, que puede estar involucrada en la interacción con otras moléculas. En tercer lugar, posee un *loop* de mayor tamaño entre las cadenas C y C', que no tiene correspondencia con ninguna estructura de la familia B7⁷². Por último, PD-1H posee un porcentaje conservado y considerablemente alto de residuos de histidina en su región extracelular, que pueden ser importantes a la hora de entender como ejerce su función. Por la localización, en la región equivalente a la del CDR3 presente en los dominios variables del BCR y TCR implicados en el contacto con el antígeno, este grupo de histidinas, tres en la proteína humana y dos en la murina, podrían estar involucradas en la directa interacción con su ligando⁷⁵.

Las histidinas son aminoácidos que a pH fisiológico (7,4) se encuentran desprotonadas, pero que pueden protonarse cuando el pH se torna ácido. Slater y sus colaboradores (2020), proponen en su artículo la posibilidad de que PD-1H puede tener una sensibilidad particular al pH, de manera que en función del pH, la expresión o la capacidad de interacción de PD-1H con otras moléculas, podría variar⁷⁵. Esta característica conservada en la proteína murina, junto con la inusual orientación de la proteína en la membrana,

probablemente debida a la cadena beta extra que posee y a la formación de los puentes disulfuro extra, podrían ser determinantes en la capacidad de interacción de PD-1H con otras moléculas^{75,96}. Una publicación reciente, apoya la idea que sugiere que el pH podría ser un factor determinante a la hora de identificar los posibles ligandos de PD-1H⁹⁶. Johnston y colaboradores (2019), en su estudio postulan a PD-1H como ligando de PSGL-1 a pH ácido^{96,97,139}.

5.3 Oligomerización y conformación de las proteínas de fusión de PD-1H

En los estudios de interacción y función de proteínas, está ampliamente extendido el uso de proteínas de fusión multiméricas. La oligomerización puede aumentar la eficiencia de los procesos de señalización, ayudar a estabilizar y proteger a las proteínas de la acción de proteasas y puede amplificar las afinidades de las proteínas por sus ligandos, aumentando la avidez de la interacción¹⁴⁰.

La fusión de los dominios extracelulares de las proteínas a los dominios Fc de las Ig es una estrategia ampliamente empleada para facilitar el estudio de las mismas, mejorando su actividad a través de la dimerización, ya que la estructura de las Ig, en el caso de las IgG, el fragmento Fc permite el establecimiento de puentes disulfuro^{140,141}. Pero en nuestro caso, la imposibilidad de evidenciar interacciones productivas entre PD-1H y sus posibles ligandos, descritos en la especie humana, nos llevó a preguntarnos si era debido a la avidez insuficiente de la proteína dimérica, PD-1H.Ig, por su receptor. Encontramos una posible solución observando los resultados obtenidos por Voulgaraki y sus colaboradores (2005), en los que demostraban como la pentamerización de la proteína murina CD200, incrementaba la avidez de la interacción a través de dominio COMP y permitía detectar mejor la débil unión con su receptor ($KD \approx 1 \mu M$), frente a la trimerización de la misma¹⁴². La proteína COMP, es un péptido de unos 44 aminoácidos que permite la pentamerización espontánea formando un haz de cinco hélices α , orientadas de forma paralela y estabilizadas por la formación de puentes disulfuro¹⁴³. Además, el empleo de este dominio para generar estas moléculas de fusión pentaméricas, pueden tener una ventaja frente aquellas fusionadas con los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas a la hora de estudiar las interacciones con proteínas de superficie¹⁴².

Esta estrategia fue seguida en una publicación reciente, en la que fusionaron el dominio IgV de PD-1H humano al dominio de pentamerización COMP. Esta fusión PD-

1H.COMP, suprimía la proliferación y la liberación de citoquinas de las células T expuesta a estímulos policlonales *in vitro* y atenuaban las respuestas inflamatorias en modelos murinos de hepatitis y enfermedad injerto frente a huésped, mejorando las respuestas obtenidas con PD-1H.Ig¹⁴⁴. A través de sus experimentos, llegaron a la conclusión de que la capacidad de PD-1H para interactuar con su receptor dependía del nivel de oligomerización de la misma¹⁴⁴. Siguiendo la metodología utilizada en este artículo, generamos la proteína pentamérica PD-1H.COMP, que fue capaz de inhibir la unión del anticuerpo anti PD-1H (clon MIH64) a células NIH-3T3 que expresaban PD-1H en la superficie a una concentración menor a la necesitada de PD-1H.Ig, para observar el mismo efecto. A pesar de la correcta conformación de la proteína multimérica, no pudimos detectar interacción con sus posibles ligandos.

5.4 Posibles ligandos de PD-1H: VSIG3, VSIG8 y PSGL-1

Hasta la fecha, tres son los posibles ligandos identificados de PD-1H en la especie humana, VSIG3, VSIG8 y PSGL-1. Los dos primeros pertenecen a la familia VSIG (*V-Set And Immunoglobulin Domain Containing*), familia del recientemente identificado *immune checkpoint* TIGIT (VSIG9), mientras que PSGL-1 es una molécula de adhesión perteneciente a la familia de las mucinas⁶³.

Los miembros de la familia VSIG, perteneciente a la IgSF, se caracterizan por poseer dos dominios de tipo Ig en su región extracelular, que pueden ser IgV-IgC₂ o IgV-IgV, encontrándose diferencias entre las especies humana y murina⁹⁸. Varias de las proteínas de esta familia, VSIG1, VSIG3, VSIG4, VSIG8 y VSIG9, han sido reconocidos como coinhibidores de la respuesta inmunitaria de células T, por lo que están en el punto de mira como posibles dianas en la inmunoterapia antitumoral^{62,97,99-102}. El primero de los miembros de esta familia relacionado con hPD-1H fue hVSIG3, una proteína transmembrana que se expresa principalmente en los testículos y el cerebro, pero cuya expresión en tejido linfoides aún no ha sido descrita^{97,145,146}. La interacción entre hPD-1H y hVSIG3, se determinó mediante ensayos de tipo ELISA, que permiten tanto cuantificar la cantidad de proteína existente en una determinada solución como detectar la interacción entre proteínas, y se confirmó por SPR (resonancia de plasma de superficie), pero las dificultades encontradas por distintos grupos de investigadores de visualizar esta interacción empleando otros sistemas de estudio lleva a pensar en sí realmente esta interacción tiene relevancia biológica^{72,96,97,139}. Por otro lado se encuentra VSIG8, una proteína de membrana que se expresa en el folículo piloso y en las capas superficiales de la matriz ungueal y del epitelio oral¹⁴⁷. A pesar de que haya sido

registrado bajo una patente estadounidense (WO2016090347 A1), no hay mucha información disponible que apoye a hVSIG8 como ligando de hPD-1H. El grupo de Yang et al. (2017), que determinó la interacción hVSIG3-hPD-1H, no encontró relación con otros miembros de la familia VSIG, incluido VSIG8⁹⁷.

Mientras que VSIG3 y VSIG8 tienen un patrón de expresión muy restringido y no descrito en tejido linfoide, PSGL-1 se expresa principalmente en las células linfoides y mieloides, incluidas las plaquetas¹⁰⁴. Aunque se sabe que PSGL-1 regula principalmente la migración celular, debido a su capacidad de señalización, también actúa como un potente coinhibidor de la función de las células T¹⁰³. PSGL-1 es una proteína cargada negativamente, que en condiciones de pH ácido interacciona con PD-1H, ya que en estas condiciones, las histidinas presentes en el dominio IgV de PD-1H están cargadas positivamente permitiendo la unión^{75,96}.

Las tres moléculas, VSIG3, VSIG8 y PSGL-1, en cuanto a estructura y función, parecen estar reguladas de manera similar entre especies. En cuanto a las dos primeras, presentan una gran homología entre la especie humana y murina a nivel de la región extracelular, un 88% en ambos casos^{97,102}. PSGL-1 conserva el sitio central de O-glicosilación y el dominio tipo mucina. Sin embargo, existen repeticiones decaméricas y polimorfismos variables entre especies¹⁰³. Pese a que en los ratones no se ha descrito la interacción de PD-1H con estas proteínas, dada la conservación de los dominios que intervienen en la unión con otras moléculas, se podría pensar que esta relación podría extrapolarse a esta especie, lo que sería de enorme interés para poder ser utilizado como modelo preclínico válido de enfermedad.

Pese a los resultados obtenidos por Prodeus et al. (2017) con las proteínas humanas en las que observaron un aumento de la afinidad entre PD-1H y VSIG3 (K_D de 1,3 μ M a 0,024 μ M) al pentamerizar la primera, en nuestros ensayos, hemos sido incapaces de visualizar esta unión con las proteínas ortólogas murinas, al menos en ELISA y citometría de flujo¹⁴⁴. A pesar de que la citometría de flujo, a diferencia de las técnicas ELISA y SPR, permite analizar las interacciones empleando células intactas, es muy posible que la afinidad de interacción de las proteínas estudiadas se encuentre por debajo del límite de detección de la técnica. Además, la expresión de VSIG3, es indetectable en los compartimentos hematopoyéticos, por lo que se desconoce la importancia biológica que podría desempeñar esta interacción⁷⁴. En cuanto a las uniones inespecíficas que hemos observado en los ensayos de unión en citometría de flujo, podrían deberse a proteoglicanos de heparán sulfato

presentes en la membrana de las líneas celulares empleadas, que la dotan de cargas negativas que interaccionarían con las histidinas protonadas de mPD-1H⁹⁶. La protonación es una modificación importante, que puede cambiar el resultado de la interacción ligando/receptor y, por lo tanto, el destino de la respuesta inmunitaria⁹².

En los experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, no hemos podido reproducir estas interacciones empleando los ortólogos murinos de las proteínas VSIG3, VSIG8, PD-1H y PSGL-1, bajo las condiciones empleadas. Pese a la homología entre los ortólogos, siendo de un 85,6% para el caso de PD-1H, la capacidad de esta proteína de interaccionar con otras moléculas podría estar enmascarada por los patrones de glicosilación y las condiciones particulares de pH del contexto inflamatorio⁶⁶. Recientemente, se ha demostrado que la expresión de PD-1H también se ve afectada tanto *in vitro* como *in vivo* por condiciones hipóxicas⁸³. En esta situación, el factor de transcripción HIF induce la expresión de PD-1H. Por lo que, podría ser que PD-1H tuviera más de un ligando, estableciendo diferentes interacciones en función del contexto en el que se encuentre.

Pese a no haber podido identificar la interacción de ninguno de los ligandos propuestos, PSGL-1 parece ser el candidato con más posibilidades. Si bien es cierto, que la posible interacción entre PD-1H y PSGL-1, estaría restringida a contextos muy determinados. Se ha llegado a postular que, dadas las similitudes en el amplio patrón de expresión de ambas moléculas, estas podrían interaccionar en configuración *cis* sobre la misma célula para ejercer su función inhibidora. El principal problema, es que para que esta interacción tenga lugar, es necesario que las histidinas de PD-1H se encuentren protonadas y requiere la sulfatación de las tirosinas de PSGL-1⁷⁴.

Un hallazgo de gran interés que se deriva de nuestros intentos por identificar el posible ligando de mPD-1H, es que detectamos la unión de la proteína soluble recombinante mPD-1H-bio de manera exclusiva en la superficie de las células T CD4. Esto implicaría que se trata de una molécula distinta a PSGL-1, dado que ésta se expresa en células linfoides y mieloides¹⁰⁴. La interacción de PD-1H con PSGL-1, en función del sistema experimental empleado puede ser más complicada de dilucidar. PSGL-1 es una molécula compleja, muy glicosilada, cuya capacidad de interacción con otras moléculas depende de su nivel de glicosilación, sialilación, fucosilación y sulfatación¹⁰³. A diferencia de las anteriores, el grado de similitud general de PSGL-1 entre las especies humana y murina, es tan solo del 67%¹⁴⁸. Además, PD-1H inhibe la función de las células T en múltiples contextos, sin un claro requerimiento de pH ácido.

Esta incapacidad para reproducir en la especie murina, las interacciones observadas en la especie humana, puede deberse a las diferencias existentes entre unas moléculas y otras, consecuencia de la evolución de las especies¹⁴⁹. La mayoría de los mecanismos principales de los que se sirve el sistema inmunitario son muy similares entre ratones y humanos. Sin embargo, existen diferencias significativas entre unos y otros en el desarrollo del sistema inmunitario, la activación y la respuesta a patógenos¹⁵⁰. De manera que no siempre se pueden trasladar los resultados obtenidos de una especie, a la otra. Además de que difieren enormemente tanto en tamaño como en esperanza de vida, la presión evolutiva a la que se han sometido por parte de los patógenos es muy diferente, ya que vivimos en nichos ecológicos muy distintos^{149,150}. Un ejemplo claro de estas diferencias es el equilibrio de linfocitos y neutrófilos, la sangre humana es más rica en neutrófilos, mientras la murina lo es más en linfocitos¹⁵⁰. Incluso las moléculas de la familia B7, que están muy conservadas dentro de la misma especie debido a la importancia funcional de las mismas, presentan diferencias entre unas especies y otras²⁹.

Además de las diferencias que podemos observar de manera general en el funcionamiento del sistema inmunitario en distintas especies, a la hora de los estudios de interacción entre moléculas son de importancia vital las regiones determinantes de complementariedad (CDR). En el caso de los anticuerpos, la diversidad del CDR3 es suficiente para permitir que moléculas de IgM idénticas distinguan entre una gran variedad de antígenos. Se observa la misma situación en los TCR, la diversidad de los CDR3 son clave en la especificidad del reconocimiento de antígenos¹⁵¹. En los miembros de la IgSF se encuentran regiones similares a estas (*CDR3-like*) en los bucles que se forman entre las cadenas F y G de los dominios IgV⁷⁵. En este sentido, la diferencia de esta región entre la especie humana y murina, puede ser la causa de que no haya sido posible replicar las interacciones entre PD-1H y sus ligandos observadas en la especie humana.

De igual manera a las dificultades encontradas para reproducir en la especie murina las interacciones observadas con las proteínas humanas, hemos podido comprobar como la expresión de PD-1H *in vitro* en células primarias, también se ve muy afectada por las condiciones de cultivo^{96,97}. La expresión de PD-1H en células procedentes de bazo, cultivadas en presencia o ausencia de estímulos policlonales (anti-CD3/anti-CD28, PMA/Ionomicina y ConA) durante 24-48 horas antes del análisis, muestran la pérdida de la expresión de la misma en células T CD4 y células T CD8. Wang et al. (2011) observó el mismo fenómeno de pérdida de expresión de PD-1H murino en cultivo. Por otro lado, Flies et al. (2011) vieron

como la expresión de PD-1H aumenta en presencia de PMA/Ionomicina en las 2 horas siguientes a la estimulación y como disminuía con el tiempo en cultivo⁶⁵. Cuando analizamos la expresión de mPD-1H en tiempos más cortos, sí observamos un aumento de expresión de la misma tras dos horas en cultivo, sin apenas diferencias en células estimuladas y sin estimular. A diferencia del comportamiento de su homólogo PD-1L, cuya expresión se incrementa tras la estimulación de las células T CD4 en cultivo, lo que sugiere que las condiciones del entorno influyen en gran medida en la expresión PD-1H⁶⁶.

5.5 Influencia del patrón de glicosilación en la interacción entre proteínas

Dentro de las modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas en las células eucariotas, hay que destacar el proceso de glicosilación, ya que es esencial tanto para la conformación, como para la estabilidad y la función de la molécula¹⁵². Se trata de un proceso complejo, por la heterogeneidad de las modificaciones que implica, y que influye en la capacidad de interacción de las proteínas¹⁵³. Es un proceso dinámico, en el que la unión de unos u otros azúcares a las proteínas, va a depender de las enzimas presentes en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, así como del tipo celular y de las señales celulares^{154,155}. Los tipos más comunes de glicosilaciones son la N-glicosilación, en la que los oligosacáridos están unidos a la asparagina (Asn) en la secuencia conservada Asn-X-Ser/Thr, y la O-glicosilación, donde los oligosacáridos se unen a aminoácidos con grupos funcionales hidroxilo¹⁵². La N-glicosilación es un proceso metabólico altamente conservado, común en proteínas plasmáticas, lectinas y receptores de la superficie celular¹⁵⁵. Dentro de la misma proteína, diferentes residuos de Asn, pueden incorporar estructuras de oligosacáridos diferentes¹⁵⁵.

Todas las proteínas estudiadas en este trabajo, poseen sitios potenciales de N-glicosilación, a excepción de VSIG8, que pueden influir en la interacción entre proteínas. En el caso de PD-1H, se trata de una proteína muy glicosilada, en la que se identifican tres sitios de N-glicosilación en la región extracelular, que se conservan entre las especies humana y murina^{65,68}. Dada su glicosilación, es posible que los oligosacáridos que posee puedan contribuir a su función coinhibidora⁷⁵. En cuanto a los posibles ligandos de PD-1H, VSIG3 presenta un único punto de N-glicosilación conservado entre especies^{145,156}. En cambio, PSGL-1, posee modificaciones postraduccionales de O-glicosilación y N-glicosilación, que varían entre especies. La proteína PSGL-1 humana, consta de un punto de O-glicosilación y tres de N-glicosilación en su región extracelular. Mientras que la proteína murina, en lugar de

tres sitios potenciales de N-glicosilación, tiene dos^{104,148}. Se desconoce si el patrón de glicosilación influye en la capacidad de interacción de PD-1H y VSIG8 con otras moléculas, pero para PSGL-1, el patrón de glicosilación parece determinante en su capacidad para interactuar con unos ligandos u otros¹⁰⁴.

En este trabajo, se han producido las proteínas recombinantes solubles murinas de PD-1H, VSIG3, VSIG8 y PSGL-1. De manera previa a la realización de los ensayos de unión, estas proteínas, se analizaron por SDS-PAGE e *immunoblot*. En todos los casos, se observaron patrones anchos de banda con pesos moleculares superiores a los esperados, sobre todo en condiciones reductoras, lo que puede correlacionarse con los procesos de glicosilación que pueden sufrir estas moléculas. La ausencia de interacción entre mPD-1H y sus posibles ligandos, pueden deberse a las posibles glicosilaciones que pueden sufrir estas proteínas durante su producción. Ya sea por fallos en el proceso de modificación postraduccional, degradaciones o modificaciones de las glicosilaciones, ya que es un proceso que se ve afectado por el medio de cultivo utilizado, la eficiencia de la expresión de la proteína y el tipo celular, así como por el estado fisiológico de la misma¹⁵³.

5.6 Perspectivas futuras

Los resultados clínicos obtenidos mediante el uso de inhibidores frente a los receptores coinhibidores PD-1 y CTLA-4, ha abierto la puerta al diseño de nuevas inmunoterapias en cáncer. Sin embargo, no todos los pacientes con cáncer responden a estos tratamientos, debido en gran medida a la complejidad de las vías dirigidas por los receptores coinhibidores y a la enorme resistencia tumoral y la capacidad de éstos, de evadir la respuesta inmunitaria antitumoral¹⁵⁷. Los tumores aumentan la expresión de ligandos para los receptores coinhibidores y modulan el microambiente tumoral, alterando la expresión de estos ligandos en las células inmunitarias infiltrantes y el propio estroma del tumor, mediando la resistencia tumoral a la inmunoterapia^{158,159}. Hay que tener en cuenta también, que pese a lo prometedoras que se vislumbran estas terapias, no están exentas de efectos secundarios adversos¹³⁴. Por lo tanto, comprender los mecanismos moleculares precisos de los diferentes *immune checkpoints* contribuirá a la mejora del diseño de estrategias terapéuticas eficaces, ya sean en monoterapia o en combinación frente a otros *immune checkpoints* no redundantes, y a superar la resistencia potencial que ofrecen los tumores a este tipo de inmunoterapias produciendo beneficios clínicos notables^{159,160}.

Los estudios llevados a cabo en modelos murinos de enfermedad sobre el receptor coinhibidor PD-1H, sacan a relucir la polivalencia de esta proteína en el control de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas⁷⁸. Pese a ello, sigue habiendo muchas incógnitas sobre esta molécula por descifrar, que permitirán en un futuro próximo explotar su potencial máximo a nivel clínico¹⁶⁰. Quizás, el mayor interrogante que hay sobre PD-1H sea el mecanismo molecular por el cuál modula la función de diversos tipos de células⁷⁸. En este sentido, conocer como tiene lugar la transmisión de señales del receptor PD-1H y la identificación de sus ligandos, ayudarán a aclarar el papel de esta molécula en el contexto de las enfermedades autoinmunes e inflamatorias^{92,111}.

En este sentido, además de la dificultad que supone identificar nuevos receptores coinhibidores que puedan ser explotados en la clínica, en ocasiones, también nos enfrentamos al reto de la traslación de resultados preclínicos a la clínica. Cada vez se hace más patente la necesidad de desarrollar mejores herramientas que permitan generar proteínas recombinantes que ayuden a estudiar las interacciones ligando/receptor que se observan en la especie humana y así, poder establecer estrategias terapéuticas para el tratamiento de distintas enfermedades. En el caso de las proteínas recombinantes, hay que destacar el papel que juegan los patrones de glicosilación de éstas en su interacción con unas u otras moléculas¹⁵³. Pese a que el repertorio de glicosilación de células humanas es semejante al de otras células de mamíferos, siguen existiendo diferencias significativas ya que estos patrones son característicos tanto de la especie animal como del órgano o célula en el que se sintetizan^{154,155}. Otro de los puntos a tener en cuenta en el diseño de proteínas recombinantes, es que la interacción de los receptores coinhibidores con sus ligandos es, en general, de baja afinidad. Esta característica, dificulta tanto la identificación de nuevos ligandos como el estudio de las interacciones ligando/receptor. Este problema puede minimizarse mejorando la avidéz de la reacción, a través de la multimerización de las proteínas recombinantes utilizadas¹⁴². PD-1H es una proteína con varios puntos de glicosilación, por lo que la mejora de las herramientas existentes para la producción de proteínas recombinantes facilitaría no solo el estudio del comportamiento de la propia proteína, sino también la identificación de los posibles ligandos de la misma.

CONCLUSIONES

6 Conclusiones

1. PD-1H se expresa constitutivamente en células mieloides, células T y Tregs y está ausente en células B y células NK
2. Las proteínas recombinantes solubles mPD-1H.COMP multimérica y Flag.mPD-1H.AviTag monomérica conservan la conformación nativa de la región extracelular de PD-1H.
3. La baja afinidad de la interacción entre PD-1H humano y los ligandos caracterizados no es detectable en la especie murina en citometría de flujo o ELISA.
4. El ligando de mPD-1H podría expresarse en células T CD4 maduras.

REFERENCIAS

7 Referencias

1. Furman, D. & Davis, M. M. New approaches to understanding the immune response to vaccination and infection. *Vaccine* **33**, 5271–5281 (2015).
2. Ceeraz, S., Nowak, E. C. & Noelle, R. J. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol.* **34**, 556–563 (2013).
3. Santana, M. A. & Esquivel-Guadarrama, F. Cell biology of T cell activation and differentiation. *Int. Rev. Cytol.* **250**, 217–274 (2006).
4. Corthay, A. A three-cell model for activation of naive T helper cells. *Scand. J. Immunol.* **64**, 93–96 (2006).
5. Curtsinger, J. M. & Mescher, M. F. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 333–340 (2010).
6. Le Mercier, I., Lines, J. L. & Noelle, R. J. Beyond CTLA-4 and PD-1, the generation Z of negative checkpoint regulators. *Frontiers in Immunology* **6**, 418 (2015).
7. Delves, P. J. & Roitt, I. M. The immune system. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* **343**, 108–117 (2000).
8. Schildberg, F. A., Klein, S. R., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. Coinhibitory pathways in the B7-CD28 ligand-receptor family. *Immunity* **44**, 955–972 (2016).
9. Chen, L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 336–347 (2004).
10. Kinnear, G., Jones, N. D. & Wood, K. J. Costimulation blockade: Current perspectives and implications for therapy. *Transplantation* **95**, 527–535 (2013).
11. Azuma, M. Co-signal Molecules in T-Cell Activation: Historical Overview and Perspective. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1189**, 3–23 (2019).
12. Jung, K. & Choi, I. Emerging co-signaling networks in T cell immune regulation. *Immune Netw.* **13**, 184–193 (2013).
13. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 227–242 (2013).
14. Love, P. E. & Hayes, S. M. ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, 2485 (2010).
15. Pennock, N. *et al.* T cell responses: Naive to memory and everything in between. *Adv. Physiol. Educ.* **37**, 273–283 (2013).
16. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 486–499 (2015).

17. Thaventhiran, T. T cell co-inhibitory receptors-functions and signalling mechanisms. *J. Clin. Cell. Immunol.* **01**, 4 (2013).
18. Patsoukis, N. *et al.* Immunometabolic regulations mediated by coinhibitory receptors and their impact on T cell immune responses. *Front. Immunol.* **8**, 330 (2017).
19. del Rio, M. L., Lucas, C. L., Buhler, L., Rayat, G. & Rodriguez-Barbosa, J. I. HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 223–235 (2010).
20. Guo, Y. & Wang, A. Y. Novel immune check-point regulators in tolerance maintenance. *Front. Immunol.* **6**, 421 (2015).
21. Guy, C. S. & Vignali, D. A. A. Organization of proximal signal initiation at the TCR:CD3 complex. *Immunol. Rev.* **232**, 7–21 (2009).
22. Cantrell, D. A. T-cell antigen receptor signal transduction. *Immunology* **105**, 369–374 (2002).
23. Ogawa, S. & Abe, R. Signal transduction via co-stimulatory and co-inhibitory receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1189**, 85–133 (2019).
24. Qin, A., Coffey, D. G., Warren, E. H. & Ramnath, N. Mechanisms of immune evasion and current status of checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer Med.* **5**, 2567–2578 (2016).
25. Natarajan, K., Mage, M. G. & Margulies, D. H. Immunoglobulin superfamily. *eLS* 1–7 (2015). doi:10.1002/9780470015902.a0000926.pub2
26. Halaby, D. M. & Mornon, J. P. E. The immunoglobulin superfamily: An insight on its tissular, species, and functional diversity. *J. Mol. Evol.* **46**, 389–400 (1998).
27. Buck, C. A. Immunoglobulin superfamily: Structure, function and relationship to other receptor molecules. *Semin. Cell Biol.* **3**, 179–188 (1992).
28. Rubinstein, R., Ramagopal, U. A., Nathenson, S. G., Almo, S. C. & Fiser, A. Functional classification of immune regulatory proteins. *Structure* **21**, 766–776 (2013).
29. Collins, M., Ling, V. & Carreno, B. M. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.* **6**, 223 (2005).
30. Zou, W., Wolchok, J. D. & Chen, L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci. Transl. Med.* **8**, 328 (2016).
31. Hansen, J. A., Martin, P. J. & Nowinski, R. C. Monoclonal antibodies identifying a novel T-Cell antigen and Ia antigens of human lymphocytes. *Immunogenetics* **10**, 247–260 (1980).

32. Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A. & Bluestone, J. A. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity* **44**, 973–988 (2016).
33. Rotte, A., Jin, J. Y. & Lemaire, V. Mechanistic overview of immune checkpoints to support the rational design of their combinations in cancer immunotherapy. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **29**, 71–83 (2018).
34. Chambers, C. A. & Allison, J. P. Costimulatory regulation of T cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 203–210 (1999).
35. Elgueta, R. *et al.* Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol. Rev.* **229**, 152–172 (2009).
36. Rudd, C. E., Taylor, A. & Schneider, H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol. Rev.* **229**, 12–26 (2009).
37. Rudd, C. E. & Schneider, H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 544–556 (2003).
38. Brunet, J. F. *et al.* A new member of the immunoglobulin superfamily CTLA-4. *Nature* **328**, 267–270 (1987).
39. Anderson, A. C., Joller, N. & Kuchroo, V. K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity* **44**, 989–1004 (2016).
40. Murakami, N. & Riella, L. V. Co-inhibitory pathways and their importance in immune regulation. *Transplantation* **98**, 3–14 (2014).
41. Hellmann, M. D., Friedman, C. F. & Wolchok, J. D. Combinatorial cancer immunotherapies. *Adv. Immunol.* **130**, 251–277 (2016).
42. Baumeister, S. H., Freeman, G. J., Dranoff, G. & Sharpe, A. H. Coinhibitory pathways in immunotherapy for cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **34**, 539–573 (2016).
43. Deng, J., Le Mercier, I., Kuta, A. & Noelle, R. J. A new VISTA on combination therapy for negative checkpoint regulator blockade. *J. Immunother. Cancer* **4**, 86 (2016).
44. Wing, K. *et al.* CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science* **322**, 271–275 (2008).
45. Brown, J. A. *et al.* Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J. Immunol.* **170**, 1257–1266 (2003).
46. Tumeh, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568–571 (2014).
47. Bardhan, K., Anagnostou, T. & Boussiotis, V. A. The PD1:PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. *Front. Immunol.* **7**, 550 (2016).

48. Nishimura, H. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science (80-.).* **291**, 319–322 (2001).
49. Zhao, Y. *et al.* PD-L1:CD80 cis-heterodimer triggers the co-stimulatory receptor CD28 while repressing the inhibitory PD-1 and CTLA-4 pathways. *Immunity* **51**, 1059–1073 (2019).
50. Sugiura, D. *et al.* Restriction of PD-1 function by cis PD-L1/CD80 interactions is required for optimal T cell responses. *Science (80-.).* **364**, 558–566 (2019).
51. Triebel, F. *et al.* LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J. Exp. Med.* **171**, 1393–405 (1990).
52. Huang, C.-T. *et al.* Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* **21**, 503–513 (2004).
53. Workman, C. J., Dugger, K. J. & Vignali, D. A. A. Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3. *J. Immunol.* **169**, 5392–5395 (2002).
54. Woo, S.-R. *et al.* Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res.* **72**, 917–927 (2012).
55. Okazaki, T. *et al.* PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice. *J. Exp. Med.* **208**, 395–407 (2011).
56. Wang, J. *et al.* Fibrinogen-like protein 1 is a major immune inhibitory ligand of LAG-3. *Cell* **176**, 334–347 (2019).
57. Anderson, A. C. *et al.* Th1 transcription factor T-bet regulates the expression of Tim-3. *Eur. J. Immunol.* **40**, 859–866 (2010).
58. Monney, L. *et al.* Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* **415**, 536–541 (2002).
59. Lee, J. *et al.* Phosphotyrosine-dependent coupling of Tim-3 to T-cell receptor signaling pathways. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3963–3974 (2011).
60. Torphy, R., Schulick, R. & Zhu, Y. Newly emerging immune checkpoints: promises for future cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 2642 (2017).
61. Yu, X. *et al.* The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* **10**, 48–57 (2009).
62. Levin, S. D. *et al.* Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T cell function. *Eur. J. Immunol.* **41**, 902–915 (2011).
63. Dougall, W. C., Kurtulus, S., Smyth, M. J. & Anderson, A. C. TIGIT and CD96: new

- checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* **276**, 112–120 (2017).
64. Wing, J. B., Tay, C. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cells by co-signal molecules. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1189**, 179–210 (2019).
65. Flies, D. B., Wang, S., Xu, H. & Chen, L. Cutting edge: A monoclonal antibody specific for the Programmed Death-1 Homolog prevents Graft-versus-Host Disease in mouse models. *J. Immunol.* **187**, 1537–1541 (2011).
66. Wang, L. *et al.* VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. *J. Exp. Med.* **208**, 577–592 (2011).
67. Aloia, L., Parisi, S., Fusco, L., Pastore, L. & Russo, T. Differentiation of embryonic stem cells 1 (Dies1) is a component of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) signaling pathway required for proper differentiation of mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 7776–7783 (2010).
68. Sakr, M. A. *et al.* GI24 enhances tumor invasiveness by regulating cell surface membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Sci.* **101**, 2368–2374 (2010).
69. Nowak, E. C. *et al.* Immunoregulatory functions of VISTA. *Immunol. Rev.* **276**, 66–79 (2017).
70. Wang, Q., He, J., Flies, D. B., Luo, L. & Chen, L. Programmed death one homolog maintains the pool size of regulatory T cells by promoting their differentiation and stability. *Sci. Rep.* **7**, 6086 (2017).
71. Flies, D. B. *et al.* Coinhibitory receptor PD-1H preferentially suppresses CD4(+) T cell-mediated immunity. *J. Clin. Invest.* **124**, 1966–1975 (2014).
72. Mehta, N. *et al.* Structure and functional binding epitope of V-domain Ig Suppressor of T Cell Activation. *Cell Rep.* **28**, 2509–2516.e5 (2019).
73. Liu, J. *et al.* Immune-checkpoint proteins VISTA and PD-1 nonredundantly regulate murine T-cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 6682–6687 (2015).
74. ElTanbouly, M. A., Schaafsma, E., Noelle, R. J. & Lines, J. L. VISTA: Coming of age as a multi-lineage immune checkpoint. *Clin. Exp. Immunol.* **200**, 120–130 (2020).
75. Slater, B. T., Han, X., Chen, L. & Xiong, Y. Structural insight into T cell coinhibition by PD-1H (VISTA). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 1648–1657 (2020).
76. Lines, J. L. *et al.* VISTA is an immune checkpoint molecule for human T cells. *Cancer Res.* **74**, 1924–1932 (2014).
77. Pommié, C., Levadoux, S., Sabatier, R., Lefranc, G. & Lefranc, M.-P. IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino

- acid properties. *J. Mol. Recognit.* **17**, 17–32 (2004).
78. Xu, W., Hi u, T., Malarkannan, S. & Wang, L. The structure, expression, and multifaceted role of immune-checkpoint protein VISTA as a critical regulator of anti-tumor immunity, autoimmunity, and inflammation. *Cell. Mol. Immunol.* **15**, 438–446 (2018).
 79. Flies, D. B., Higuchi, T. & Chen, L. Mechanistic assessment of PD-1H coinhibitory receptor–induced T cell tolerance to allogeneic antigens. *J. Immunol.* **194**, 5294–5304 (2015).
 80. ElTanbouly, M. A. *et al.* VISTA is a checkpoint regulator for naive T cell quiescence and peripheral tolerance. *Science (80-.)*. **367**, eaay0524 (2020).
 81. Le Mercier, I. *et al.* VISTA regulates the development of protective antitumor immunity. *Cancer Res.* **74**, 1933–1944 (2014).
 82. Yoon, K. W. *et al.* Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. *Science (80-.)*. **349**, 1261669–1261669 (2015).
 83. Deng, J. *et al.* Hypoxia-induced VISTA promotes the suppressive function of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Res.* **7**, 1079–1090 (2019).
 84. Ohno, T., Kondo, Y., Zhang, C., Kang, S. & Azuma, M. Immune checkpoint molecule, VISTA regulates T-cell-mediated skin inflammatory responses. *The Journal of investigative dermatology* **137**, 1384–1386 (2017).
 85. Liu, H. *et al.* A crucial role of the PD-1H coinhibitory receptor in suppressing experimental asthma. *Cell. Mol. Immunol.* **15**, 838–845 (2018).
 86. Ceeraz, S. *et al.* VISTA deficiency accelerates the development of fatal murine lupus nephritis. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **69**, 814–825 (2017).
 87. Ceeraz, S. *et al.* VISTA deficiency attenuates antibody-induced arthritis and alters macrophage gene expression in response to simulated immune complexes. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 270 (2017).
 88. Bharaj, P. *et al.* Characterization of Programmed Death-1 Homologue-1 (PD-1H) expression and function in normal and HIV infected individuals. *PLoS One* **9**, e109103 (2014).
 89. Blando, J. *et al.* Comparison of immune infiltrates in melanoma and pancreatic cancer highlights VISTA as a potential target in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 1692–1697 (2019).
 90. Villarroel-Espindola, F. *et al.* Spatially resolved and quantitative analysis of

- VISTA/PD-1H as a novel immunotherapy target in human non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **24**, 1562–1573 (2018).
91. Mulati, K. *et al.* VISTA expressed in tumour cells regulates T cell function. *Br. J. Cancer* **120**, 115–127 (2019).
 92. ElTanbouly, M. A., Croteau, W., Noelle, R. J. & Lines, J. L. VISTA: A novel immunotherapy target for normalizing innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* **42**, 101308 (2019).
 93. Liu, Y. A VISTA on PD-1H. *J. Clin. Invest.* **124**, 1891–1893 (2014).
 94. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* **12**, 252–264 (2012).
 95. Sasikumar, P. G. *et al.* Functional antagonism of VSIG8-mediated immune suppression by oral VISTA agents. in *Immune Modulators* **17**, B006 (2018).
 96. Johnston, R. J. *et al.* VISTA is an acidic pH-selective ligand for PSGL-1. *Nature* **574**, 565–570 (2019).
 97. Wang, J. *et al.* VSIG-3 as a ligand of VISTA inhibits human T-cell function. *Immunology* **156**, 74–85 (2019).
 98. Duprat, E., Kaas, Q., Garelle, V. & Lefranc, M. P. IMGT standardization for alleles and mutations of the V-LIKE-DOMAINS and C-LIKE-DOMAINS of the immunoglobulin superfamily. *Res. Devel. Hum. Genet.* **2**, 111–136 (2004).
 99. Inoue, Y. *et al.* Characterization of V-set and immunoglobulin domain containing 1 exerting a tumor suppressor function in gastric, lung, and esophageal cancer cells. *Cancer Sci.* **108**, 1701–1714 (2017).
 100. Vogt, L. *et al.* VSIG4, a B7 family-related protein, is a negative regulator of T cell activation. *J. Clin. Invest.* **116**, 2817–2826 (2006).
 101. Zang, X. & Allison, J. P. To be or not to be B7. *J. Clin. Invest.* **116**, 2590–2593 (2006).
 102. Wang, J. *et al.* VSIG-8 is a co-inhibitory ligand and an immune checkpoint molecule for human T cells. *J. Immunol.* **200**, 47.4 (2018).
 103. Tinoco, R. *et al.* PSGL-1 Is an immune checkpoint regulator that promotes T cell exhaustion. *Immunity* **44**, 1470 (2016).
 104. Tinoco, R., Otero, D. C., Takahashi, A. A. & Bradley, L. M. PSGL-1: A new player in the immune checkpoint landscape. *Trends Immunol.* **38**, 323–335 (2017).
 105. Hernandez-Martinez, J.-M., Vergara, E., Zatarain-Barrón, Z. L., Barrón-Barrón, F. & Arrieta, O. VISTA/PD-1H: a potential target for non-small cell lung cancer immunotherapy. *J. Thorac. Dis.* **10**, 6378–6382 (2018).

106. Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* (80-.). **348**, 69–74 (2015).
107. Lu, R.-M. *et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J. Biomed. Sci.* **27**, 1 (2020).
108. Leach, D. R., Krummel, M. F. & Allison, J. P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* **271**, 1734–1736 (1996).
109. Topalian, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti–PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2443–2454 (2012).
110. Andrae, S., Piras, F., Burdin, N. & Triebel, F. Maturation and activation of dendritic cells induced by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J. Immunol.* **168**, 3874–3880 (2002).
111. Tagliamento, M., Bironzo, P. & Novello, S. New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of VISTA. *ESMO Open* **4**, e000683 (2020).
112. Li, K. & Tian, H. Development of small-molecule immune checkpoint inhibitors of PD-1/PD-L1 as a new therapeutic strategy for tumour immunotherapy. *J. Drug Target.* **27**, 244–256 (2019).
113. Musielak, B. *et al.* CA-170 - A potent small-molecule PD-L1 inhibitor or not? *Molecules* **24**, 2804 (2019).
114. Powderly, J. *et al.* CA-170, a first in class oral small molecule dual inhibitor of immune checkpoints PD-L1 and VISTA, demonstrates tumor growth inhibition in pre-clinical models and promotes T cell activation in Phase 1 study. *Ann. Oncol.* **28**, 405–406 (2017).
115. Ingram, P. J., Thakkar, D. & Boyd-Kirkup, J. D. HMBD002, a novel neutralizing antibody targeting a specific epitope on the co-inhibitory immune checkpoint receptor VISTA, displays potent anti-tumor effects in pre-clinical models. *Cancer Res.* **77**, 587 (2017).
116. Buchbinder, E. I. & Desai, A. CTLA-4 and PD-1 pathways: Similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am. J. Clin. Oncol.* **39**, 98–106 (2016).
117. Jenkins, M. K. The ups and downs of T cell costimulation. *Immunity* **1**, 443–446 (1994).
118. del Rio, M. L., Buhler, L., Gibbons, C., Tian, J. & Rodriguez-Barbosa, J. I. PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2, and other co-inhibitory signaling pathways in transplantation. *Transplant International* **21**, 1015–1028 (2008).
119. De Sousa Linares, A., Leitner, J., Grabmeier-Pfistershammer, K. & Steinberger, P. Not all immune checkpoints are created equal. *Front. Immunol.* **9**, 1909 (2018).

120. Zou, W. & Chen, L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 467–477 (2008).
121. Wang, J. *et al.* VSIG-3/IGSF11 is a ligand of VISTA/PD-1H and inhibits human T cell function. *J. Immunol.* **198**, 154.1 LP-154.1 (2017).
122. Huang, C. *et al.* Immune checkpoint molecules. Possible future therapeutic implications in autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* **104**, 102333 (2019).
123. Green, K. A., Wang, L., Noelle, R. J. & Green, W. R. Selective involvement of the checkpoint regulator VISTA in suppression of B-cell, but not T-cell, responsiveness by monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells from mice infected with an immunodeficiency-causing retrovirus. *J. Virol.* **89**, 9693–9698 (2015).
124. He, Y. *et al.* TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. *Oncol. Targets. Ther.* **11**, 7005–7009 (2018).
125. Varela Andrés, N. Construcción genética quimérica recombinante de la región extracelular del ligando PD-1 homólogo (VISTA) para la identificación de su receptor. (Universidad de León, 2017).
126. Torices Pajares, A. Clonaje y expresión de la proteína soluble quimérica recombinante murina VSIG8. (Universidad de León, 2019).
127. Gutiérrez Cózar, R. Estudios de expresión de una proteína recombinante soluble de la superfamilia de las inmunoglobulinas: TIGIT y su interacción con el receptor de membrana CD155. (Universidad de León, 2018).
128. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580 (1983).
129. Phelan, M. C. & Lawler, G. Cell counting. *Curr. Protoc. Cytom.* **Appendix 3**, Appendix 3A (2001).
130. Morita, S., Kojima, T. & Kitamura, T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther.* **7**, 1063–1066 (2000).
131. Aizpurua-Olaizola, O. *et al.* Affinity capillary electrophoresis for the assessment of binding affinity of carbohydrate-based cholera toxin inhibitors. *Electrophoresis* **39**, 344–347 (2018).
132. Kimple, M. E., Brill, A. L. & Pasker, R. L. Overview of affinity tags for protein purification. *Curr. Protoc. protein Sci.* **73**, 9.9.1-9.9.23 (2013).
133. Gerace, E. & Moazed, D. Affinity pull-down of proteins using anti-FLAG M2 agarose beads. *Methods Enzymol.* **559**, 99–110 (2015).
134. Marhelava, K., Pilch, Z., Bajor, M., Graczyk-Jarzynka, A. & Zagozdzon, R. Targeting

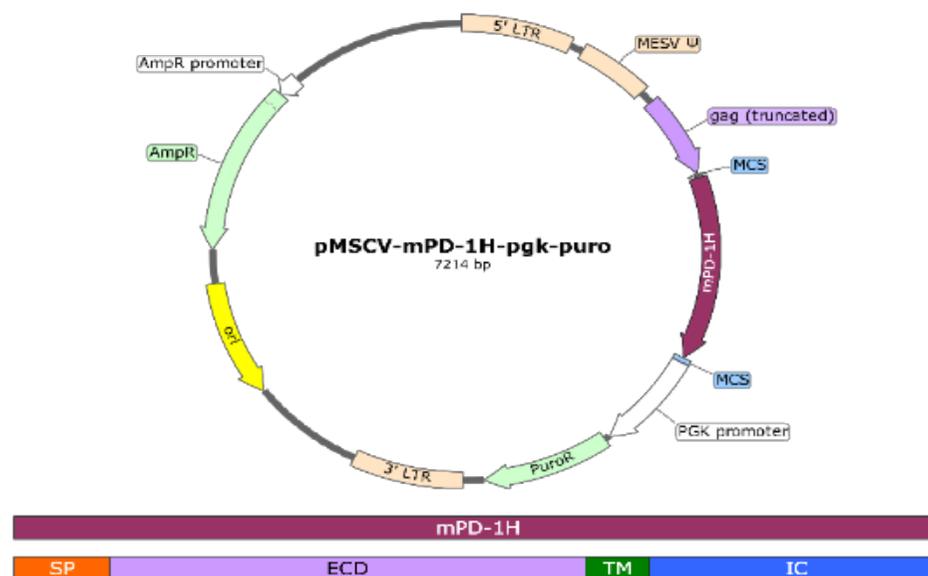
- negative and positive immune checkpoints with monoclonal antibodies in therapy of cancer. *Cancers (Basel)*. **11**, 1756 (2019).
135. Kondo, Y. *et al.* Differential contribution of three immune checkpoint (VISTA, CTLA-4, PD-1) pathways to antitumor responses against squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* **57**, 54–60 (2016).
 136. Rodriguez-Barbosa, J.-I., Azuma, M., Zelinskyy, G., Perez-Simon, J.-A. & del Rio, M.-L. Critical role of PD-L1 expression on non-tumor cells rather than on tumor cells for effective anti-PD-L1 immunotherapy in a transplantable mouse hematopoietic tumor model. *Cancer Immunol. Immunother.* **69**, 1001–1014 (2020).
 137. Wang, G. *et al.* The expression and immunoregulation of immune checkpoint molecule VISTA in autoimmune diseases and cancers. *Cytokine Growth Factor Rev.* **52**, 1–14 (2020).
 138. Horst, D. *et al.* Differential WNT activity in colorectal cancer confers limited tumorigenic potential and is regulated by MAPK signaling. *Cancer Res.* **72**, 1547–1556 (2012).
 139. Yang, W. *et al.* Construction of a versatile expression library for all human single-pass transmembrane proteins for receptor pairings by high throughput screening. *J. Biotechnol.* **260**, 18–30 (2017).
 140. Yoo, E. M., Wims, L. A., Chan, L. A. & Morrison, S. L. Human IgG2 can form covalent dimers. *J. Immunol.* **170**, 3134–3138 (2003).
 141. Unverdorben, F. *et al.* Pharmacokinetic properties of IgG and various Fc fusion proteins in mice. *MAbs* **8**, 120–128 (2016).
 142. Voulgaraki, D. *et al.* Multivalent recombinant proteins for probing functions of leucocyte surface proteins such as the CD200 receptor. *Immunology* **115**, 337–346 (2005).
 143. Efimov, V. P., Lustig, A. & Engel, J. The thrombospondin-like chains of cartilage oligomeric matrix protein are assembled by a five-stranded alpha-helical bundle between residues 20 and 83. *FEBS Lett.* **341**, 54–58 (1994).
 144. Prodeus, A. *et al.* VISTA.COMP — an engineered checkpoint receptor agonist that potently suppresses T cell-mediated immune responses. *JCI Insight* **2**, e94308 (2017).
 145. Suzu, S. *et al.* Molecular cloning of a novel immunoglobulin superfamily gene preferentially expressed by brain and testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 1215–1221 (2002).
 146. Pelz, L., Purfürst, B. & Rathjen, F. G. The cell adhesion molecule BT-IgSF is essential

- for a functional blood–testis barrier and male fertility in mice. *J. Biol. Chem.* **292**, 21490–21503 (2017).
147. Rice, R. H., Phillips, M. A. & Sundberg, J. P. Localization of hair shaft protein VSIG8 in the hair follicle, nail unit, and oral cavity. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 1936–1938 (2011).
148. Yang, J., Galipeau, J., Kozak, C. A., Furie, B. C. & Furie, B. Mouse P-selectin glycoprotein ligand-1: molecular cloning, chromosomal localization, and expression of a functional P-selectin receptor. *Blood* **87**, 4176–4186 (1996).
149. Bailey, M., Christoforidou, Z. & Lewis, M. C. The evolutionary basis for differences between the immune systems of man, mouse, pig and ruminants. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **152**, 13–19 (2013).
150. Mestas, J. & Hughes, C. C. W. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* **172**, 2731–2738 (2004).
151. Xu, J. L. & Davis, M. M. Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity* **13**, 37–45 (2000).
152. Zheng, K., Yarmarkovich, M., Bantog, C., Bayer, R. & Patapoff, T. W. Influence of glycosylation pattern on the molecular properties of monoclonal antibodies. *MAbs* **6**, 649–658 (2014).
153. Werner, R. G., Kopp, K. & Schlueter, M. Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. *Acta Paediatr.* **96**, 17–22 (2007).
154. Reily, C., Stewart, T. J., Renfrow, M. B. & Novak, J. Glycosylation in health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **15**, 346–366 (2019).
155. Kukuruzinska, M. A. & Lennon, K. Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **9**, 415–448 (1998).
156. Harada, H., Suzu, S., Hayashi, Y. & Okada, S. BT-IgSF, a novel immunoglobulin superfamily protein, functions as a cell adhesion molecule. *J. Cell. Physiol.* **204**, 919–926 (2005).
157. Seidel, J. A., Otsuka, A. & Kabashima, K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Front. Oncol.* **8**, 86 (2018).
158. Nowicki, T. S., Hu-Lieskovan, S. & Ribas, A. Mechanisms of resistance to PD-1 and PD-L1 blockade. *Cancer J.* **24**, 47–53 (2018).
159. Long, L. *et al.* Targeting immune checkpoints in lung cancer: Current landscape and future prospects. *Clin. Drug Investig.* **39**, 341–353 (2019).
160. Qin, S. *et al.* Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol. Cancer* **18**, 155 (2019).

ANEXOS

Anexo I. Confirmación y validación de secuencias

A



B



C

	1		80
Teórica	CCCTTGAACC	TCCTCGTTTCG	ACCCCGCCTC
Experimental			GATCCTCCCT
ConsensusGCC
	81		160
Teórica	TC AAGCTTGC	CAC CA TGGGT	GTCCCCGCGG
Experimental	TC AAGCTTGC	CAC CA TGGGT	GTCCCCGCGG
Consensus	TC AAGCTTGC	CAC CA TGGGT	GTCCCCGCGG
	161		240
Teórica	CTGGCTGCAT	CCAGAGGTCT	GGTAGCAGCC
Experimental	CTGGCTGCAT	CCAGAGGTCT	GGTAGCAGCC
Consensus	CTGGCTGCAT	CCAGAGGTCT	GGTAGCAGCC
	241		320
Teórica	TGCCACCCTC	ACCTGCAGGA	TTCTGGGCCC
Experimental	TGCCACCCTC	ACCTGCAGGA	TTCTGGGCCC
Consensus	TGCCACCCTC	ACCTGCAGGA	TTCTGGGCCC
	321		400
Teórica	CACGAGGCGA	GGTCCAGATG	TGCAAAGAAC
Experimental	CACGAGGCGA	GGTCCAGATG	TGCAAAGAAC
Consensus	CACGAGGCGA	GGTCCAGATG	TGCAAAGAAC
	401		480
Teórica	CACCTGAAAG	CCAACGCCAG	CCATGACCAG
Experimental	CACCTGAAAG	CCAACGCCAG	CCATGACCAG
Consensus	CACCTGAAAG	CCAACGCCAG	CCATGACCAG
	481		560
Teórica	TATCACCTG	CGCAATGTGA	CCCCAAGGGA
Experimental	TATCACCTG	CGCAATGTGA	CCCCNAGGGA
Consensus	TATCACCTG	CGCAATGTGA	CCCCaAGGGA
	561		640
Teórica	AACAACGGTT	CTACGGGTCC	ATGGAGCTAC
Experimental	AACAACGGTT	CTACGGGTCC	ATGGAGCTAC
Consensus	AACAACGGTT	CTACGGGTCC	ATGGAGCTAC

	161		240
Teórica	CAGACAGCAG TCCTGCCCTG CGCCTTCTCC ACCAGTGCTG CCCTCCTGAA CCTCAATGTC ATTTGGATGG TCATTCCCCT		
Experimental	CAGACAGCAG TCCTGCCCTG CGCCTTCTCC ACCAGTGCTG CCCTCCTGAA CCTCAATGTC ATTTGGATGG TCATTCCCCT		
Consensus	CAGACAGCAG TCCTGCCCTG CGCCTTCTCC ACCAGTGCTG CCCTCCTGAA CCTCAATGTC ATTTGGATGG TCATTCCCCT		
	241		320
Teórica	CTCCAATGCA AACCAGCCCG AACAGGTCAT TCTTTATCAG GGTGGACAAA TGTTTGACGG CGCCCTCCGG TTCCACGGGA		
Experimental	CTCCAATGCA AACCAGCCCG AACAGGTCAT TCTTTATCAG GGTGGACAAA TGTTTGACGG CGCCCTCCGG TTCCACGGGA		
Consensus	CTCCAATGCA AACCAGCCCG AACAGGTCAT TCTTTATCAG GGTGGACAAA TGTTTGACGG CGCCCTCCGG TTCCACGGGA		
	321		400
Teórica	GGGTAGGATT TACCGGCACC ATGCCTGCTA CCAATGTCTC GATCTTCATC AATAACACAC AGCTGTCAGA TACGGGCACG		
Experimental	GGGTAGGATT TACCGGCACC ATGCCTGCTA CCAATGTCTC GATCTTCATC AATAACACAC AGCTGTCAGA TACGGGCACG		
Consensus	GGGTAGGATT TACCGGCACC ATGCCTGCTA CCAATGTCTC GATCTTCATC AATAACACAC AGCTGTCAGA TACGGGCACG		
	401		480
Teórica	TACCAGTGCT TGGTGAATAA CCTTCCAGAC AGAGGGGGCA GAAACATCGG GGTCACTGGC CTCACAGTGT TAGTCCCCC		
Experimental	TACCAGTGCT TGGTGAATAA CCTTCCAGAC AGAGGGGGCA GAAACATCGG GGTCACTGGC CTCACAGTGT TAGTCCCCC		
Consensus	TACCAGTGCT TGGTGAATAA CCTTCCAGAC AGAGGGGGCA GAAACATCGG GGTCACTGGC CTCACAGTGT TAGTCCCCC		
	481		560
Teórica	TTCTGCTCCA CAATGCCAAA TCCAAGGATC CCAGGACCTC GGCAGTGACG TCATCCTTCT GTGTAGTTCA GAGGAAGGCA		
Experimental	TTCTGCTCCA CAATGCCAAA TCCAAGGATC CCAGGACCTC GGCAGTGACG TCATCCTTCT GTGTAGTTCA GAGGAAGGCA		
Consensus	TTCTGCTCCA CAATGCCAAA TCCAAGGATC CCAGGACCTC GGCAGTGACG TCATCCTTCT GTGTAGTTCA GAGGAAGGCA		
	561		640
Teórica	TCCCTCGGCC CACGTACCTT TGGGAGAAGT TAGATAATAC GCTCAAGCTA CCTCCAACAG CCACTCAGGA CCAGGTCCAG		
Experimental	TCCCTCGGCC CACGTACCTT TGGGAGAAGT TAGATAATAC GCTCAAGCTA CCTCCAACAG CCACTCAGGA CCAGGTCCAG		
Consensus	TCCCTCGGCC CACGTACCTT TGGGAGAAGT TAGATAATAC GCTCAAGCTA CCTCCAACAG CCACTCAGGA CCAGGTCCAG		
	641		720
Teórica	GGAACAGTCA CCATCCGGAA TATCAGTGCC CTCTCTTCCG GTCTGTACCA GTGTGTGGCT TCTAATGCCA TCGGGACCAG		
Experimental	GGAACAGTCA CCATCCGGAA TATCAGTGCC CTCTCTTCCG GTCTGTACCA GTGTGTGGCT TCTAATGCCA TCGGGACCAG		
Consensus	GGAACAGTCA CCATCCGGAA TATCAGTGCC CTCTCTTCCG GTCTGTACCA GTGTGTGGCT TCTAATGCCA TCGGGACCAG		
	721		800
Teórica	CACCTGTCTG CTGGACCTCC AGGTTATCTC ACCCCAGCCC CGGAGCGTTA GATCCGAGCC CAGAGGGCCC ACAATCAAGC		
Experimental	CACCTGTCTG CTGGACCTCC AGGTTATCTC ACCCCAGCCC CGGAGCGTTA GATCCGAGCC CAGAGGGCCC ACAATCAAGC		
Consensus	CACCTGTCTG CTGGACCTCC AGGTTATCTC ACCCCAGCCC CGGAGCGTTA GATCCGAGCC CAGAGGGCCC ACAATCAAGC		

	801	880
Teórica	CCTGTCCTCC ATGCAAATGC CCAGCACCTA ACCTCGAGGG TGGACCATCC GTCTTCATCT TCCCTCCAAA GATCAAGGAT	
Experimental	CCTGTCCTCC ATGCAAATGC CCAGCACCTA ACCTCGAGGG TGGACCATCC GTCTTCATCT TCC-TCCAAA GATCAAG-AT	
Consensus	CCTGTCCTCC ATGCAAATGC CCAGCACCTA ACCTCGAGGG TGGACCATCC GTCTTCATCT TCC.TCCAAA GATCAAG.AT	

Ig k chain leader sequence fragment – HindIII – ECD – inicio IgG2a

Figura II. Clonaje del gen codificante de la proteína soluble mVSIG3.Ig. A. En primer lugar, se digirieron los vectores pJET1.2-mVSIG3(ECD) y pIB49 con las enzimas *HindIII* y *BglII* y, a continuación, se ligaron los insertos de interés para la generación de la construcción final pSecTag2-mVSIG3(ECD).IgG2a.Fc-HygroB. **B.** Fragmento del alineamiento de la secuencia de bases teórica y experimental. El alineamiento se generó mediante la herramienta online MultAlin. Se resaltan en diferentes colores cada una de las regiones de interés de la secuencia clonada.

	321		400
Teórica	CGCTTTGCAG CCTCAGACCC CAGCCAGTAC GATGCCTCCA TCAACCTCAT GAACCTGCAG GTATCTGACA CAGCAACCTA		
Experimental	CGCTTTGCAG CCTCAGACCC CAGCCAGTAC GATGCCTCCA TCAACCTCAT GAACCTGCAG GTATCTGACA CAGCAACCTA		
Consensus	CGCTTTGCAG CCTCAGACCC CAGCCAGTAC GATGCCTCCA TCAACCTCAT GAACCTGCAG GTATCTGACA CAGCAACCTA		
	401		480
Teórica	TGAGTGCCGG GTGAAGAAGA CCACCATGGC CACCAGGAAG GTCATTGTCA CTGTCCAAGC ACGTCCTGCG GTGCCCATGT		
Experimental	TGAGTGCCGG GTGAAGAAGA CCACCATGGC CACCAGGAAG GTCATTGTCA CTGTCCAAGC ACGTCCTGCG GTGCCCATGT		
Consensus	TGAGTGCCGG GTGAAGAAGA CCACCATGGC CACCAGGAAG GTCATTGTCA CTGTCCAAGC ACGTCCTGCG GTGCCCATGT		
	481		560
Teórica	GTTGGACGGA AGGCCACATG TCAAAGGGCA ACGATGTGGT GCTGAAGTGC TTTGCCAACG GAGGCTCTCA GCCCCTCTCC		
Experimental	GTTGGACGGA AGGCCACATG TCAAAGGGCA ACGATGTGGT GCTGAAGTGC TTTGCCAACG GAGGCTCTCA GCCCCTCTCC		
Consensus	GTTGGACGGA AGGCCACATG TCAAAGGGCA ACGATGTGGT GCTGAAGTGC TTTGCCAACG GAGGCTCTCA GCCCCTCTCC		
	561		640
Teórica	TACAAGTGGG CCAAGATCAG TGGGCACAGT CACCCCTACC GAGCTGGGGC TTACCACTCA CAGCACAGCT TCCACTCTGA		
Experimental	TACAAGTGGG CCAAGATCAG TGGGCACAGT CACCCCTACC GAGCTGGGGC TTACCACTCA CAGCACAGCT TCCACTCTGA		
Consensus	TACAAGTGGG CCAAGATCAG TGGGCACAGT CACCCCTACC GAGCTGGGGC TTACCACTCA CAGCACAGCT TCCACTCTGA		
	641		720
Teórica	GCTTTCTTAC CAAGAGTCAT TCCACAGCAC CATCAACCAA GGCCTGGGCA ACGGAGACCT GCTGTTGAAG GGCATCAACG		
Experimental	GCTTTCTTAC CAAGAGTCAT TCCACAGCAC CATCAACCAA GGCCTGGGCA ACGGAGACCT GCTGTTGAAG G-CATCAACG		
Consensus	GCTTTCTTAC CAAGAGTCAT TCCACAGCAC CATCAACCAA GGCCTGGGCA ACGGAGACCT GCTGTTGAAG G.CATCAACG		
	721		800
Teórica	CAGACGACGA TGGGCTGTAT CAGTGCACAG TGGCCAACCA TGTGGGCTA- CAGCGT-CTG TG-TGGTAGA GGTGAAAGTC		
Experimental	CAGACGACGA TGGGCTGTAT CAGTGCACAG TGGCCAACCA TGTGGGCTAA CAGCGTTCTG TGGTGGTAGA GGTGAAAGTC		
Consensus	CAGACGACGA TGGGCTGTAT CAGTGCACAG TGGCCAACCA TGTGGGCTA. CAGCGT.CTG TG.TGGTAGA GGTGAAAGTC		
	801		880
Teórica	-TCAGACTCC CAGCGAGTAG GCAAGCTTGG ATCCGAGCC- ----- --CAGAGGG- -CCCACAA-T CAAGCCCTGT		
Experimental	CTCAGACTCC CAGCGAGTA GCA-GCTTGG TACCGAGCCT CGGATCCGGA GCCAGAAGGG CCCACAAAT CAAGCCTTGT		
Consensus	.TCAGACTCC CAGCGaagaa GCA.GCTTGG aaCCGAGCC.CAGaAGG. .CCCACAA.T CAAGCCcTGT		

	321		400
Teórica	CCCAGGTACA GGAGGGACAG CTGTTGGGAT GCTGAGCACA GACTCTGCCA CACAGTGGAG TCTAACCTCA GTAGAGACCG		
Experimental	CCCAGGTACA GGAGGGACAG CTGTTGGGAT GCTGAGCACA GACTCTGCCA CACAGTGGAG TCTAACCTCA GTAGAGACCG		
Consensus	CCCAGGTACA GGAGGGACAG CTGTTGGGAT GCTGAGCACA GACTCTGCCA CACAGTGGAG TCTAACCTCA GTAGAGACCG		
	401		480
Teórica	TCCAACCAGC ATCCACAGAG GTAGAGACCT CGCAGCCAGC ACCCATGGAG GCAGAGACCT CGCAGCCAGC ACCCATGGAG		
Experimental	TCCAACCAGC ATCCACAGAG GTAGAAACCT CGCAGCCAAC ACCCATGGAG GCAGACACCT CAAAGCCAGC ACCCATGGAG		
Consensus	TCCAACCAGC ATCCACAGAG GTAGAAaACCT CGCAGCCAaC ACCCATGGAG GCAGAcACCT CaaAGCCAGC ACCCATGGAG		
	481		560
Teórica	GCAGAGACCT CGCAGCCAGC ACCCATGGAG GCAGAGACCT CGCAGCCAGC ACCCATGGAG GCAGACACCT CGCAGCCAGC		
Experimental	GCAGAGACCT CGCAGCCAGC ACCCATGGAG GCAGAGACCT CGCAGCCAGC ACCCATGGAG GCAGAGACCT CGCAGCCAGC		
Consensus	GCAGAGACCT CGCAGCCAGC ACCCATGGAG GCAGAGACCT CGCAGCCAGC ACCCATGGAG GCAGAcACCT CGCAGCCAGC		
	561		640
Teórica	ACCCATGGAG GCAGAGACCT CTCAGCCAGC ACCCAACGAG GCAGAGACCT CAAAACCAGC ACCCACGGAG GCAGAGACCT		
Experimental	ACCCATGGAG GCAGAGACCT CTCAGCCAGC ACCCAACGAG GCAGAGACCT CAAAACCAGC ACCCACGGAG GCAGAGACCT		
Consensus	ACCCATGGAG GCAGAGACCT CTCAGCCAGC ACCCAACGAG GCAGAGACCT CAAAACCAGC ACCCACGGAG GCAGAGACCT		
	641		720
Teórica	CAAAAACCAGC ACCCACGGAG GCAGAGACCA CCCAGCTTCC CAGGATTCAG GCTGTAAAAA CTCTGTTTAC AACGTCTGCA		
Experimental	CAAAAACCAGC ACCCACGGAG GCAGAGACCA CCCAGCTTCC CAGGATTCAG -CTGTAAAAA CTCTGTTTAC A-CGTCTGCA		
Consensus	CAAAAACCAGC ACCCACGGAG GCAGAGACCA CCCAGCTTCC CAGGATTCAG .CTGTAAAAA CTCTGTTTAC A.CGTCTGCA		
	721		800
Teórica	GCCACCGAAG TCCCTTCCAC AGAACCTACC ACCATGGAGA CGGCGTCCAC AGAGTCTAAC GAGTCTACCA TCTTCCTTGG		
Experimental	GCCACCGA-G TCCCTTCCAC AGAACCTACA --CATGGAGA CGGCGTC-AC AGAGTCTAAC GAGTCTACA- ---TCTCTGG		
Consensus	GCCACCGA.G TCCCTTCCAC AGAACCTACa .CATGGAGA CGGCGTC.AC AGAGTCTAAC GAGTCTACa. ...TCccTGG		
	801		880
Teórica	GCCATCCGTG ACTCACTTAC CTGACAGCGG CCTGAAGAAA GGGCTGATTG TGACCCCTGG GAATTCACCT GCCCAACCC		
Experimental	GCAT--CGTG ACTCCACTAC -TGACAGCG- -CTGAAGAAA GG-CTGATTG TGACCC-TGG GAGT-CAC-T GCCCA---CC		
Consensus	GCaa..CGTG ACTCaacTAC .TGACAGCG. .CTGAAGAAA GG.CTGATTG TGACCC.TGG GAaT.CAC.T GCCCa...CC		
	881		960
Teórica	TGCCAGGGAG TTCAGATCTC ATCCCGGTGA AGCAATGTAA GCTTGGATCC GAGCCAGAG GGCCACAAAT CAAGCCCTGT		
Experimental	TGCA--GGAG TCCGATTCTC ATCC-GGTGG AGCA-TGTAA GCCTGGTACG GATC---TG GAATCCAGAT CA-GACCAAT		
Consensus	TGCa..GGAG TcCaaTCTC ATCC.GGTGa AGCA.TGTAA GCcTGGaaCc GAgC...aG GaacCaaAT CA.GaCCaAT		

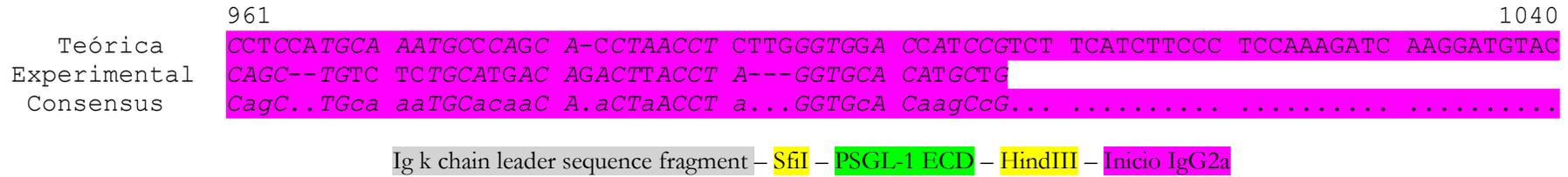
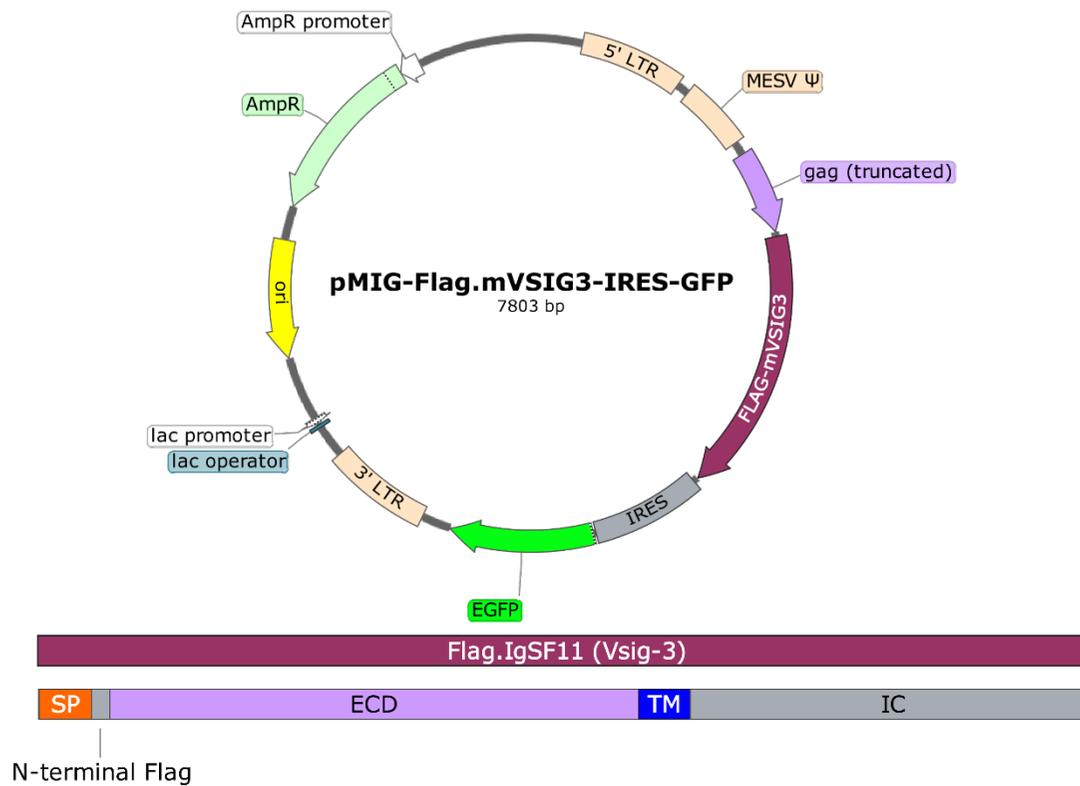
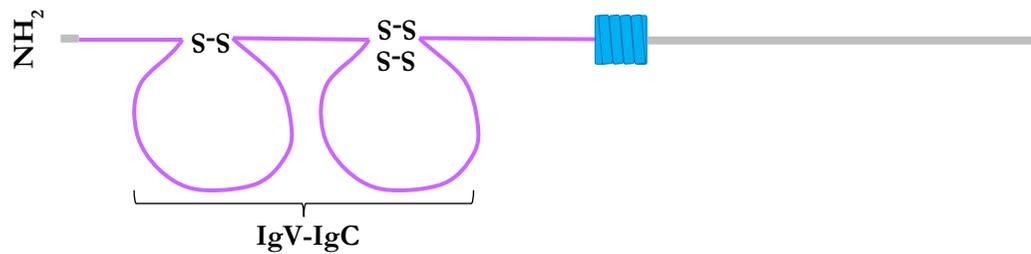


Figura IV. Clonaje del gen codificante de la proteína soluble mPSGL-1.Ig. A. La construcción genética recombinante pSecTag2-mPSGL-1(ECD).mIgG2a-HygroB, se obtuvo tras la ligación de los insertos de interés purificados, tras la digestión de los vectores pJET1.2-PSGL-1 y pIB49 con las enzimas *SfiI* y *HindIII*. **B.** Fragmento del alineamiento de la secuencia de bases teórica y experimental. El alineamiento se generó mediante la herramienta online MultAlin. Se resaltan en diferentes colores cada una de las regiones de interés de la secuencia clonada.

A



B



C

	1	80
Teorica	CCATGACTC GGCGGCGCTC CGCTCCGGCG TCCTGGCTGC TCGTGTGCT GCTCGGTGTC GCAACATCCG ATTACAAAGA	
Experiment	GCCATGACTC GGCGGCGCTC CGCTCCGGCG TCCTGGCTGC TCGTGTGCT GCTCGGTGTC GCAACATCCG ATTACAAAGA	
Consensus	.CCATGACTC GGCGGCGCTC CGCTCCGGCG TCCTGGCTGC TCGTGTGCT GCTCGGTGTC GCAACATCCG ATTACAAAGA	
	81	160
Teorica	CGATGACGAT AAACTGGAAG TGTCCGAGAG CCCAGGCAGT GTCCAGGTGG CCCGGGGCCA GACAGCAGTC CTGCCCTGCG	
Experiment	CGATGACGAT AAACTGGAAG TGTCCGAGAG CCCAGGCAGT GTCCAGGTGG CCCGGGGCCA GACAGCAGTC CTGCCCTGCG	
Consensus	CGATGACGAT AAACTGGAAG TGTCCGAGAG CCCAGGCAGT GTCCAGGTGG CCCGGGGCCA GACAGCAGTC CTGCCCTGCG	
	161	240
Teorica	CCTTCTCCAC CAGTGCTGCC CTCCTGAACC TCAATGTCAT TTGGATGGTC ATTCCCCTCT CCAATGCAA CCAGCCCAGAA	
Experiment	CCTTCTCCAC CAGTGCTGCC CTCCTGAACC TCAATGTCAT TTGGATGGTC ATTCCCCTCT CCAATGCAA CCAGCCCAGAA	
Consensus	CCTTCTCCAC CAGTGCTGCC CTCCTGAACC TCAATGTCAT TTGGATGGTC ATTCCCCTCT CCAATGCAA CCAGCCCAGAA	
	241	320
Teorica	CAGGTCATTC TTTATCAGGG TGGACAAATG TTTGACGGCG CCCTCCGGTT CCACGGGAGG GTAGGATTTA CCGGCACCAT	
Experiment	CAGGTCATTC TTTATCAGGG TGGACAAATG TTTGACGGCG CCCTCCGGTT CCACGGGAGG GTAGGATTTA CCGGCACCAT	
Consensus	CAGGTCATTC TTTATCAGGG TGGACAAATG TTTGACGGCG CCCTCCGGTT CCACGGGAGG GTAGGATTTA CCGGCACCAT	
	321	400
Teorica	GCCTGCTACC AATGTCTCGA TCTTCATCAA TAACACACAG CTGTCAGATA CGGGCACGTA CCAGTGCTTG GTGAATAACC	
Experiment	GCCTGCTACC AATGTCTCGA TCTTCATCAA TAACACACAG CTGTCAGATA CGGGCACGTA CCAGTGCTTG GTGAATAACC	
Consensus	GCCTGCTACC AATGTCTCGA TCTTCATCAA TAACACACAG CTGTCAGATA CGGGCACGTA CCAGTGCTTG GTGAATAACC	
	401	480
Teorica	TTCCAGACAG AGGGGGCAGA AACATCGGGG TCACTGGCCT CACAGTGTTA GTCCCCCTT CTGCTCCACA ATGCCAAATC	
Experiment	TTCCAGACAG AGGGGGCAGA AACATCGGGG TCACTGGCCT CACAGTGTTA GTCCCCCTT CTGCTCCACA ATGCCAAATC	
Consensus	TTCCAGACAG AGGGGGCAGA AACATCGGGG TCACTGGCCT CACAGTGTTA GTCCCCCTT CTGCTCCACA ATGCCAAATC	
	481	560
Teorica	CAAGGATCCC AGGACCTCGG CAGTGACGTC ATCCTTCTGT GTAGTTCAGA GGAAGGCATC CCTCGGCCCA CGTACCTTTG	
Experiment	CAAGGATCCC AGGACCTCGG CAGTGACGTC ATCCTTCTGT GTAGTTCAGA GGAAGGCATC CCTCGGCCCA CGTACCTTTG	
Consensus	CAAGGATCCC AGGACCTCGG CAGTGACGTC ATCCTTCTGT GTAGTTCAGA GGAAGGCATC CCTCGGCCCA CGTACCTTTG	
	561	640
Teorica	GGAGAAGTTA GATAATACGC TCAAGCTACC TCCAACAGCC ACTCAGGACC AGGTCCAGGG AACAGTCACC ATCCGGAATA	
Experiment	GGAGAAGTTA GATAATACGC TCAAGCTACC TCCAACAGCC ACTCAGGACC AGGTCCAGGG AACAGTCACC ATCCGGAATA	
Consensus	GGAGAAGTTA GATAATACGC TCAAGCTACC TCCAACAGCC ACTCAGGACC AGGTCCAGGG AACAGTCACC ATCCGGAATA	

	641		720
Teorica	TCAGTGCCCT CTCTCCGGT CTGTACCAGT GTGTGGCTTC TAATGCCATC GGGACCAGCA CCTGTCTGCT GGACCTCCAG		
Experiment	TCAGTGCCCT CTCTCCGGT CTGTACCAGT GTGTGGCTTC TAATGCCATC GGGACCAGCA CCTGTCTGCT GGACCTCCAG		
Consensus	TCAGTGCCCT CTCTCCGGT CTGTACCAGT GTGTGGCTTC TAATGCCATC GGGACCAGCA CCTGTCTGCT GGACCTCCAG		
	721		800
Teorica	GTTATCTCAC CCCAGCCCCG GAGCGTTGGA GTAATAGCCG GAGCGGTTGG CACCGGTGCT GTTCTTATCG TCATCTGCCT		
Experiment	GTTATCTCAC CCCAGCCCCG GAGCGTTGGA GTAATAGCCG GAGCGGTTGG CACCGGTGCT GTTCTTATCG TCATCTGCCT		
Consensus	GTTATCTCAC CCCAGCCCCG GAGCGTTGGA GTAATAGCCG GAGCGGTTGG CACCGGTGCT GTTCTTATCG TCATCTGCCT		
	801		880
Teorica	TGCACTAATT TCAGGGGCGT TCTTTTACTG GAGAAGCAA AACAAAGAGG AGGAGGAGGA AGAAATTCTT AATGAAATCA		
Experiment	TGCACTAATT TCAGGGGCGT TCTTTTACTG GAGAAGCAA AACAAAGAGG AGGAGGAGGA AGAAATTCTT AATGAAATCA		
Consensus	TGCACTAATT TCAGGGGCGT TCTTTTACTG GAGAAGCAA AACAAAGAGG AGGAGGAGGA AGAAATTCTT AATGAAATCA		
	881		960
Teorica	GAGAGGATGA TCTTCCCCCT AAATGCTCTT CTGCCAAAGC CTTCCACACG GAGATATCCT CCTCAGAAAA TAACACGCTG		
Experiment	GAGAGGATGA TCTTCCCCCT AAATGCTCTT CTGCCAAAGC CTTCCACACG GAGATATCCT CCTCAGAAAA TAACACGCTG		
Consensus	GAGAGGATGA TCTTCCCCCT AAATGCTCTT CTGCCAAAGC CTTCCACACG GAGATATCCT CCTCAGAAAA TAACACGCTG		

Final Kozak - SP - ECD - TM - inicio IC

Figura V. Clonaje de la secuencia codificante de la proteína de membrana mVSIG3. **A.** Primero se digirieron los vectores pJET1.2-Flag.VSIG3 y pMIG-IRES-GFP con las enzimas *XhoI* y *EcoRI* y, a continuación, se ligaron los insertos de interés para la generación de la construcción final pMIG-Flag.mVSIG-IRES-GFP. **B.** Esquema de la proteína en el que se indica en gris, el tag Flag (DYKDDDK); en lila, la región extracelular donde se encuentran los dominios IgV e IgC; en azul, la región transmembrana y en gris, la región intracitoplasmática. **C.** Fragmento del alineamiento de la secuencia de bases teórica y experimental de pMIG-mVSIG3-IRES-GFP. El alineamiento se generó mediante la herramienta online MultAlin. Se resaltan en diferentes colores cada una de las regiones de interés de la secuencia clonada.

	241		320
Teórica	TGGTACCTCA GTCACGAGG CGAGGTCCAG ATGTGCAAAG AACACCGGCC CACACGCAAC TTCACATTGC AGCACCTTCA		
Experimental	TGGTACCTCA GTCACGAGG CGAGGTCCAG ATGTGCAAAG AACACCGGCC CACACGCAAC TTCACATTGC AGCACCTTCA		
Consensus	TGGTACCTCA GTCACGAGG CGAGGTCCAG ATGTGCAAAG AACACCGGCC CACACGCAAC TTCACATTGC AGCACCTTCA		
	321		400
Teórica	GCACCACGGA AGCCACCTGA AAGCCAACGC CAGCCATGAC CAGCCCCAGA AGCATGGGCT AGAGCTAGCT TCTGACCACC		
Experimental	GCACCACGGA AGCCACCTGA AAGCCAACGC CAGCCATGAC CAGCCCCAGA AGCATGGGCT AGAGCTAGCT TCTGACCACC		
Consensus	GCACCACGGA AGCCACCTGA AAGCCAACGC CAGCCATGAC CAGCCCCAGA AGCATGGGCT AGAGCTAGCT TCTGACCACC		
	401		480
Teórica	ACGGTAACTT CTCTATCACC CTGCGCAATG TGACCCCAAG GGACAGCGGC CTCTACTGCT GTCTAGTGAT AGAATTAATA		
Experimental	ACGGTAACTT CTCTATCACC CTGCGCAATG TGACCCCAAG GGACAGCGGC CTCTACTGCT GTCTAGTGAT AGAATTAATA		
Consensus	ACGGTAACTT CTCTATCACC CTGCGCAATG TGACCCCAAG GGACAGCGGC CTCTACTGCT GTCTAGTGAT AGAATTAATA		
	481		560
Teórica	AACCACCACC CAGAACAACG GTTCTACGGG TCCATGGAGC TACAGGTACA GGCAGGCAAA GGCTCGGGGT CCACATGCAT		
Experimental	AACCACCACC CAGAACAACG GTTCTACGGG TCCATGGAGC TACAGGTACA GGCAGGCAAA GGCTCGGGGT CCACATGCAT		
Consensus	AACCACCACC CAGAACAACG GTTCTACGGG TCCATGGAGC TACAGGTACA GGCAGGCAAA GGCTCGGGGT CCACATGCAT		
	561		640
Teórica	GGCGTCTAAT GAGCAGGACA GTGACAGCAT CACGGCTGGA TCCGAGCCCA GAGGGCCCAC AATCAAGCCC TGTCCTCCAT		
Experimental	GGCGTCTAAT GAGCAGGACA GTGACAGCAT CACGGCTGGA TCCGAGCCCA GAGGGCCCAC AATCAAGCCC TGTCCTCCAT		
Consensus	GGCGTCTAAT GAGCAGGACA GTGACAGCAT CACGGCTGGA TCCGAGCCCA GAGGGCCCAC AATCAAGCCC TGTCCTCCAT		
	641		720
Teórica	GCAAATGCCC AGCACCTAAC CTCGAGGGTG GACCATCCGT CTTTCATCTTC CCTCCAAAGA TCAAGGATGT ACTCATGATC		
Experimental	GCAAATGCCC AGCACCTAAC CTCGAGGGTG GACCATCCGT CTTTCATCTTC CCTCCAAAGA TCAAGGATGT ACTCATGATC		
Consensus	GCAAATGCCC AGCACCTAAC CTCGAGGGTG GACCATCCGT CTTTCATCTTC CCTCCAAAGA TCAAGGATGT ACTCATGATC		

Ig k chain leader sequence fragment – HindIII – ECD – BamHI – inicio IgG2a

Figura VI. Clonaje del gen codificante para la proteína soluble PD-1H.Ig. A. La obtención de la construcción quimérica final pSecTag2-mPD-1H(ECD).mIgG2a-HygroB se consiguió tras la ligación de los insertos de interés purificados tras la digestión de los vectores pJET1.2-mPD-1H(ECD-3) y pIB49 con las enzimas *HindIII* y *BamHI*. **B.** Fragmento del alineamiento de la secuencia de bases teórica y experimental de pSecTag2-mPD-1H (ECD).IgG2a.Fc-HygroB. El alineamiento se generó mediante la herramienta online MultAlin. Se resaltan en diferentes colores cada una de las regiones de interés de la secuencia clonada.

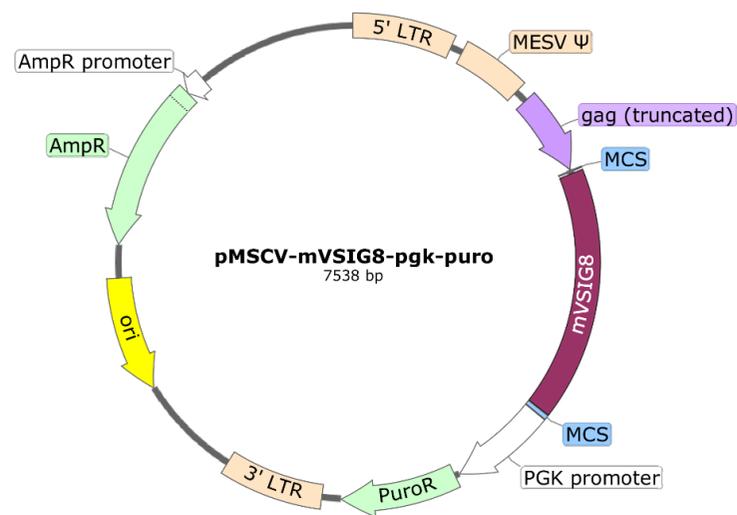
	161		240
Teórica	CCTTCAAGGT CACCACTCCA TATTCTCTCT ATGTGTGTCC CGAGGGACAG AATGCCACCC TCACCTGCAG GATTCTGGGC		
Experimental	CCTTCAAGGT CACCACTCCA TATTCTCTCT ATGTGTGTCC CGAGGGACAG AATGCCACCC TCACCTGCAG GATTCTGGGC		
Consensus	CCTTCAAGGT CACCACTCCA TATTCTCTCT ATGTGTGTCC CGAGGGACAG AATGCCACCC TCACCTGCAG GATTCTGGGC		
	241		320
Teórica	CCCGTGTCCA AAGGGCACGA TGTGACCATC TACAAGACGT GGTACCTCAG CTCACGAGGC GAGGTCCAGA TGTGCAAAGA		
Experimental	CCCGTGTCCA AAGGGCACGA TGTGACCATC TACAAGACGT GGTACCTCAG CTCACGAGGC GAGGTCCAGA TGTGCAAAGA		
Consensus	CCCGTGTCCA AAGGGCACGA TGTGACCATC TACAAGACGT GGTACCTCAG CTCACGAGGC GAGGTCCAGA TGTGCAAAGA		
	321		400
Teórica	ACACCGGCC ATACGCAACT TCACATTGCA GCACCTTCAG CACCACGGAA GCCACCTGAA AGCCAACGCC AGCCATGACC		
Experimental	ACACCGGCC ATACGCAACT TCACATTGCA GCACCTTCAG CACCACGGAA GCCACCTGAA AGCCAACGCC AGCCATGACC		
Consensus	ACACCGGCC ATACGCAACT TCACATTGCA GCACCTTCAG CACCACGGAA GCCACCTGAA AGCCAACGCC AGCCATGACC		
	401		480
Teórica	AGCCCCAGAA GCATGGGCTA GAGCTAGCTT CTGACCACCA CGGTAACTTC TCTATCACCC TGCGCAATGT GACCCCAAGG		
Experimental	AGCCCCAGAA GCATGGGCTA GAGCTAGCTT CTGACCACCA CGGTAACTTC TCTATCACCC TGCGCAATGT GACCCCAAGG		
Consensus	AGCCCCAGAA GCATGGGCTA GAGCTAGCTT CTGACCACCA CGGTAACTTC TCTATCACCC TGCGCAATGT GACCCCAAGG		
	481		560
Teórica	GACAGCGGCC TCTACTGCTG TCTAGTGATA GAATTAAAA ACCACCACCC AGAACAACGG TTCTACGGGT CCATGGAGCT		
Experimental	GACAGCGGCC TCTACTGCTG TCTAGTGATA GAATTAAAA ACCACCACCC AGAACAACGG TTCTACGGGT CCATGGAGCT		
Consensus	GACAGCGGCC TCTACTGCTG TCTAGTGATA GAATTAAAA ACCACCACCC AGAACAACGG TTCTACGGGT CCATGGAGCT		
	561		640
Teórica	ACAGGTACAG GCAGGCAAAG GCTCGGGGTC CACATGCATG GCGTCTAATG AGCAGGACAG TGACAGCATC ACGGCTGCGG		
Experimental	ACAGGTACAG GCAGGCAAAG GCTCGGGGTC CACATGCATG GCGTCTAATG AGCAGGACAG TGACAGCATC ACGGCTGCGG		
Consensus	ACAGGTACAG GCAGGCAAAG GCTCGGGGTC CACATGCATG GCGTCTAATG AGCAGGACAG TGACAGCATC ACGGCTGCGG		
	641		720
Teórica	CCCTGGCCGG ATCCGACCTG GCCCCACAGA TGCTGCGAGA ACTTCAGGAG ACTAATGCGG CGCTGCAAGA CGTGAGAGAG		
Experimental	CCCTGGCCGG ATCCGACCTG GCCCCACAGA TGCTGCGAGA ACTTCAGGAG ACTAATGCGG CGCTGCAAGA CGTGAGAGAG		
Consensus	CCCTGGCCGG ATCCGACCTG GCCCCACAGA TGCTGCGAGA ACTTCAGGAG ACTAATGCGG CGCTGCAAGA CGTGAGAGAG		
	721		800
Teórica	CTGTTGCGAC AGCAGGTCAA GGAGATCACC TTCCTGAAGA ATACGGTGAT GGAATGTGAT GCTTGCGG-A GCGG-CCGCT		
Experimental	CTGTTGCGAC AGCAGGTCAA GGAGATCACC TTCCTGAAGA ATACGGTGAT GGAATGTGAT GCTTGCGGGA GCGGGCCGCT		
Consensus	CTGTTGCGAC AGCAGGTCAA GGAGATCACC TTCCTGAAGA ATACGGTGAT GGAATGTGAT GCTTGCGG.A GCGG.CCGCT		

	801		880
Teórica	CG-AGGAGGG	--CCCGAACA AAAACTCATC	--TCAGAAGA GGATCTGAAT AGCGCCGTCG ACCATCATCA TCATCATCAT
Experimental	CGGAGGAGGG	GCCCCGGAAC AAAAAACCTC	AATCTCAGAG AGATCTGA-T AGCGC-GTCG AC-ATCATCA TCATCATCAT
Consensus	CG.AGGAGGG	..CCCgAaa AAAAaaCaTC	..TCacAaaa aGATCTGA.T AGCGC.GTCG AC.ATCATCA TCATCATCAT
	881		960
Teórica	TGAGTTTAAA	CCCGCTGATC	
Experimental	-GAGTT-AAA	CCCGCTGATC	AGCTCGACTG TGCTTCTAGT GCAGCATCTG TTGTTGCCCC TCCCCGTGCT CTGACCTGAG
Consensus	.GAGTT.AAA	CCCGCTGATC

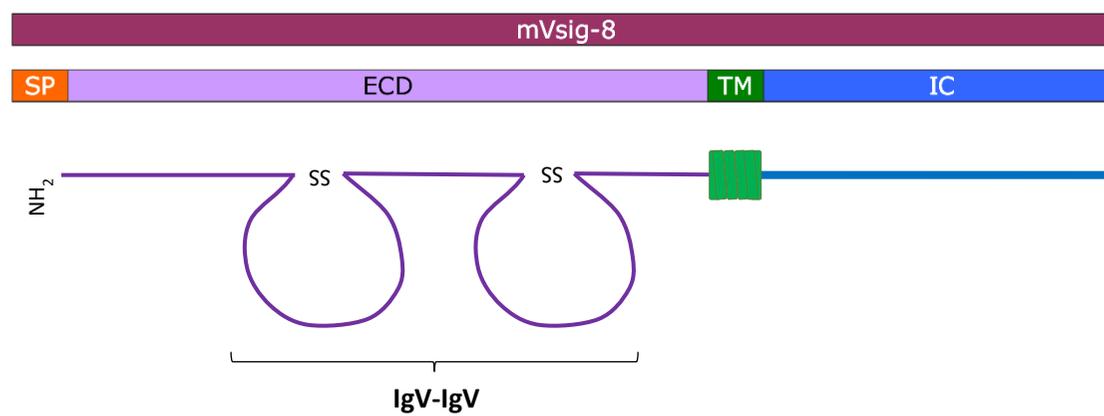
Ig k chain leader sequence fragment – HindIII – SP fragment – ECD – TM fragment – BamHI – COMP – NotI – c-Myc – 6xHis

Figura VII. Clonaje del gen codificante de la proteína soluble mPD-1H.COMP. **A.** La obtención de la construcción química final pSecTag2-mPD-1H(ECD).COMP-HygroB se consiguió tras la ligación de los insertos de interés purificados tras la digestión de los vectores pJET1.2-mPD-1H(3 bp SP-ECD-3 bp TM) y pIB360 con las enzimas *HindIII* y *BamHI*. **B.** Fragmento del alineamiento de la secuencia de bases teórica y experimental de pSecTag2-mPD-1H(ECD).COMP -HygroB. El alineamiento se generó mediante la herramienta online MultAlin. Se resaltan en diferentes colores cada una de las regiones de interés de la secuencia clonada.

A



B



C

	1		80
Teórica	CGATCCTCCC TTTATCCAGC CCTCACTCCT TCTCTAGGCG CCGGAATTAG ATCAAGCTTG CCACCATGGG AGTTCGAGGA		
Experimental		CCT TCTCTAGGCG CCGGAATTAG ATCAAGCTTG CCACCATGGG AGTTCGAGGA	
Consensus CCT TCTCTAGGCG CCGGAATTAG ATCAAGCTTG CCACCATGGG AGTTCGAGGA		
	81		160
Teórica	GCACTCCATC TTCTACTTGT GTGCCTGAGC CCAGCACTGT TGTCTGCTGT AAGGATCAAC GGGGATGGCC AGGAGGTCAT		
Experimental	GCACTCCATC TTCTACTTGT GTGCCTGAGC CCAGCACTGT TGTCTGCTGT AAGGATCAAC GGGGATGGCC AGGAGGTCAT		
Consensus	GCACTCCATC TTCTACTTGT GTGCCTGAGC CCAGCACTGT TGTCTGCTGT AAGGATCAAC GGGGATGGCC AGGAGGTCAT		
	161		240
Teórica	GTACCTGGCA GAAGGTGACA ATGTGAGGCT AGGCTGTCCC TACCTCCTGG ATCCTGAGGA TTTGGGTACC AACAGTCTGG		
Experimental	GTACCTGGCA GAAGGTGACA ATGTGAGGCT AGGCTGTCCC TACCTCCTGG ATCCTGAGGA TTTGGGTACC AACAGTCTGG		
Consensus	GTACCTGGCA GAAGGTGACA ATGTGAGGCT AGGCTGTCCC TACCTCCTGG ATCCTGAGGA TTTGGGTACC AACAGTCTGG		
	241		320
Teórica	ACATTGAGTG GATGCAAGTC AACTCAGAGC CCTCACACAG GGAGAATGTT TTTCTTACTT ATCAAGACAA GAGGATAGGT		
Experimental	ACATTGAGTG GATGCAAGTC AACTCAGAGC CCTCACACAG GGAGAATGTT TTTCTTACTT ATCAAGACAA GAGGATAGGT		
Consensus	ACATTGAGTG GATGCAAGTC AACTCAGAGC CCTCACACAG GGAGAATGTT TTTCTTACTT ATCAAGACAA GAGGATAGGT		
	321		400
Teórica	CATGGCAACC TCCCCATCT GCAGCAGAGG GTCCGCTTTG CAGCCTCAGA CCCAGCCAG TACGATGCCT CCATCAACCT		
Experimental	CATGGCAACC TCCCCATCT GCAGCAGAGG GTCCGCTTTG CAGCCTCAGA CCCAGCCAG TACGATGCCT CCATCAACCT		
Consensus	CATGGCAACC TCCCCATCT GCAGCAGAGG GTCCGCTTTG CAGCCTCAGA CCCAGCCAG TACGATGCCT CCATCAACCT		
	401		480
Teórica	CATGAACCTG CAGGTATCTG ACACAGCAAC CTATGAGTGC CGGGTGAAGA AGACCACCAT GGCCACCAGG AAGGTCATTG		
Experimental	CATGAACCTG CAGGTATCTG ACACAGCAAC CTATGAGTGC CGGGTGAAGA AGACCACCAT GGCCACCAGG AAGGTCATTG		
Consensus	CATGAACCTG CAGGTATCTG ACACAGCAAC CTATGAGTGC CGGGTGAAGA AGACCACCAT GGCCACCAGG AAGGTCATTG		
	481		560
Teórica	TCACTGTCCA AGCACGTCCT GCGGTGCCCA TGTGTTGGAC GGAAGGCCAC ATGTCAAAGG GCAACGATGT GGTGCTGAAG		
Experimental	TCACTGTCCA AGCACGTCCT GCGGTGCCCA TGTGTTGGAC GGAAGGCCAC ATGTCAAAGG GCAACGATGT GGTGCTGAAG		
Consensus	TCACTGTCCA AGCACGTCCT GCGGTGCCCA TGTGTTGGAC GGAAGGCCAC ATGTCAAAGG GCAACGATGT GGTGCTGAAG		
	561		640
Teórica	TGCTTTGCCA ACGGAGGCTC TCAGCCCCTC TCCTACAAGT GGGCCAAGAT CAGTGGGCAC AGTCACCCCT ACCGAGCTGG		
Experimental	TGCTTTGCCA ACGGAGGCTC TCAGCCCCTC TCCTACAAGT GGGCCAAGAT CAGTGGGCAC AGTCACCCCT ACCGAGCTGG		
Consensus	TGCTTTGCCA ACGGAGGCTC TCAGCCCCTC TCCTACAAGT GGGCCAAGAT CAGTGGGCAC AGTCACCCCT ACCGAGCTGG		

Anexo II. Rendimiento de la producción de proteínas solubles en células HEK293T

A partir de la concentración de proteína obtenida tras la purificación, se calculó el rendimiento del proceso teniendo en cuenta el volumen de sobrenadante recogido tras la transfección de las HEK293T con las diferentes construcciones genéticas (**Tabla 31**).

Tabla 32. Rendimiento de producción de proteínas recombinantes solubles.

Proteína	Medio de cultivo	Volumen final (ml)	Rendimiento relativo (µg/ml)	Método de purificación
Flag.mPD-1H-AviTag	RPMI 1640 + 10% FBS	250	2,0	αFlag M2
Flag.mPD-1H-AviTag-bio	RPMI 1640 + 10% FBS + 50 µM d-biotina	220	3,4	αFlag M2
mPD-1H.Ig	Opti-MEM	267	6,3	Proteína G
mVSIG3.Ig	Opti-MEM	500	8,4	Proteína G
mPD-1H.COMP	RPMI 1640 + 10% FBS	40	11,5	Ni-6xHis
VSIG8.Ig T1	RPMI 1640 + 10% FBS	120	68,3	Proteína G
VSIG8.Ig T2	RPMI 1640 + 10% FBS	150	4,2	Proteína G
COMP	RPMI 1640 + 10% FBS	20	3	Ni-6xHis

