



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

CONSTRUCCIÓN GENÉTICA QUIMÉRICA

RECOMBINANTE DE LA REGIÓN

EXTRACELULAR DEL LIGANDO PD-1

HOMÓLOGO (VISTA) PARA LA

IDENTIFICACIÓN DE SU RECEPTOR

RECOMBINANT CHIMERIC GENE CONSTRUCT

OF THE EXTRACELLULAR REGION OF PD-1

HOMOLOGUE LIGAND (VISTA) FOR

IDENTIFICATION OF ITS RECEPTOR

Natalia Varela Andrés

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Julio, 2017

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Sistema inmune	1
1.2. Linfocitos T y coseñalización	1
1.3. Moléculas coseñalizadoras: familia B7	3
1.4. Ligando VISTA, características generales	5
1.5. Relevancia de VISTA como coinhibidor de la respuesta inmune .	7
2. Hipótesis de trabajo y objetivos	9
2.1. Hipótesis de trabajo	9
2.2. Objetivos	9
3. Materiales y métodos	10
3.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	10
3.2. Biología molecular.....	11
3.3. Cultivo de células eucariotas.....	18
3.4. Transfección celular.....	20
3.5. Método de detección directa e inmunoensayo tipo ELISA	21
4. Resultados	22
4.1 Clonaje y expresión de las proteínas de fusión recombinantes FLAG-mVISTA-AviTag y F7'-mVISTA-AviTag en el vector de expresión de mamíferos pSecTag2/Hygro B.....	22
4.2. Expresión transitoria de las construcciones finales: cotransfección celular	25
4.3. Detección de proteína quimérica	25
5. Discusión	26
6. Conclusiones	28
7. Referencias	29

Resumen

El supresor de la activación de células T con dominio variable de inmunoglobulina (VISTA) es un miembro recientemente descrito de la familia de ligandos inmunorreguladores B7 que se expresa preferentemente en la superficie de linfocitos T y células presentadoras de antígenos (APCs). Es una glicoproteína coinhibidora capaz de atenuar la respuesta inmune mediada por linfocitos T activados cuando interacciona con un receptor que se desconoce. Esta actividad convierte a VISTA en una diana terapéutica potencial en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, el rechazo de los trasplantes y el desarrollo de inmunoterapias frente al cáncer. En este trabajo, se han diseñado dos proteínas de fusión recombinantes constituidas por la región extracelular de VISTA y dos *tags* destinados a permitir su detección, un epítipo y el péptido aceptor de biotina AviTag. Para cumplir este objetivo, se expresó de forma transitoria cada construcción quimérica junto a un vector que codifica para la biotina ligasa de *E. coli* (BirA) en células HEK-293T mediante cotransfección celular. Se confirmó la expresión de ambas proteínas recombinantes biotiniladas mediante detección directa con estreptavidina-HRPO. El desarrollo de estas herramientas moleculares permitirá realizar futuros ensayos para aislar, purificar y finalmente identificar el receptor de VISTA.

Palabras clave: coinhibición, epítipo FLAG, familia B7, linfocito T, péptido AviTag, VISTA murino (PD-1H).

Abstract

V-domain Ig suppressor of T cell activation (VISTA) is a recently described member of the B7 family of immune-regulatory ligands, which is preferentially expressed on the surface of T lymphocytes and antigen-presenting cells (APCs). It is a coinhibitory glycoprotein capable of attenuating the activated T cell-mediated immune responses through the interaction with a receptor that remains unknown. This functional activity turns VISTA into a potential therapeutic target for the treatment of autoimmune diseases, transplant rejection and the development of cancer immunotherapies. In this work, two recombinant fusion proteins composed of the extracellular region of VISTA flanked by two tags was designed: an epitope and the biotin acceptor peptide AviTag. These two chimeric recombinant proteins would allow us the detection and monitoring of protein expression as well as the identification of the receptor. To achieve this goal, each chimeric genetic construct was transiently expressed together with a vector encoding *E. coli* biotin ligase (BirA) in HEK-293-T cells by means of cellular cotransfection. The expression of both biotinylated recombinant proteins was followed by direct detection using streptavidin-HRPO. The development of these molecular tools will allow us to implement experiment approaches to isolate, purify and finally identify the receptor for VISTA.

Keywords: AviTag peptide, B7 family, coinhibition, FLAG epitope, mouse VISTA (PD-1H), T lymphocyte.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab: Anticuerpo.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

APC: célula presentadora de antígenos.

CTL: linfocito T citotóxico.

DC: célula dendrítica.

EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental.

ECR: región extracelular.

F7'-mVISTA-AviTag: proteína de fusión recombinante formada por la región extracelular de VISTA murino, el epítipo F7' y el péptido aceptor de biotina AviTag.

FLAG-mVISTA-AvisTag: proteína de fusión recombinante formada por la región extracelular de VISTA murino, el epítipo FLAG y el péptido aceptor de biotina AviTag.

GFP: proteína fluorescente verde.

ICD: dominio intracelular.

IFN: interferón.

Ig: inmunoglobulina.

IgC: dominio de la fracción constante de las inmunoglobulinas.

IgSF: superfamilia de las inmunoglobulinas.

IgV: dominio de la fracción variable de las inmunoglobulinas.

IRES: Sitio interno de entrada al ribosoma.

ITIM: motivo inhibidor de inmunorreceptor basado en tirosina.

LB: Luria y Bertani.

MCS: sitio de clonación múltiple.

MHC II: complejo mayor de histocompatibilidad de clase II.

MPM: marcador de peso molecular.

mVISTA: supresor murino de la activación de linfocitos T con dominio variable de Ig.

NK: célula *Natural Killer*.

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PD-1H: Homólogo de la molécula de muerte programada 1.

SDS: dodecilsulfato sódico.

SI: sinapsis inmunológica.

SIA: sistema inmune adquirido.

SII: sistema inmune innato.

SP: péptido señal.

TB: Terrific Broth.

TCR: receptor de linfocitos T.

TLR: receptor de tipo Toll.

TMD: dominio transmembrana.

TNF: factor de necrosis tumoral.

TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral.

Treg: linfocito T regulador.

VISTA (PD-1H, DD1 α , Gi24 o Dies1): supresor de la activación de linfocitos T con dominio variable de Ig.

1. Introducción

1.1. Sistema inmune

El sistema inmune constituye una verdadera red de tejidos y distintos tipos celulares especializados cuya funcionalidad depende en gran medida de las interacciones que se den entre ellos, bien por contacto directo o indirecto, a través de moléculas como las citoquinas (Furman y Davis, 2015). Se trata de un conjunto de procesos y estructuras finamente regulados, cuyo objetivo principal es servir a la defensa del organismo. Mantienen la homeostasis, actuando frente a señales de peligro y agentes tanto internos como externos que reconocen como extraños y que pueden ser de naturaleza físico-química o biológica, y preservan la tolerancia frente a los elementos propios o autoantígenos (Ceeraz *et al.*, 2013).

La inmunidad se divide en dos bloques o ramas principales, el sistema inmune adquirido (SIA) e innato (SII). En el primero, también denominado adaptativo o específico, participa un componente celular, los linfocitos, dentro del cual se distinguen dos poblaciones principales: los linfocitos T y B. Por otro lado, el sistema cuenta con un componente humoral basado en los anticuerpos producidos por los propios linfocitos B, y otras moléculas como las citoquinas. Se trata de una respuesta altamente especializada, relativamente lenta y que requiere reorganización génica. Los primeros indicios de respuestas inmunes adaptativas dependientes de linfocitos se han encontrado en ciclóstomos, una especie de agnatos o peces sin mandíbula, de manera que se estima una antigüedad evolutiva 300-500 millones de años (Flajnik y Kasahara, 2010). El SII, también conocido como natural o inespecífico, tiene su origen en la aparición de organismos pluricelulares hace unos 1000 millones de años, es decir, presenta una antigüedad mayor. Al contrario que la respuesta adquirida, la innata constituye una primera línea de defensa rápida, sin reorganización génica y capaz de detectar un amplio rango de agentes o señales de peligro (Koenderman *et al.*, 2014). En ella participa una barrera anatómica externa constituida piel y mucosas con sus respectivas secreciones, una barrera celular interna constituida por los fagocitos y las células *natural killer* (NKs), que cuentan en su superficie con receptores de tipo Toll (TLRs), y una barrera fisiológica constituida por factores físicos como la temperatura y el pH, y químicos como defensinas o los interferones (IFNs) de tipo I.

1.2. Linfocitos T y coseñalización

Entre los distintos tipos celulares que intervienen en el desarrollo y la regulación de la respuesta inmune adquirida, los linfocitos T cuentan con especial relevancia (Ceeraz *et al.*,

2013). El control preciso de su actividad durante las fases de iniciación, diferenciación y efectora, resulta esencial para lograr una adecuada defensa del organismo (Parijs y Abbas, 1998). La coestimulación de las células T es un fenómeno que juega un papel esencial, promoviendo la inmunidad protectora y evitando la autoinmunidad (Schildberg *et al.*, 2016). El conocimiento de la coestimulación ha evolucionado de manera sustancial desde el modelo de la doble señal en la activación linfocitaria propuesto por Lafferty y Cunningham para explicar la activación de los linfocitos T maduros que aún no han sido expuestos a ningún antígeno, también denominados *naïve* (Bretscher y Cohn, 1970; Lafferty y Cunningham, 1975; Cunningham y Lafferty, 1977).

Según el modelo mencionado, la respuesta comienza con la activación mediada por los receptores de linfocitos T (TCRs), que llevan a cabo el reconocimiento específico de péptidos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) localizado en las células presentadoras de antígenos (APCs). Sin embargo, tanto la magnitud como la calidad de la respuesta de los linfocitos T depende en último término de una segunda señal, la coestimulación, en la cual participan numerosas moléculas simultáneamente (Chen y Flies, 2008; Pardoll, 2012). Si el proceso de activación carece de esta segunda fase, las células T entran en un estado de anergia y se vuelven refractarias a la estimulación antigénica (Kinnear *et al.*, 2013).

Si bien las vías de coestimulación se tomaron como reguladoras de las respuestas mediadas por los linfocitos T activados, no son las únicas. Existe otro fenómeno, la coinhibición, opuesto al anterior y constituido por moléculas también capaces de modular la respuesta. Las señales coestimuladoras y coinhibidoras pueden agruparse entonces en un conjunto mayor denominado coseñalización. Además de concebirse como medio de control de la activación, las rutas de coseñalización presentan diversos efectos inmunorreguladores sobre las células T *naïve*, efectoras, reguladoras y de memoria, entre los que se incluyen la tolerancia y el agotamiento linfocitarios (Schildberg *et al.*, 2016).

Así, aunque la coestimulación es esencial para impulsar y dar forma a la respuesta inicial, la coinhibición es también crítica para modular la respuesta inmune, atenuando la activación mediada por los TCRs y las moléculas coestimuladoras. Tanto un exceso de respuesta linfocitaria como una insuficiencia en los mecanismos de inhibición puede conducir a una pérdida de la tolerancia hacia lo propio y por tanto desencadenar procesos autoinmunes (Zhang y Vignali, 2016).

Las moléculas coseñalizadoras constituyen un conjunto de receptores y ligandos de naturaleza glicoproteica localizados especialmente en la superficie celular de las APCs y de los propios

linfocitos T (Jung y Choi, 2013). Una vez que los TCRs interactúan con los complejos péptido-MHC, los receptores y ligandos implicados en la coseñalización a menudo se reubican en sus proximidades. Todos estos elementos forman en conjunto la sinapsis inmunológica (SI), estructura única entre ambos tipos celulares. El resultado puede ser un efecto de sinergia o de antagonismo, de modo que los linfocitos T pueden mantenerse activados o no (Saito *et al.*, 2010).

1.3. Moléculas coseñalizadoras: familia B7

Actualmente se conoce un gran número de vías coestimuladoras y coinhibidoras. La primera molécula coestimuladora descrita fue CD28 (Hansen *et al.*, 1980), mientras que la primera con función coinhibidora fue CTLA-4 (Brunet *et al.*, 1987), receptores de membrana. Ambos presentan afinidad por los ligandos mejor caracterizados, CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2).

Tabla 1. Miembros de la familia B7. **Izquierda.** Nombre del ligando. **Centro.** Tipo de actividad coseñalizadora que presenta. **Derecha.** Receptor al que se une. En amarillo se resalta el ligando VISTA. Tabla adaptada de (Jung y Choi, 2013).

Familia B7	Coseñalización	Receptor
B7.1 (CD 80)	Coestimulación	CD28
	Coinhibición	CTLA-4 (CD152)
	Coinhibición	B7-H1 (CD274)
B7.2 (CD86)	Coestimulación	CD28
	Coinhibición	CTLA-4
B7-H1 (PD-L1, CD274)	Coestimulación	Desconocido
	Coinhibición	PD-1 (CD279)
	Coinhibición	B7.1 (CD80)
B7-DC (PD-L2, CD273)	Coinhibición	PD-1 (CD279)
B7-H2 (ICOSL, CD275)	Coestimulación	ICOS (CD278)
	Coestimulación	CD28
B7-H3 (CD276)	Coestimulación	Desconocido
	Coinhibición	Desconocido
B7-H4 (VTCN1)	Coinhibición	Desconocido
B7-H5 (VISTA)	Coinhibición	Desconocido
B7-H6 (NCR3LG1)	Coestimulación	NKp30
B7-H7 (HHLA2)	Coestimulación	CD28H

Esta interacción desencadena la ruta reguladora de la activación

de los linfocitos T más estudiada, sirviendo de paradigma para otras descubiertas posteriormente (Esenten *et al.*, 2016). Las moléculas que participan en las rutas de coseñalización pertenecen a dos grandes grupos: la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), que incluye las familias B7 y CD28 (Schildberg *et al.*, 2016), y la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) y su receptor (TNFR), TNF/TNFR (Ward-Kavanagh *et al.*, 2016).

La familia B7 abarca un conjunto de glicoproteínas de superficie cuyos dominios extracelulares guardan homología con los dominios de las fracciones constante (IgC) y

variable (IgV) de las inmunoglobulinas, es decir, comparten características estructurales con éstas (Jung y Choi, 2013).

Los miembros de la familia B7 se unen principalmente con miembros de la familia de CD28, que engloba receptores de superficie coestimuladores como CD28 o ICOS, y coinhibidores como CLTA-4 o PD-1 (**Tabla 1**). Las interacciones entre moléculas coinhibidoras de ambas familias constituyen las rutas de señalización B7-CD28, cruciales para finalizar la respuesta mediada por las células T activadas, así como para el mantenimiento de la tolerancia hacia los elementos propios del organismo. En relación a esto último, cuando los receptores y ligandos coinhibidores se expresan en un microambiente patológico como por ejemplo un tumor, impiden o dificultan la acción de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) e inducen la generación de linfocitos T reguladores (Tregs) (Chen y Flies, 2008; Pardoll, 2012). En este caso la tolerancia que promueven resulta perjudicial, pues implica resistencia al sistema inmune por parte de las células malignas. Así, la eliminación o disminución de la capacidad inmunosupresora puede resultar muy útil en el desarrollo de inmunoterapias frente al cáncer. De forma contraria, potenciando dicha capacidad se puede reducir el rechazo de los trasplantes o incrementar la eficacia de los tratamientos para las enfermedades autoinmunes (Jung y Choi, 2013).

En cuanto a la localización, los receptores coinhibidores de las rutas mencionadas (B7-CD28) se expresan en otras células hematopoyéticas además de en los linfocitos T, mientras que sus ligandos se expresan en las APCs, en distintas células no hematopoyéticas y en células tumorales (Schildberg *et al.*, 2016). Sin embargo, según describen distintos autores,

determinados ligandos se encuentran tanto en la superficie de las APCs como en la de los linfocitos T (Ceeraz *et al.*, 2013; Jung y Choi, 2013; Schildberg *et al.*, 2016), tal y como se muestra en la **figura 1**.

Algunos de los ligandos de la familia B7 se conocen desde hace décadas, como es el caso de B7.1 y B7.2, los miembros mejor caracterizados (Greenwald *et al.*, 2005). Otros sin embargo se han descrito con posterioridad, siendo VISTA uno de los hallazgos más recientes (Flies *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

1.4. Ligando VISTA, características generales

Entre 2010 y 2011, distintos grupos de investigación identificaron de forma independiente una nueva molécula de coseñalización perteneciente a la familia B7, el ligando B7-H5 (**Tabla 1**), que cuenta también con otras denominaciones, como supresor de la activación de células T con dominio variable de Ig (VISTA), homólogo de la molécula de muerte programada 1 (PD-1H), DD1 α , Gi24 o Dies1 (Aloia *et al.*, 2010; Sakr *et al.*, 2010; Flies *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

1.4.1. Estructura y homología

El gen responsable de la expresión de VISTA se conoce con el nombre *Vsir*, y cuenta con un total de 930 pares de bases (pb) (Wang *et al.*, 2011). VISTA es una proteína transmembrana de tipo I o de un solo paso constituida por 309 aminoácidos. Presenta una región extracelular (ECR) que se compone a su vez de un único dominio extracelular (ECD) IgV de 136

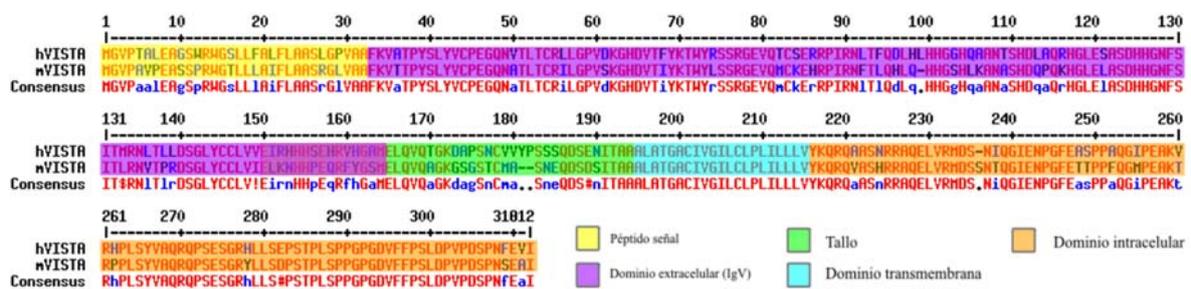


Figura 2. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de los ligandos VISTA humano (hVISTA) y murino (mVISTA), realizado con el software online MultAlin (Corpet, 1988). Los aminoácidos resaltados en rojo son los que presentan homología, y en azul aquellos no homólogos.

aminoácidos unido a un dominio tallo o *stalk* de 23 residuos, un dominio transmembrana (TMD) de 21 aminoácidos y por último una región o dominio intracelular (ICD) de 97 aminoácidos (Flies *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

Diversos análisis filogenéticos de la molécula completa muestran semejanza con los receptores de la familia CD28 PD-1, CD28 y CTLA-4, si bien presenta un mayor grado de identidad con el primero (Flies *et al.*, 2011). PD-L1, miembro de la familia B7, es la molécula más próxima evolutivamente a VISTA (Wang *et al.*, 2011). Una comparación más exhaustiva revela sin embargo ciertas diferencias entre VISTA y las proteínas anteriores. Por ejemplo, la secuencia que codifica para VISTA se localiza en el cromosoma 10, característica que no comparte con ningún otro miembro de la IgSF. Es uno de las pocas proteínas de la familia B7 que cuenta con un único dominio IgV, así como el miembro, mostrando un 78% de identidad entre la forma murina y la humana y patrones de expresión similares (Connell *et al.*, 2014)(Fig. 2).

Al analizar únicamente el dominio IgV de VISTA en lugar de la proteína completa, se ha comprobado que presenta el mayor grado de homología con PD-L1, ligando de PD-1, mientras que el ICD se asemeja más a los receptores CD28 y CTLA-4 (Nowak *et al.*, 2017). Un aspecto a destacar es que, al contrario que PD-1, el ICD de VISTA carece del motivo inhibidor de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM), estructura esencial para la actividad biológica inhibitoria. En su lugar, cuenta con dos sitios potenciales de unión a proteína quinasa C, así como residuos de prolina que podrían funcionar como puntos de anclaje (Flies *et al.*, 2011; Bharaj *et al.*, 2014). Estas peculiaridades estructurales, junto con datos sobre la actividad de la proteína extraídos de distintos estudios sugieren que VISTA es capaz de actuar como ligando y como receptor en la regulación de la respuesta inmune (Connell *et al.*, 2014; Flies *et al.*, 2014; Juan *et al.*, 2015).

1.4.2. Expresión celular

Distintos análisis inmunohistológicos en ratones sugieren que la presencia de la proteína VISTA se restringe casi exclusivamente a la superficie de células hematopoyéticas (Nowak *et al.*, 2017). Dentro de éstas, los mayores niveles de expresión se han encontrado en las de tipo mieloide, incluyendo macrófagos, células dendríticas (DCs) CD11⁺, monocitos y neutrófilos circulantes. En los linfocitos T se da una expresión diferencial entre las poblaciones CD4 y CD8, siendo mayor en la primera, especialmente en las células *naïve* y las Tregs FoxP3⁺. No se ha detectado expresión en los linfocitos B (Flies *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). Como particularidad, se ha observado que VISTA actúa como diana de la actividad de p53 en respuesta a situaciones de estrés, sugiriéndose así una expresión inducida en células apoptóticas que contengan daños en su ADN (Juan *et al.*, 2015).

De acuerdo con los datos obtenidos en modelos murinos, en humanos VISTA es también una molécula característica de tejidos hematopoyéticos. En este caso los mayores niveles de expresión se encuentran en monocitos y en células dendríticas mieloides y linfoides, mientras que en los neutrófilos son intermedios (Connell *et al.*, 2014). Al contrario que en ratones, no se observan diferencias significativas en los niveles de expresión entre linfocitos CD4 y CD8 humanos (Connell *et al.*, 2014).

1.5. Relevancia de VISTA como coinhibidor de la respuesta inmune

De forma similar a PD-1, VISTA presenta la capacidad de controlar la tolerancia periférica del organismo así como la respuesta inmune antitumoral (Chen y Flies, 2008; Flies *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). A pesar de esto, el mecanismo de acción de ambas moléculas no es solapante, sino que juntas desencadenan un efecto sinérgico (Liu *et al.*, 2015).

La actividad mejor estudiada de VISTA es aquella que desempeña como ligando en la superficie de las APCs, reprimiendo la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, así como su producción de citoquinas. Por otra parte, cuando se localiza en la superficie de los linfocitos T CD4⁺, también ejerce un efecto negativo sobre la activación de las células T, si bien lo lleva a cabo actuando como receptor (Flies *et al.*, 2014). Mientras que aún se desconoce el receptor de VISTA, recientemente se ha descubierto una vía capaz de inhibir en humanos la proliferación de linfocitos T así como la producción de citoquinas, desencadenada por la interacción de VISTA con VSIG-3, su ligando (Wang *et al.*, 2016).

Son numerosos los trabajos de investigación enfocados a dilucidar las implicaciones de VISTA en distintos trastornos relacionados con la regulación de la respuesta inmune.

1.5.1. Implicaciones en procesos autoinmunes

Estudios realizados con ratones *knockout* para *Vsir* (*Vsir*^{-/-}) muestran una pérdida de la tolerancia periférica que se manifiesta con la activación espontánea e incontrolada de los linfocitos T, una elevada producción de citoquinas y quimiocinas y el desarrollo de procesos inflamatorios multiorgánicos de carácter crónico (Wang *et al.*, 2014). Además, la deficiencia de VISTA inducida por delección genética o bloqueo con anticuerpos monoclonales en individuos propensos a padecer autoinmunidad, se traduce en el desarrollo acelerado de procesos patológicos de dicha naturaleza, tal y como se demuestra en el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (Wang *et al.*, 2011, 2014; Noelle y Wang, 2014; Liu *et al.*, 2015). De los estudios realizados con anticuerpos monoclonales se han

obtenido sin embargo resultados variables, bien de potenciación como de depresión de la inmunidad, es decir, se pueden dar efectos de antagonismo o agonismo sobre VISTA respectivamente. Esta variabilidad ocurre cuando la proteína se comporta como receptor (Nowak *et al.*, 2017).

1.5.2. Implicaciones en procesos tumorales

El sistema inmune no siempre es capaz de eliminar o al menos contener el crecimiento de los tumores, sino que puede incluso potenciarlo debido a un fenómeno conocido como *immunoediting* (Schreiber *et al.*, 2011). Los linfocitos T llevan a cabo potentes respuestas antitumorales, pero éstas pueden verse reprimidas cuando alcanzan el microambiente tumoral (TME) (Wu *et al.*, 2015). En la atenuación de la respuesta participan distintas moléculas coseñaladoras, entre las que se encuentra VISTA. Múltiples modelos murinos muestran un incremento de la expresión de esta proteína en el TME, ejerciendo un papel crítico como inmunosupresor (Noelle y Wang, 2014). La expresión de VISTA es especialmente mayor en Tregs y células mieloides infiltradas en las proximidades del tumor con respecto a la que se da en los mismos tipos celulares que se encuentran más alejados. Se cree que son las propias condiciones presentes en el TME, como la hipoxia, las responsables de aumento en la expresión de VISTA (Noelle y Wang, 2014). El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-VISTA ha permitido estudiar las implicaciones de la molécula en dicho microambiente. Tras el bloqueo se observa un incremento en la respuesta inmune antitumoral mediada por linfocitos T (Wang *et al.*, 2011; Noelle y Wang, 2014).

1.5.3. Últimos hallazgos

A pesar de la relevancia de VISTA como molécula reguladora en la respuesta inmune adaptativa, hasta ahora no se tenía constancia de su participación en la respuesta innata. Sin embargo, un estudio reciente demuestra cómo la proteína desempeña un papel clave reprimiendo el eje de citoquinas IL-23/IL-17, implicado en procesos inflamatorios de patologías como la psoriasis (Li *et al.*, 2017).

2. Hipótesis de trabajo y objetivos

2.1. Hipótesis de trabajo

Según lo explicado en la introducción del trabajo, VISTA es una proteína transmembrana capaz de atenuar la respuesta mediada por los linfocitos T cuando se une a su receptor, aún desconocido.

Las células humanas adherentes HEK-293 constituyen una línea celular obtenida a partir de tejido embrionario de riñón (Graham y Smiley, 1977). La línea HEK-293T, variante de la anterior, tiene incorporado en su genoma el alelo codificante para el antígeno T del virus del simio 40 (SV-40) (Rio *et al.*, 1985; DuBridgde *et al.*, 1987). Esta característica permite, mediante transfección transitoria, la amplificación de vectores que contengan el origen de replicación de SV-40, lo que supone un incremento en los niveles de expresión génica (Lin *et al.*, 2014).

Utilizando el vector pSecTag2/Hygro B, que contiene el mencionado origen de replicación, se plantea en este trabajo la sobreexpresión, biotilación específica y secreción transitorias, en células HEK-293T, de dos proteínas de fusión solubles constituidas por la ECR de la proteína VISTA murina (mVISTA), el péptido aceptor de biotina AviTag en su extremo C-terminal y un epítipo en su extremo N-terminal que en un caso será FLAG y en otro una variante de éste, que se denominará F7' para diferenciarla. Dichas proteínas permitirían en ensayos *in vitro* posteriores aislar, purificar e identificar el receptor de superficie con el que interacciona VISTA.

2.2. Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado ha sido desarrollar una construcción quimérica recombinante de la ECR de la proteína VISTA murina que sirva como herramienta para la identificación de su receptor, el cual se desconoce. En base a esto, se plantearon los siguientes subobjetivos:

- ✚ Diseño de las secuencias nucleotídicas codificantes para dos proteínas de fusión, F7'-mVISTA-AviTag y FLAG-mVISTA-AviTag. Clonaje e inserción de dichas secuencias en el vector de expresión en células de mamífero pSecTag2/ Hygro B.
- ✚ Desarrollo de un doble ensayo de cotransfección de células HEK-293T con cada construcción obtenida junto el plásmido que codifica para la biotina ligasa BirA de *E. coli*,

obteniendo células capaces de sobreexpresar, biotinilar y secretar de forma transitoria las proteínas recombinantes.

3. Materiales y métodos

3.1. Cepas bacterianas y medios de cultivo

3.1.1. Cepas bacterianas

Para el desarrollo de este trabajo se empleó una única cepa de bacterias *Escherichia coli* TOP 10. Su manejo fue sumamente cuidadoso, pues se trata de bacterias competentes y como tales presentan una alta sensibilidad a las variaciones de temperatura o a la lisis mecánica durante el pipeteo. Se conservan en congelación. La descripción de la cepa se recoge en la tabla 1.

Tabla 2. Detalles de la cepa bacteriana utilizada. De izquierda a derecha, nombre origen y características

Cepa bacteriana	Procedencia	Descripción
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Cód. C4040)	F ⁻ , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(araleu)7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> .

genotípicas.

3.1.2. Medios de cultivo

A lo largo del trabajo experimental se utilizaron distintos medios de cultivo que aparecen detallados en la tabla 2.

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo empleados.

Medio de cultivo	Composición		
	Medio Luria-Bertani (LB)	Medio Terrific Broth (TB)	Agar-Agar
LB-TB (medio líquido)	12,5 g/L	25,4 g/L	-
LB-TB (medio sólido)	12,5 g/L	25,4	20 g/L
Casa comercial	Carl Roth (N° X968)	Carl Roth (N° X972)	Carl Roth (N° 2266)

Las bacterias se cultivaron en diferentes medios de cultivo a los que se añadió carbenicilina, un antibiótico de amplio espectro. Se trata de una penicilina semisintética especialmente eficaz frente a bacterias Gram negativas, aunque también es activa frente algunos cocos Gram positivos y actinomicetos. La cepa *E. coli* TOP10 transformada con plásmidos que contienen un *cassette* de resistencia a ampicilina, crece en presencia de carbenicilina.

Para la incorporación de carbenicilina se partió de un stock a una concentración de 100 mg/mL, y se realizó una dilución de 1:2000 para alcanzar la concentración final de 50 µg/ml.

3.2. Biología molecular

3.2.1. Plásmidos

En la siguiente tabla se recogen los vectores de expresión empleados en este trabajo, así como una descripción de los mismos.

Tabla 4. De izquierda a derecha, denominación, procedencia y características de los plásmidos utilizados.

Plásmido	Procedencia	Descripción
pIB312-Mouse-VISTA (PD-1H) molde	Plásmido de la colección del Área de Inmunología	Plásmido que codifica para el gen completo de PD-1H murino
pJET1.2/blunt	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific (Cód. K1231)	Vector transbordador para técnicas de clonaje. Linealizado con extremos romos, permite la ligación de fragmentos de ADN amplificados por PCR. Presenta: el gen <i>bla</i> de resistencia a ampicilina, el origen de replicación del plásmido pMB1, el promotor P _{lac} modificado, el gen <i>eco471R</i> (codifica para una enzima tóxica para <i>E. coli</i> , luego permite la selección positiva las bacterias recombinantes) interrumpido por el sitio de clonación múltiple (MCS) o <i>polylinker</i> con secuencias específicas para enzimas de restricción, el promotor de la ARN polimerasa T7, y los sitios de hibridación de los cebadores pJET1.2F y pJET1.2RC.
pSecTag2/Hygro B	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (Cód. V91020)	Vector de expresión en mamíferos diseñado para la secreción, purificación y detección de proteínas quiméricas. Presenta: el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor de la ARN polimerasa T7, y la secuencia codificante para la región V-J2-C de la cadena ligera kappa de inmunoglobulina (Ig) murina que actúa como péptido señal (SP), permitiendo la secreción de las proteínas recombinantes, el MSC, la secuencia codificante para el epítipo <i>c-myc</i> , la secuencia codificante para el <i>tag</i> de poli-histidina (6xHis), la señal de poliadenilación y de terminación de la transcripción de la hormona de crecimiento bovina (BGH), el origen de replicación del fago F1, el origen de replicación y promotor del virus del simio 40 (SV-40) para la replicación en líneas celulares que expresen el antígeno T grande (como HEK-293T), el gen bacteriano <i>hygB^R</i> de resistencia a higromicina B, la señal de poliadenilación de SV-40, el origen de replicación pUC y el gen <i>bla</i> de resistencia a ampicilina.
BirA (pIB-319)	MTA	Vector que codifica para la enzima biotina ligasa BirA de <i>E. coli</i> , capaz de biotinilar determinados tipos péptidos, entre ellos AviTag.
pMIG-IRES-GFP	Universidad de Freiburg (Alemania) (MTA)	Vector de expresión en células de mamífero, retroviral. Presenta: un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES), la secuencia codificante para la proteína fluorescente verde (GFP), el gen <i>amp^R</i> de resistencia a ampicilina

3.2.2. Extracción de plásmidos

Para realizar la extracción de los plásmidos utilizados en este trabajo se recurrió a dos kits comerciales distintos, siguiendo las recomendaciones del fabricante:

✚ **QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAagen, N°: 2710):** en este trabajo se siguió el protocolo para microcentrífuga.

✚ **GeneJET® Plasmid Midiprep Kit (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Cód. K048):** se recurrió a este kit cuando la cantidad de plásmido requerida fue mayor.

Ambos protocolos de extracción se fundamentan en una fase de lisis celular en medio básico mediante NaOH y detergente dodecilsulfato sódico (SDS), una segunda fase de precipitación de proteínas y ADN genómico facilitada por centrifugación, tras la que se recoge el sobrenadante en el que se encuentran los plásmidos, y una última etapa de precipitación mediante etanol, adhesión a la membrana de la columna del kit y elución final del ADN plasmídico en agua Milli-Q. En el caso de ADN destinado a transfección, la elución se llevó a cabo en condiciones de esterilidad en cabina de seguridad biológica de clase II *BioStar* (Telstar Cód. 20748800000). Tras la extracción, se tomaron alícuotas para verificar la ausencia de contaminación, mezclándolas en microtubos con medio RPMI 1640 (**Tabla 9**).

Después de todas las extracciones se tomaron alícuotas para cuantificar la concentración de ADN plasmídico (ng/μL), así como el coeficiente indicador de pureza (260/280), utilizando el espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Fisher Scientific).

3.2.3. Amplificación de secuencias de ADN

Para llevar a cabo las amplificaciones de ADN se utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en el termociclador *GeneAmp™ PCR System 9700* (Thermo Fisher Scientific). Por cada unidad de reacción se utilizan unos volúmenes de reactivos y en unas determinadas condiciones de temperatura (que varían ligeramente en función del cebador empleado) y tiempo. Los detalles de las reacciones de PCR así como los reactivos utilizados se recogen en los **anexos**.

3.2.4. Digestión enzimática

Para realizar la extracción e incorporación de los insertos de interés, en este caso la secuencia codificante para la proteína recombinante VISTA, se emplearon enzimas de restricción. Se llevaron a cabo reacciones de digestión de dos de los vectores, el transbordador utilizado para

el clonaje y el destino, es decir, pJET1.2/blunt-VISTA y pSecTag2/Hygro B, respectivamente. En el caso del primero se realizó por duplicado. Las enzimas elegidas fueron *HindIII* y *EcoRV* (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Cód: ER05 y ER03 respectivamente), pues sus dianas de restricción flanqueaban los insertos. De este modo, las secuencias de interés se liberaron del vector transbordador y se preparó el vector destino para la etapa posterior de ligación. Se optó por el Buffer Red 10x (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Cód: BR5), que proporciona las mejores condiciones de reacción para ambas enzimas. Los reactivos utilizados así, como las cantidades se detallan en la **tabla 5**.

Tabla 5. Reactivos para las reacciones de digestión enzimática. ^aLa concentración de enzima indica que 1 μL tiene capacidad para digerir hasta 10 μg de ADN. ^bEl buffer se utiliza a una concentración de 1X, por eso se utilizan 5 μL para cada reacción.

Reactivos para las digestiones		
	Vector de clonaje	Vector destino
ADN plasmídico	3 μg (25 μL)	2 μg (18 μL)
<i>HindIII</i> (10 U/ μL) ^a		1 μL
<i>EcoRV</i> (10U/ μL) ^a		1 μL
Buffer Red 10X^b		5 μl
Agua libre de nucleasas (Braun Medical)	18 μl	25 μl
Volumen final de reacción		50 μL

Una vez preparadas las mezclas de reactivos en tres microtubos previamente rotulados, se incubaron a 37°C durante 2 horas para conseguir una digestión óptima. Transcurrido ese tiempo, se tomaron alícuotas de los productos y se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y voltaje de 80V que las digestiones se habían realizado correctamente.

Después de las reacciones de digestión no fue necesario inactivar las enzimas de restricción, ya que los productos de las mismas se sometieron inmediatamente a electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0,8% y voltaje de 80V. Se cortaron las bandas correspondientes, se eluyeron del gel para posteriormente purificarlas .

3.2.5. Reacciones de ligación

Para llevar a cabo este trabajo se realizaron dos ligaciones, una previa a la digestión con enzimas de restricción y otra posterior:

- ✚ En la primera reacción se incorporó el inserto de interés, amplificado por PCR a partir del vector inicial pIB312-Mouse-VISTA (PD-1H) molde (**Tabla 4**), al vector de clonaje pJET1.2/blunt.

✚ En la segunda reacción se ligó el mismo fragmento, después de haber sido clonado y liberado del vector transbordador mediante la digestión enzimática, al vector destino pSecTag2/Hygro B.

Ambas reacciones se incubaron en el termociclador *GeneAmp™ PCR System 9700* (Thermo Fisher Scientific). Antes de empezar los procesos de ligación se cuantificó la concentración de ADN de los vectores y el inserto utilizando el espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Fisher Scientific). De este modo, se establecieron las relaciones adecuadas de ADN inserto/vector de clonaje e inserto/vector destino para la ligación. Los reactivos y parámetros empleados se detallan en la **tabla 6**. Las reacciones de ligación se prepararon en hielo, añadiendo la ADN ligasa en último lugar.

Tabla 6. Condiciones de las reacciones de ligación. **Izquierda.** Ligación del inserto VISTA con el vector transbordador pJET1.2/blunt. **Derecha.** Ligación del inserto VISTA con el vector destino pSecTag2/Hygro B. En ambos casos se indican los reactivos y volúmenes utilizados. Todos ellos pertenecen a la empresa Thermo Fisher Scientific. ^aEn la primera ligación el inserto fue producto de PCR con Taq polimerasa, por lo que presentaba extremos 3' con colas de poliA generados por la ADN polimerasa Taq. Debido a esto, fue necesario llevar a cabo antes una reacción de *blunting*, es decir, una eliminación de dichas protuberancias para convertir en romos los extremos del inserto. En la segunda ligación esto no fue necesario puesto que no se partió de productos de PCR amplificados con la Taq pfu, que no añade bases al amplicón.

Ligación inserto-vector de clonaje pJET1.2/blunt ^a		Ligación inserto-vector destino pSecTag2/Hygro B	
Ratio volumen inserto:vector de clonaje 7:1		Ratio volumen inserto:vector destino 6:1	
Reacción de <i>blunting</i> (volumen de reacción = 18 µl)		Reacción de ligación (volumen de reacción: 20 µL)	
Inserto (VISTA)	7 µL (8,5 ng/µL)	Inserto (VISTA)	12 µL (9,2 ng/µL)
Buffer reacción 2X	10 µL (50 ng/µL)	pSecTag2/Hygro B	2 µL (8,4 ng/µL)
Enzima ADN <i>blunting</i>	1 µL	Buffer reacción 5X	4 µL
Mezcla suave por pipeteo e incubación a 70°C 5'. Refrigeración en hielo		Agua (libre de nucleasas)	1 µL
Reacción de ligación (volumen de reacción: 20 µL)		ADN ligasa de T4 (5U/µL)	1 µL
pJET1.2/blunt	1 µL		
ADN ligasa de T4 (5U/µL)	1 µL		
Mezcla suave por pipeteo e incubación a 22°C 15'			

Para verificar que las reacciones se desarrollaron con éxito, se realizó una PCR con Taq polimerasa a partir de cinco colonias bacterianas transformadas con el producto de ligación para amplificar el inserto VISTA. Seguidamente se llevó a cabo una electroforesis con los productos de PCR en gel de agarosa al 1,5% y voltaje de 80V. La presencia o ausencia de banda con el tamaño equivalente al del inserto permitió identificar las colonias positivas.

3.2.6. Electroforesis en gel de agarosa

En este trabajo se llevaron a cabo electroforesis horizontales en gel de agarosa con el objetivo de separar y analizar cualitativamente ADN de interés. Se emplearon distintos geles en función del porcentaje (peso/volumen) y tipo de agarosa:

✚ **Geles de agarosa al 1,5%:** utilizados para detectar ADN y comprobar que la posición de las bandas se correspondía con el tamaño de fragmento esperado.

✚ **Geles de agarosa de bajo punto de fusión al 0,8%:** una vez realizada la comprobación con los anteriores, estos geles se utilizaron para extraer las bandas con el ADN de interés.

En ambos casos, la agarosa fue disuelta en buffer Tris-borato-EDTA (TBE) al 0,5X, preparado a partir de TBE al 5X mediante una dilución 1:10 (**Tabla 7**). A las muestras cargadas en los geles se les añadió buffer de carga Orange al 6X (Thermo Scientific, Thermo

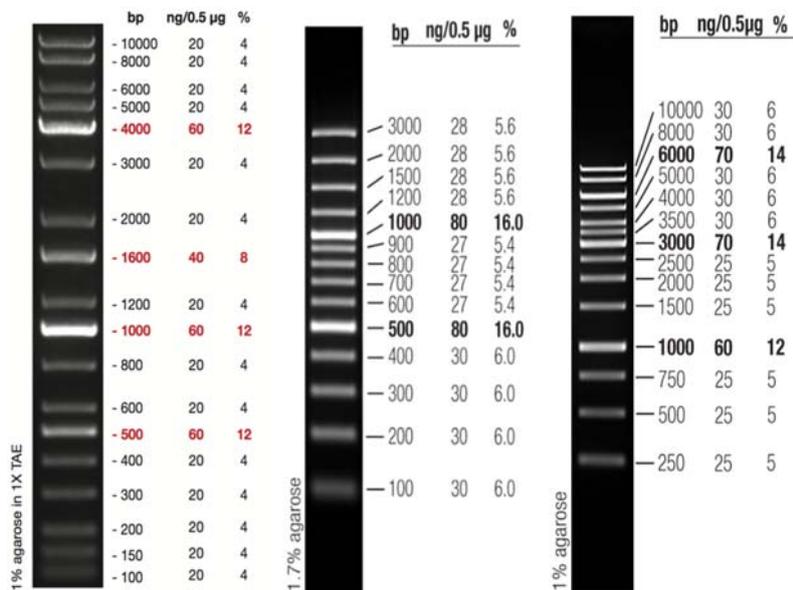


Figura 3. Izquierda. Marcador *Kapa Universal Ladder* y relación banda-peso molecular en gel de agarosa al 1%. Derecha. Marcador *GeneRuler 100 bp Plus Ladder* y relación banda-peso molecular en gel de agarosa al 1,7%. Derecha. Marcador *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* y relación banda-peso molecular en gel de agarosa al 1%.

(Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Cód: SM031) con rangos de pesos moleculares comprendidos entre 100-10000, 100-3000 y 250-10000 pares de bases (pb), respectivamente (**Fig. 3**).

Las electroforesis se llevaron a cabo en una cubeta de electroforesis horizontal *Sub-Cell® Model 192 Cell* (Bio-Rad) que se llenó previamente con el buffer TBE anteriormente mencionado. Dicha cubeta fue conectada a una fuente de alimentación *PowerPac Basic Power Supply* (BioRad).

Fisher Scientific, Cód: R0631), diluyéndolo hasta una concentración final 1X. Como agente intercalante para marcar el ADN se empleó RedSafe (iNtRON Biotechnology, N°: 21141). Se utilizaron tres marcadores de pesos moleculares: *KAPA Universal ladder* (Kapa biosystems), *GeneRuler 100 bp Plus Ladder* (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Cód: SM032) y *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*

La corriente continua aplicada osciló entre 80 y 90 V y durante períodos de 30-40 minutos. Los reactivos y cantidades empleadas para los distintos geles, así como la composición del TBE 5X se detallan en la **tabla 7**.

Tabla 7. Superior. Composición de los geles de agarosa. **Inferior.** Composición del buffer Tris-borato-EDTA (TBE). En ambos casos se indican los reactivos y las cantidades empleadas.

Reactivos	Gel agarosa al 1,5%		Gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0,8%	
	50 mL	100 mL	50 mL	100 mL
Agarosa regular (Sigma)	0,75 g	1,5 g	-	-
Agarosa de bajo punto de fusión	-	-	0,4 g	0,8 g
TBE 0,5X	50 mL	100 mL	50 mL	100 mL
RedSafe	1 µL	2 µL	1 µL	2 µL
Buffer TBE 5X				
Trizma base (Sigma)	54 g			
Ácido bórico (Sigma)	27,5 g			
EDTA 0,5M pH 8,0	20 mL			
Agua destilada	Hasta volumen final de 1 L			

Una vez finalizadas las electroforesis, se analizaron y fotografiaron los geles con el sistema de vídeo *Chemidoc* (BioRad) asociado al software *Quantity One* (Biorad)

3.2.7. Purificación de ADN contenido en bandas de gel de agarosa

Tras la extracción de las bandas de interés de los geles de agarosa de bajo punto de fusión, el ADN contenido en ellos se extrajo utilizando el kit comercial *GenElute™ Gel Extraction Kit* (Sigma), diseñado para la purificación de plásmidos y fragmentos lineales de tamaños comprendidos entre 50 y 10000 pb. Siguiendo el protocolo diseñado por el fabricante, las bandas de gel se disuelven mediante incubación en una solución de solubilización que cuenta con un indicador de pH. El volumen obtenido con los fragmentos de ADN en suspensión se vierte en la columna de purificación facilitada por el kit, que contiene una membrana de sílica a la que se une selectivamente el ADN. Los contaminantes son retirados aplicando una solución de lavado a la columna y el ADN se eluye finalmente en agua (libre de nucleasas).

Una vez completada la extracción, se cuantificó la concentración y pureza del ADN utilizando el espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Fisher Scientific). Además, se cargaron alícuotas en un gel de agarosa al 1,5%, para comprobar mediante electroforesis la presencia de banda del tamaño esperado.

3.2.8. Transformación bacteriana y siembra en placa

Como ya se mencionó anteriormente, se utilizaron células de la cepa bacteriana *Escherichia coli* TOP10 (**Tabla 2**), a las que de forma previa se indujo químicamente competencia aplicando el método descrito por Hanahan (Hanahan, 1983). A lo largo del trabajo, se realizaron varias transformaciones, con el vector de clonaje o transbordador y con el vector destino, ambos con el inserto VISTA incorporado. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de Petri de bacteriología de 9 cm (SARSTEDT). La transformación se llevó a cabo mediante choque térmico, para lo cual se siguió el protocolo detallado en la **tabla 8**.

Tabla 8. Superior. Protocolo de transformación bacteriana con choque térmico. **Inferior.** Siembra en placas de agar, material y parámetros detallados. ^aLas siembras se realizaron a la llama con pipetas Pasteur (Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific) selladas en la punta y dobladas en ángulo recto por calor. ^bSe sembró una única placa sin antibiótico utilizando una dilución 1:10 del inóculo. ^cAdición previa de solución con antibiótico (60 µL carbenicilina en 100 µL de agua libre de nucleasas) como medio selectivo a tres.

Protocolo de transformación	
1. Descongelación de células competentes <i>E. coli</i> TOP10	100 µl células/vial
2. Encendido de baño termostático (Raypa) programación a 42°C	
3. Adición de ADN(en hielo) y mezcla suave	Volumen total del producto de ligación (Tabla 6): 20 µL
4. Choque térmico	Hielo 15'; baño a 42°C 45''; hielo 1-2'
5. Adición de medio líquido LB-TB (Tabla 3) atemperado como medio de recuperación	800 µL/vial en agitación (250 rpm), a 37°C 45' en agitador-incubador orbital (IKA)
Siembra	
1. Dilución del inóculo (1:1, 1:10 y 1:50) en medio líquido LB-TB (Tabla 3) y siembra ^a de alícuotas en placas con medio sólido LB-TB (Tabla 3)	100 µL alícuota (dilución 1:10)/placa sin antibiótico ^b
	200 µL alícuota /placa con antibiótico (carbenicilina) ^c
2. Incubación a temperatura ambiente hasta que la solución de siembra se haya absorbido	
3. Incubación de las placas en posición invertida	37°C 24 h

3.2.9. Secuenciación de ADN

Para comprobar que la secuencia nucleotídica del inserto VISTA estaba correcta, se recurrió a la secuenciación del ADN. Ésta se realizó en un secuenciador automático (Amershan Biosciences) del Servicio de Secuenciación de la Universidad de León, empleando el kit comercial *Thermo Sequenase Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Cód: 785001KT).

3.3. Cultivo de células eucariotas

3.3.1. Líneas celulares

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó únicamente la línea celular HEK-293T (ATCC). Se trata de células humanas embrionarias de riñón derivadas de la línea HEK-293, resistentes a neomicina y que expresan de forma estable una forma mutante del antígeno T grande de SV-40, lo que permite que todo aquel vector con el que se transfecten y que contenga el origen de replicación de SV-40 pueda replicarse y mantener de forma transitoria un elevado número de copias. Así, la cantidad de proteína recombinante que se puede obtener en estas células es elevada. Antes de su uso, se testó la línea mediante PCR para verificar la ausencia de micoplasmas.

3.3.2. Condiciones de trabajo y crecimiento celular

El manejo de cultivos celulares realizado durante este trabajo incluye procesos de siembra, subcultivo, expansión, congelación, descongelación y transfección. Todos ellos se desarrollaron bajo condiciones de esterilidad en cabina de seguridad biológica de clase II *BioStar* (Telstar, Cód. 20748800000). La línea celular se creció en placa de 9 cm de diámetro de superficie adherente y medio RPMI 1640 completo (7-10 mL), con el fin de obtener el stock necesario para los experimentos posteriores. La incubación de los cultivos se llevó a cabo en una estufa con sistema humidificador y filtro HEPA (Thermo Fisher Scientific), a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%. El medio de cultivo mencionado cuenta con rojo fenol como indicador de pH, de forma que a medida que se agotan los nutrientes y se acumulan sustancias de desecho, se produce acidificación y con ella un viraje en la coloración desde rojo intenso hacia un tono anaranjado o amarillento. Así, el cambio de medio se llevó a cabo en condiciones de densidad celular elevada y reducción del pH.

Un día antes de realizar las transfecciones, las células se tripsinizaron y contaron para sembrar el número adecuado. Además, el medio de cultivo fue renovado para promover la fase activa de crecimiento celular y conseguir una confluencia elevada en el momento de la transfección, comprendida entre el 70 y el 80%.

3.3.3. Reactivos y medios

Teniendo en cuenta las propiedades de las células utilizadas y las pruebas desarrolladas con ellas, se emplearon distintos medios y reactivos, los cuales aparecen detallados en la **tabla 9**.

Tabla 9. Composición de los medios y reactivos utilizados para el manejo de cultivos celulares.

Medio	Composición
RPMI 1640 sin antibiótico	10,42 g RPMI 1640 (Gibco), 2 g NaCO ₃ (Sigma), agua Milli-Q hasta volumen final de 1 L. pH de 7,4
RPMI 1640 completo	Suero fetal bovino (Gibco) 10%, 50 mL cóctel (L-glutamina 2mM (Gibco), piruvato sódico 1mM (Gibco), HEPES 10 mM (Sigma), gentamicina 50 µg/mL (SYVA laboratorios), β-mercaptoetanol 50 µM) y RPMI 1640 (Gibco) hasta volumen final de 1 L.
Opti-MEM (Gibco)	Mejora de medio mínimo esencial de Eagle (MEM), utilizando como tampón HEPES y bicarbonato de sodio, y suplementado con hipoxantina, timidina, piruvato de sodio, L-glutamina, elementos traza y factores de crecimiento.
Medio de congelación	Suero fetal bovino descomplementado con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (Sigma).
PBS Dulbecco's	100 mL PBS 10X (Gibco) libre de Mg ²⁺ y Ca ²⁺ . 200 mg KCl (Sigma), 200 mg KH ₂ PO ₄ (Sigma), 8g NaCl (Sigma), 1,15 g Na ₂ HPO ₄ (Sigma) y agua Milli-Q hasta volumen final de 1L.

Tanto el medio RPMI 1640 sin antibiótico como el completo se filtraron en condiciones de asepsia en cabina de seguridad biológica utilizando un filtro con un diámetro de poro de 0,2 µm. El medio Opti-MEM permite reducir la suplementación de suero fetal bovino al menos un 50%. Es un medio reductor que resulta ideal para la transfección mediante liposomas catiónicos (lipofección), especialmente con el reactivo *Lipofectamine*. El PBS 10X utilizado se diluyó en una proporción 1:10 en agua Milli-Q.

3.3.4. Congelación y descongelación

Durante la realización de este proyecto fue necesario, en determinadas ocasiones, conservar las células hasta su manipulación. Para ello, se recurrió a los protocolos de congelación y descongelación que aparecen recogidos en la **tabla 10**. Se trata de métodos diseñados para una congelación progresiva y una descongelación rápida de las células, de forma que la disminución de la viabilidad sea mínima. Es importante mencionar que el día previo a la congelación se renueva el medio de cultivo.

Tabla 10. Izquierda. Protocolo de congelación celular progresiva. **Derecha.** Protocolo de descongelación rápida de viales de células.

Congelación progresiva de células adherentes	Descongelación rápida de viales
<ol style="list-style-type: none"> 1. Retirar el medio de cultivo. 2. Lavar las células con 5 ml de PBS 1X. 3. Tripsinizar las células añadiendo 2,5 mL de solución buffer PBS con Tripsina-EDTA. Dejar actuar 1 minuto. 4. Inactivación de la tripsina con 3 mL de medio RPMI 1640 completo, pipeteando con la placa ligeramente inclinada. 5. Recoger las células y transferir a un tubo tipo Falcon de 15 mL. 6. Centrifugar el tubo a 1200 rpm 5 minutos. 7. Resuspender pellet de células en medio de congelación 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Introducir el vial o viales de células en baño de agua a 37°C durante unos segundos. 2. Añadir 1 mL de medio RPMI 1640 completo previamente calentado a 37°C. 3. Transferir contenido del vial a un tubo tipo Falcon de 15 mL con 4 mL de medio RPMI 1640 completo y centrifugar a 1200 rpm 5 minutos. 4. Retirar el sobrenadante y resuspender pellet en 5 mL de medio completo fresco.

(1mL/vial). 8. Congelar los viales en un contenedor de congelación a -80°C durante al menos 5 horas y finalmente almacenar en nitrógeno líquido.	5. Transferir células en placa o placas con 5 mL más de medio fresco. 6. Añadir 100 µL de geneticina/ mL medio.
---	--

3.3.5. Recuentos celulares

El conteo celular se llevó a cabo en hemocitómetro o cámara de Neubauer (Celeromics), utilizando el colorante azul tripán, colorante capaz de penetrar en las células muertas y que por tanto permite determinar la viabilidad celular. Para el recuento se siguió el método descrito por Strober (Strober, 2001).

3.4. Transfección celular

Con el objetivo de conseguir que la línea celular empleada expresase de manera transitoria las proteínas recombinantes F7⁺-mVISTA-AviTag y FLAG-mVISTA-AviTag se recurrió a la técnica de transfección celular, cuyo protocolo aparece detallado en la **tabla 11**.

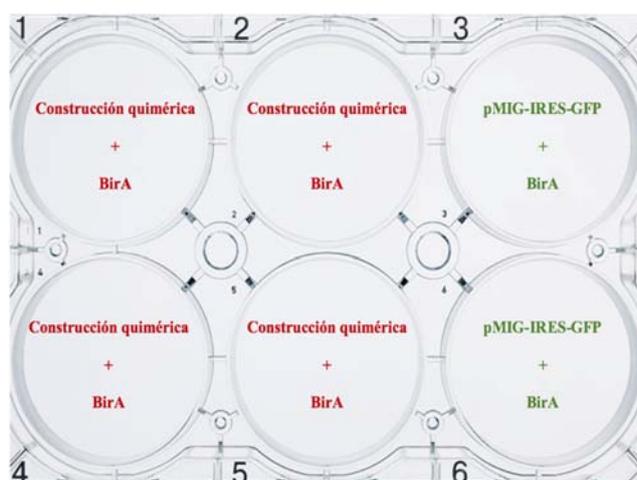


Figura 4. Esquema representativo de cotransfección. En rojo se resaltan los pocillos cotransfectados con la construcción quimérica a testar junto con el vector BirA, y en verde los pocillos control, cotransfectados con los vectores pMIG-IRES-GFP y BirA.

Se realizaron dos ensayos, uno para proteína de fusión a expresar, utilizando en ambos casos placas de 6 pocillo y la misma distribución, tal y como se muestra en la **figura 4**. Se diseñaron pocillos control con doble objetivo: verificar el éxito de la cotransfección gracias a la expresión de GFP (control positivo), y la ausencia de biotilación inespecífica de otras proteínas por parte de la enzima BirA.

Tabla 11. Protocolo de transfección para células adherentes, detallando los pasos a seguir el día previo (izquierda), y para la transfección propiamente dicha.

Día previo a la transfección	Día de la transfección
------------------------------	------------------------

<ol style="list-style-type: none"> 1. Lavar las células con 5 mL de PBS. 2. Tripsinizar las células con 2,5 mL de solución PBS-Tripsina-EDTA, dejando actuar 1 minuto. 3. Inactivar la tripsina con 5 mL de medio RPMI 1640 completo. Transferir a tubo tipo Falcon de 15 mL 4. Centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos. 5. Retirar sobrenadante y resuspender pellet en 1 mL de medio completo. 6. Recuento celular y transferir a placa de seis pocillos con 3 mL de medio completo/ pocillo, sembrando 10^5 células/pocillo. No añadir genética. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Retirar el medio de las células sembradas el día previo y lavar con medio RPMI 1640 sin antibiótico en incubación a 37°C. 2. Preparar mix de transfección de manera que por pocillo se tengan: 200 μL de Opti-MEM, 3 μg de ADN y 9 μg de liposomas catiónicos. 3. Incubar mix a temperatura ambiente durante 15 minutos. 4. Pasados los 15 minutos, retirar el medio sin antibiótico y añadir 200 μL de mix en cada pocillo. 5. Añadir 800 μL de Opti-MEM por pocillo. 6. Incubar durante 24 horas a 37°C.
---	---

Las cotransfecciones se llevaron a cabo mediante lipofección, utilizando el reactivo Lipofectamine. La concentración a la que se utilizó era de 1 μ g/ μ L, y se añadían 9 μ L por cada pocillo.

3.5. Método de detección directa e inmunoensayo tipo ELISA

Una vez completadas la transfecciones, se recogió en un tubo Falcon de 50 mL el medio procedente de los pocillos cotransfectados con construcción quimérica y vector BirA, y en otro el medio control de los pocillos cotransfectados con los vectores pMIG-IRES-GFP y BirA. Ambos tubos se centrifugaron para eliminar restos celulares y se llevaron a cabo los ensayos de detección. Se probaron dos métodos, uno directo basado en la interacción biotina-estreptavidina, y un inmunoensayo de tipo ELISA indirecto utilizando anticuerpos (Abs). De cada método se llevaron a cabo dos pruebas, una por cada proteína de fusión a testar (F7²-mVISTA-AviTag y FLAG-mVISTA-AviTag). La información detallada de los métodos de detección se recoge en los **anexos**.

Se emplearon placas de 96 pocillos no estériles (Thermo Fisher Scientific), pero con distintas distribuciones tal y como se indica en las **tablas 12 y 13**.

Tabla 12. Distribución de la placa de 96 pocillos en el método de detección directo. Se testa por duplicado el sobrenadante problema (**Construcción**), y el sobrenadante control (**Control**).

MÉTODO DIRECTO						
Muestra	Dilución					
Construcción	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	Blanco
Construcción	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	Blanco
Control	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	Blanco
Control	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	Blanco

Tabla 13. Distribución de la placa de 96 pocillos en el inmunoensayo de tipo ELISA indirecto. En rosa y en amarillo se resaltan las diluciones empleadas del anticuerpo primario y secundario, respectivamente, para el sobrenadante problema (**Const.**) y control (**Control**).

INMUNOENSAYO (ELISA INDIRECTO)

Ab 2°	Ab 2°													
	Dilución 1:2000							Dilución 1:5000						
	Muestra	Dilución						Muestra	Dilución					
Dil. 1:2000	Const.	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	B	Const.	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	B
	Control	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	B	Control	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	B
Dil. 1:5000	Const.	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	B	Const.	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	B
	Control	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	B	Control	1:1	1:3	1:9	1:27	1:81	B

4. Resultados

4.1 Clonaje y expresión de las proteínas de fusión recombinantes FLAG-mVISTA-AviTag y F7'-mVISTA-AviTag en el vector de expresión de mamíferos pSecTag2/Hygro B.

En este trabajo se desarrollaron las proteínas quiméricas recombinantes FLAG-mVISTA-AviTag y F7'-mVISTA-AviTag constituidas por tres elementos, dos de ellos comunes: el dominio extracelular murino (ECR) de la proteína VISTA o PD-1H, fusionado por su extremo carboxilo terminal con el péptido aceptor de biotina AviTag, y por su extremo amino terminal con un epítipo que en uno de los ensayos fue el octapéptido FLAG y en otro una variante heptapeptídica del mismo denominada F7'. La estrategia planteada para conseguirlo fue la misma en ambos casos, y se basó en el diseño inicial y amplificación por PCR de la secuencia codificante para la proteína de fusión a partir del vector molde o *template* pIB312-Mouse-VISTA (PD-1H), utilizando los cebadores adecuados. El producto de PCR obtenido se clonó en el vector comercial de clonaje o transbordador pJET1.2/blunt, que posteriormente se digirió con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRV*. De esta manera se liberó el inserto de interés, y fue posible su ligación final al plásmido destino de expresión en células de mamífero pSecTag2/Hygro B previamente digerido con las mismas enzimas.

4.1.1. Amplificación del inserto inicial y clonaje en pJET1.2/blunt

Mediante la técnica de PCR con la *TaqPfu*, se llevó a cabo la amplificación de la secuencia nucleotídica de partida, utilizando el protocolo diseñado por Mullis (Mullis, 1990). En función de la proteína a obtener, se emplearon distintos cebadores:

- ✚ Cebador 5'-3' pIB-313F, con la diana de restricción para *HindIII*, seguida de la secuencia codificante para el epítipo F7' y el inicio del ECD IgV de mVISTA. Este cebador se utilizó para obtener la proteína F7'-mVISTA-AviTag.
- ✚ Cebador 5'-3' pIB-313F *new*, con la misma secuencia que el cebador pIB-313F salvo por el triplete adicional AAG al final de la secuencia codificante para F7', que pasa a ser la

secuencia codificante para FLAG. Este cebador se utilizó por tanto para obtener la proteína FLAG-VISTA-AviTag.

✚ Cebador **3'-5' pIB-313RC**, con la secuencia codificante para el final de la región del tallo o dominio stalk de mVISTA, seguida de una secuencia *linker* GS3, la secuencia codificante para el péptido AviTag, el codón de fin y la diana de restricción para EcoRV. Este cebador se empleó en ambos ensayos.

El vector molde inicial, pIB312-Mouse-VISTA (PD-1H), contiene el gen completo para la proteína mVISTA, pero gracias a la estructura de los cebadores sólo se amplifica de ella la ECR, que es la que nos interesa para generar una proteína de fusión soluble que se pueda secretar.

El producto de PCR se purificó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de bajo punto de fusión al. A continuación se llevó a cabo la ligación con el vector transbordador pJET1.2/blunt (**Tabla 6**), dando lugar a las construcciones pJET1.2- F7'-mVISTA-AviTag y pJET1.2- FLAG-mVISTA-AviTag.

Con el plásmido obtenido se llevó a cabo la transformación por choque térmico de bacterias competentes *E. coli* TOP 10 (**Tabla 8**). Pasado el período de incubación en medio LB con carbenicilina, crecieron colonias resistentes al antibiótico por haber adquirido el vector transbordador, que contiene el gen de resistencia a ampicilina. Se seleccionaron cinco colonias, tomando la mitad de cada una para sembrar en una placa nueva. La otra mitad de cada colonia sirvió para comprobar por PCR con Taq polimerasa la presencia de inserto. Con los productos de dicha PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. De entre las colonias positivas (presencia de banda), se eligió la número 3 para continuar el trabajo en el caso de la construcción pJET1.2- F7'-mVISTA-AviTag y la número 1 para pJET1.2- FLAG-mVISTA-AviTag).

4.1.2. Construcción final

Una vez conseguido el vector transbordador con el inserto integrado, las colonias seleccionadas se sembraron en medio líquido LB-TB con carbenicilina, y se incubaron durante 24 horas en agitación a 37°C. De forma paralela, se sembraron también en el mismo medio bacterias transformadas con vector destino pSecTag2/Hygro B. Tras la incubación, se llevó a cabo una extracción del plásmido transbordador y destino, y seguidamente la digestión enzimática de ambos con *HindIII* y *EcoRV* (**Tabla 5**). De esta manera el vector de clonaje pJET1.2 se liberó del inserto (F7'-mVISTA-AviTag o FLAG-mVISTA-AviTag) y se

linealizó el vector destino pSecTag2/Hygro B, con extremos compatibles con los del inserto para llevar a cabo un clonaje dirigido. Tras la digestión de los vectores se realizaron dos electroforesis, una en gel de agarosa al 1,5% para comprobar que dicha digestión se desarrolló con éxito, y otra en gel de bajo punto de fusión al 0,8% para extraer y purificar las bandas de interés (la correspondiente al inserto y vector destino). Con el ADN purificado de ambas bandas se llevó a cabo la ligación que dio lugar a la construcción final, en un caso pSecTag2/Hygro B-F7'-mVISTA-AviTag y en otro pSecTag2/Hygro B-FLAG-mVISTA-AviTag.

A fin de generar un *stock* y obtener una cantidad suficiente de plásmido para las transfecciones

celulares

posteriores, se

realizó

nuevamente una

transformación

bacteriana por

choque térmico y

selección posterior

mediante siembra

en placa con medio

sólido LB-TB y

carbenicilina. De nuevo se testaron 5 colonias por PCR. En el estudio desarrollado con F7'-mVISTA-AviTag la colonia elegida fue la 3, mientras que en el correspondiente a FLAG-mVISTA-AviTag se seleccionó la colonia 5. Los resultados se muestran en la **figura 5**. Ambas colonias se crecieron en medio líquido LB-TB con antibiótico para llevar a cabo extracción de plásmido.

4.1.3. Comprobación de la construcción quimérica mediante secuenciación

Se llevó a cabo la secuenciación de las dos construcciones finales obtenidas para comprobar que el marco de lectura era el correcto, y de la secuencia de los insertos integrados en ellos (F7'-mVISTA-AviTag y FLAG-mVISTA-AviTag). Para la secuenciación se utilizó el cebador sentido T7 cuya secuencia se localiza en el plásmido pSecTag2/Hygro B (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3').

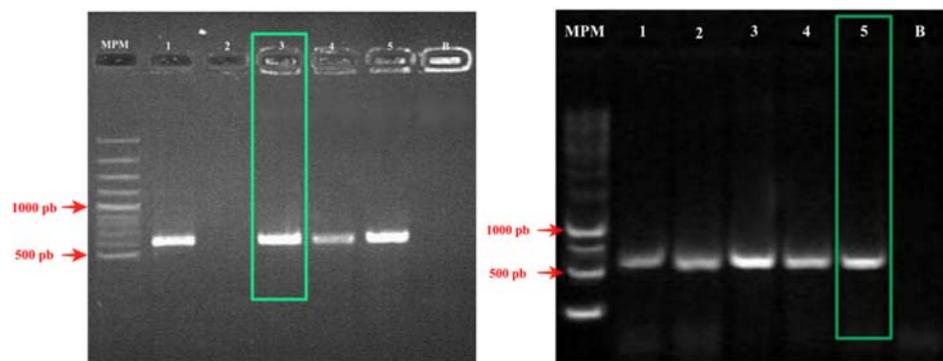


Figura 5. Resultados de la electroforesis para la selección de colonias con el inserto de interés incorporado. Izquierda. Detección de F7'-mVISTA-AviTag, de 603 pb. Derecha. Detección de FLAG-mVISTA-AviTag, de 606 pb. MPM se corresponde con el marcador de pesos moleculares, en el primer caso *GeneRuler 100 bp Plus Ladder* y *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* en el segundo. Cada número representa una colonia bacteriana, de las cuales se recuadra la seleccionada. El carril 'B' es el control negativo o blanco.

Alineando las secuencias teóricas que se perseguían en el trabajo y las construcciones finales generadas se obtuvo una identidad total en ambos casos, por lo que fue posible continuar con el trabajo. Los detalles de los alineamientos se recogen en los **anexos**.

4.2. Expresión transitoria de las construcciones finales: cotransfección celular

Se llevaron a cabo dos ensayos de cotransfección en células adherentes de la línea HEK-293T, empleando placas de seis pocillos (descripción detallada en el **apartado 3.4.**). En uno de ellos se utilizó la construcción quimérica pSecTag2/Hygro B-F7'-mVISTA-AviTag (ensayo 1) y en el segundo pSecTag2/Hygro B-FLAG-mVISTA-AviTag (ensayo 2).

En ambas placas se detectó fluorescencia, lo que indica expresión de GFP y por tanto una

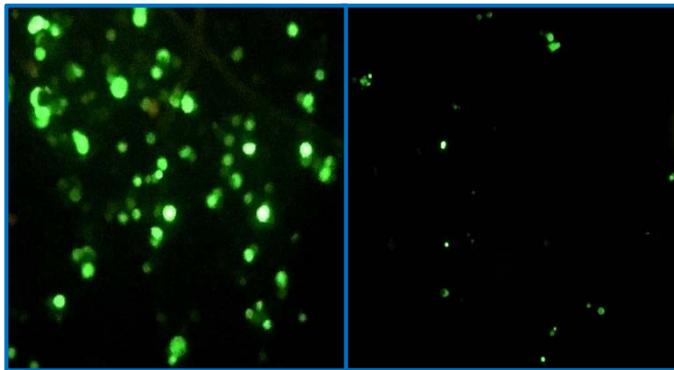


Figura 6. Células HEK-293T control (cotransfectadas con los plásmidos pMIG-IRES-GFP y BirA). **Izquierda.** Ensayo de cotransfección 1. **Derecha.** Ensayo de cotransfección 2.

correcta cotransfección (**Fig. 6**). Sin embargo, en el ensayo 2 se observó una confluencia celular por debajo del 30%, mucho menor que la obtenida en el 1 (75%), además de una elevada tasa de muerte. Esto hizo que la expresión esperada de la proteína FLAG-mVISTA-AviTag fuese inferior a F7'-mVISTA-AviTag.

4.3. Detección de proteína quimérica

Una vez completados los ensayos anteriores, se recogió el medio de los pocillos, utilizando en cada caso dos tubos, uno para aquel procedente de la cotransfección con construcción quimérica y otro para el medio control. Con dichos sobrenadantes se realizaron dos pruebas para testar la presencia de la proteína de fusión (ver **apartado 3.5.**):

✚ **Método directo:** basado en la interacción biotina-estreptavidina para detectar el péptido aceptor de biotina C-terminal (AviTag).

✚ **Inmunoensayo de tipo ELISA indirecto:** diseñado para detectar el epítipo (F7' o FLAG) N-terminal mediante la interacción de éste con un anticuerpo específico.

Estos métodos de detección son colorimétricos, permiten estimar la cantidad de molécula problema en función de un cambio en la coloración de la solución que la contiene, midiendo posteriormente la absorbancia a 450 nm, es decir, son de carácter cualitativo. Los resultados son positivos para la detección tanto de F7'-mVISTA-AviTag como de FLAG-mVISTA-

AviTag por el método directo, si bien los valores de absorbancia en el caso de FLAG-mVISTA-AviTag fueron más bajos. Esto indica que la cantidad de proteína presente en el medio del segundo ensayo de cotransfección era menor. Por el contrario, el método indirecto resultó negativo en ambos casos, con ausencia de coloración en los pocillos, valores de absorbancia. Los resultados del método directo para ambos ensayos se recogen en la **figura 7**.

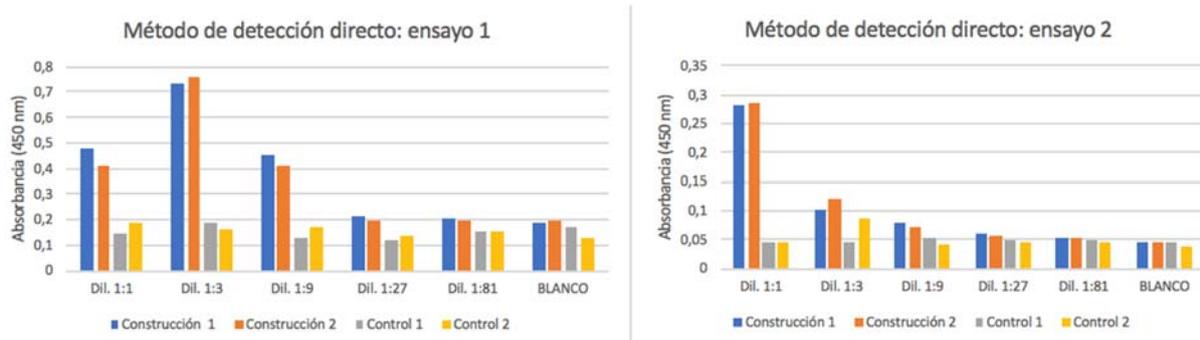


Figura 7. Resultados obtenidos mediante el método de detección directo. En el eje de abscisas se representan las diluciones de las dos réplicas realizadas con el sobrenadante con proteína de fusión y de las dos réplicas realizadas con el sobrenadante control. En el eje de ordenadas se representa la absorbancia medida a 450 nm.

5. Discusión

Como se menciona en la introducción, la coinhibición es un fenómeno crítico en la modulación de la respuesta inmune mediada por los linfocitos T (Zhang y Vignali, 2016). El homólogo de PD-1 o VISTA es una proteína relativamente novedosa perteneciente a la familia de ligandos B7 que actúa como molécula coinhibidora y cuyo receptor se desconoce (Nowak *et al.*, 2017).

El desarrollo de un sistema mediante ingeniería genética basado en el diseño y expresión de una proteína quimérica recombinante que sirva para aislar y purificar el receptor con el que interacciona cuenta con un indudable interés en el ámbito de la inmunología. La identificación de dicho receptor permitiría conocer con más detalle la vía de señalización en la que participa y por tanto idear estrategias más precisas y eficaces para modular la respuesta inmune. Esto resulta especialmente útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, autoinmunes e incluso en inmunoterapia frente al cáncer.

Para conseguir este objetivo fue necesario llevar a cabo la sobreexpresión transitoria, biotinylation metabólica específica y secreción de una proteína de fusión recombinante constituida por la ECR de la proteína VISTA flanqueada por un epítipo y el péptido aceptor

de biotina AviTag en sus extremos amino y carboxilo terminales respectivamente. Se empleó en el sistema la línea de células humanas adherentes HEK-293T.

La elección de la parte extracelular de VISTA en el diseño de la proteína de fusión se basó en la estructura completa de la molécula. Descartando sus dominios transmembrana e intracelular la proteína adquiere carácter soluble, de modo que, a partir de un vector que contenga la secuencia codificante para un SP adecuado, ésta puede secretarse al medio de cultivo. Además, conserva el dominio IgV, que es la región encargada de interactuar con su receptor, es decir, mantiene la función de interés para el ensayo.

La unión biotina-estreptavidina es una de las interacciones biológicas no covalentes más fuertes, debido a la elevada afinidad que presenta. Esto hace del marcaje de proteínas por biotilación un método altamente eficaz para su detección. La biotilación química a menudo genera productos heterogéneos que pueden suponer un deterioro en la función de la proteína marcada. Por ello en este trabajo se optó por una biotilación metabólica empleando la enzima biotina ligasa de *E. coli*, que es muy eficaz uniendo covalentemente biotina el péptido aceptor AviTag (Gautier y Hinner, 2015)

Por otra parte, la elección del epítipo de tipo FLAG se basó en el uso extendido de este tipo de etiquetas o *tags* en diversas técnicas de purificación (Zhao Xinyu, Li Guoshun, 2013). Se trata de un octapéptido de naturaleza hidrofílica, especialmente eficaz para aislar proteínas de fusión (Hopp *et al.*, 1988). Su carácter hidrofílico hace que se localice en la superficie de la proteína, es decir, hacia el exterior, volviéndolo más accesible a los anticuerpos. FLAG se une a varios anticuerpos monoclonales específicos, entre los que se encuentra el anti-FLAG M2, utilizado en este trabajo, que puede reconocer el epítipo independientemente de la posición de éste (Einhauer y Jungbauer, 2001). A pesar de su reducido tamaño, la presencia de FLAG puede interferir en la función y propiedades de la proteína a la que se acopla. Por ello, este trabajo se comenzó probando una primera construcción quimérica con una variante de siete aminoácidos que se denominó F7', lo cual se realizó en otros trabajos (Golding *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2010).

Se llevó cabo una cotransfección de la línea celular mencionada con dos vectores, uno con la construcción quimérica y otro con la secuencia codificante para BirA. Esta primera cotransfección se desarrolló con éxito, pero en el paso final de detección solo se obtuvieron resultados positivos en el método directo, es decir, se detectó la presencia de proteína biotilada pero no del epítipo mediante el ELISA indirecto.

Con el fin de conseguir resultados positivos para ambos métodos de detección, se diseñó una segunda construcción quimérica, acoplando esta vez el epítipo FLAG en su extremo N-

terminal, y se repitió de nuevo el ensayo de expresión. La transfección en este caso resultó menos eficaz que la primera. Se produjo una elevada tasa de muerte celular, apreciable por un elevado número de células no adheridas a la placa. Esto pudo deberse a la alteración de las condiciones durante el proceso, por ejemplo un cambio brusco de temperatura, suponiendo un estrés que comprometió la viabilidad celular. Nuevamente se obtuvieron resultados positivos para el método directo, si bien en esta ocasión los valores de absorbancia fueron más bajos con respecto al primer ensayo, es decir, se detectó proteína biotinilada pero en menor medida. Estos resultados concuerdan con lo esperado, el reducido número de células vivas tras la segunda cotransfección se tradujo del mismo modo en bajos niveles de expresión y por tanto una menor cantidad de proteína secretada al medio. Los resultados obtenidos del ELISA indirecto fueron negativos. Como se comentó anteriormente, ambos epítomos son de naturaleza hidrofílica y al menos FLAG presenta especificidad por el anticuerpo primario empleado, luego la justificación de los resultados negativos ha de ser otra. Teniendo en cuenta el fracaso parcial de la segunda cotransfección, sería necesario repetir dicha prueba para comprobar de nuevo la presencia de FLAG. En caso de detectarse, los resultados negativos del primer ensayo serían debidos a una falta de especificidad del anticuerpo M2 por la variante F7' testada. Por el contrario, si se obtuviesen resultados negativos, éstos podrían deberse a una falta de optimización de la prueba, o a un fallo en la interacción entre el anticuerpo primario y el secundario empleados. Sería necesario entonces repetir el ELISA con ambas construcciones quiméricas, probando distintas condiciones, reactivos o las cantidades empleadas de los mismos.

6. Conclusiones

Las conclusiones que pueden derivarse de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este Trabajo De Fin de Grado son las siguientes:

- ✚ Generación exitosa de una construcción genética quimérica recombinante de la región extracelular de la proteína VISTA o PD-1H, así como su expresión y biotinilación transitorias en células de la línea HEK-293T.
- ✚ Detección de la presencia de proteína biotinilada en el medio celular, lo que indica que la proteína de fusión es de carácter soluble y por tanto capaz de secretarse. En resumen, destacar que el uso de esta herramienta molecular resultará útil para la identificación del receptor de VISTA, utilizando técnicas de purificación basadas en la interacción biotina-estreptavidina.

7. Referencias

- Aloia, L., Parisi, S., Fusco, L., Pastore, L. y Russo, T. (2010) "Differentiation of embryonic stem cells 1 (Diel1) is a component of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) signaling pathway required for proper differentiation of mouse embryonic stem cells", *Journal of biological chemistry*, 285(10), pp. 7776-7783.
- Bharaj, P., Chahar, H. S., Alozie, O. K., Rodarte, L., Bansal, A., Goepfert, P. A., Dwivedi, A., Manjunath, N. y Shankar, P. (2014) "Characterization of programmed death-1 homologue-1 (PD-1H) expression and function in normal and HIV infected individuals", *Public library of science one*, 9(10), pp. 1-10.
- Bretscher, P. y Cohn, M. (1970) "A theory of self-nonself discrimination.", *Science*, 169(3950), pp. 1042-1049.
- Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G. y Golstein, P. (1987) "A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4", *Nature*, 328(6127), pp. 267-270. doi:10.1038/328267a0.
- Ceeraz, S., Nowak, E. C. y Noelle, R. J. (2013) "B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease", *Trends in immunology*, 34(11), pp. 1-15.
- Chen, L. y Flies, D. B. (2008) "Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition", 23(1), pp. 1-7. doi:10.1038/jid.2014.371.
- Connell, O., Ceeraz, S., Suriawinata, A. A., Yan, S. y Ernstoff, M. S. (2014) "VISTA is an immune checkpoint molecule for human T cells", 74(7), pp. 1924-1932. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1504.VISTA.
- Corpet, F. (1988) "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering.", *Nucleic acids research*, 16(22), pp. 10881-90. doi:10.1093/nar/16.22.10881.
- Cunningham, A. J. y Lafferty, K. J. (1977) "A Simple, Conservative Explanation of the H-2 Restriction of Interactions Between Lymphocytes", *Scandinavian Journal of Immunology*, 6(1-2), pp. 1-6. doi:10.1111/j.1365-3083.1977.tb00317.x.
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H. y Calos, M. P. (1987) "Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system.", *Molecular and cellular biology*, 7(1), pp. 379-87. doi:10.1128/MCB.7.1.379.
- Einhauer, A. y Jungbauer, A. (2001) "The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49(1-3), pp. 455-465. doi:10.1016/S0165-022X(01)00213-5.
- Esenten, J. H., A. Helou, Y., Chopra, G., Weiss, A. y Bluestone, J. A. (2016) "CD28 costimulation: from mechanism to therapy", *Immunity*, 44(5), pp. 973-988. doi:10.1021/acs.nano.5b07425.Molecular.
- Flies, D. B., Han, X., Higuchi, T., Zheng, L., Sun, J., Ye, J. J. y Chen, L. (2014) "Coinhibitory receptor PD-1H preferentially suppresses CD4+ T cell-mediated immunity", *Journal of Clinical Investigation*, 124(5), pp. 1966-1975. doi:10.1172/JCI74589.
- Flies, D. B., Wang, S., Xu, H. y Chen, L. (2011) "Cutting Edge: A Monoclonal Antibody Specific for the Programmed Death-1 Homolog Prevents Graft-versus-Host Disease in Mouse Models", *The Journal of Immunology*, 187(4), pp. 1537-1541. doi:10.4049/jimmunol.1100660.
- Furman, D. y Davis, M. M. (2015) "New approaches to understanding the immune response to vaccination and infection", *Vaccine*. Elsevier Ltd, 33(40), pp. 5271-5281. doi:10.1016/j.vaccine.2015.06.117.
- Gautier, A. y Hinner, M. J. (2015) "Site-specific protein labeling: methods and protocols", *Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols*, (4), pp. 1-267. doi:10.1007/978-1-4939-2272-7.
- Golding, B., Brom, S., Romero, D., Davila, G., Weichenhan, D., Zhao, B., Geel, M. Van, Flores, M., Palacios, R., Cevallos, M. A., Pardo, M. A. y Quinto, C. (2002) "Minimal FLAG sequence useful in the functional epitope tagging of H-Ras", 32(6).
- Graham, F. y Smiley, J. (1977) "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5", *Journal general virology*, 36(2977), pp. 59-74.
- Greenwald, R. J., Freeman, G. J. y Sharpe, A. H. (2005) "The B7 Family Revisited", *Annual Review of Immunology*, 23(1), pp. 515-548. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611.
- Hanahan, D. (1983) "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids", *Journal of Molecular*

Biology, 166(4), pp. 557-580. doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8.

Hansen, J. A., Martin, P. J. y Nowinski, R. C. (1980) "Monoclonal antibodies identifying a novel T-Cell antigen and Ia antigens of human lymphocytes", *Immunogenetics*, 10(1-4), pp. 247-260. doi:10.1007/BF01561573.

Hopp, T. P., Prickett, K. S., Price, V. L., Libby, R. T., March, C. J., Pat Cerretti, D., Urdal, D. L. y Conlon, P. J. (1988) "A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification", *Bio/Technology*, 6(10), pp. 1204-1210. doi:10.1038/nbt1088-1204.

Juan, A. H., Wang, S., Ko, K. D., Zare, H., Tsai, P., Feng, X., Vivanco, K. O., Ascoli, A. M., Gutierrez-cruz, G., Krebs, J., Sidoli, S., Knight, A. L., Pedersen, R. A. y Benjamin, A. (2015) "Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53", 17(5), pp. 1369-1382. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.087.Roles.

Jung, K. y Choi, I. (2013) "Emerging Co-signaling Networks in T Cell Immune Regulation.", *Immune network*, 13(5), pp. 184-193. doi:10.4110/in.2013.13.5.184.

Kim, F. J., Kovalyshyn, I., Burgman, M., Neilan, C., Chien, C.-C. y Pasternak, G. W. (2010) "1 Receptor Modulation of G-Protein-Coupled Receptor Signaling: Potentiation of Opioid Transduction Independent from Receptor Binding", *Molecular Pharmacology*, 77(4), pp. 695-703. doi:10.1124/mol.109.057083.

Kinnear, G., Jones, N. D. y Wood, K. J. (2013) "Costimulation blockade : Current perspectives and implications for therapy", 95(4), pp. 527-535. doi:10.1097/TP.0b013e31826d4672.Costimulation.

Koenderman, L., Buurman, W. y Daha, M. R. (2014) "The innate immune response", *Immunology Letters*. Elsevier B.V., 162(2), pp. 95-102. doi:10.1016/j.imlet.2014.10.010.

Lafferty, K. J. y Cunningham, A. J. (1975) "A new analysis of allogeneic interactions.", *The Australian journal of experimental biology and medical science*, 53(1), pp. 27-42. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/238498> (Accedido: 18 de junio de 2017).

Li, N., Xu, W., Yuan, Y., Ayithan, N., Imai, Y., Wu, X., Miller, H., Olson, M., Feng, Y., Huang, Y. H., Jo Turk, M., Hwang, S. T., Malarkannan, S. y Wang, L. (2017) "Immune-checkpoint protein VISTA critically regulates the IL-23/IL-17 inflammatory axis.", *Scientific reports*, 7(1), p. 1485. doi:10.1038/s41598-017-01411-1.

Lin, Y.-C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., Reumers, J., Moisse, M., Plaisance, S., Drmanac, R., Chen, J., Speleman, F., Lambrechts, D., Van de Peer, Y., Tavernier, J. y Callewaert, N. (2014) "Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations", *Nature Communications*, 5(11), p. 4767. doi:10.1038/ncomms5767.

Liu, J., Yuan, Y., Chen, W., Putra, J., Suriawinata, A. A., Schenk, A. D., Miller, H. E., Guleria, I., Barth, R. J., Huang, Y. H. y Wang, L. (2015) "Immune-checkpoint proteins VISTA and PD-1 nonredundantly regulate murine T-cell responses", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(21), pp. 6682-6687. doi:10.1073/pnas.1420370112.

Martin Flajnik and Masanori Kasahara (2010) "Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures", *Nat Rev Genet*, 11(1), pp. 47-59. doi:10.1038/nrg2703.Origin.

Mullis, K. B. (1990) "The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction", (April).

Noelle, R. J. y Wang, L. (2014) "Immunity", 74(7), pp. 1933-1944. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1506.VISTA.

Nowak, E. C., Lines, J. L., Varn, F. S., Deng, J., Sarde, A., Mabaera, R., Kuta, A., Le Mercier, I., Cheng, C. y Noelle, R. J. (2017) "Immunoregulatory functions of VISTA", *Immunological Reviews*, 276(1), pp. 66-79. doi:10.1111/imr.12525.

Pardoll, D. M. (2012) "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy", *Nature Reviews Cancer*, 12(4), pp. 252-264. doi:10.1038/nrc3239.

Parijs, L. Van y Abbas, A. K. (1998) "Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off", 280, pp. 243-248.

Rio, D., Clark, S. y Tjian, R. (1985) "A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction", *Science*, 227(4682), pp. 23-28. doi:10.1126/science.2981116.

Saito, T., Yokosuka, T. y Hashimoto-Tane, A. (2010) "Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters", *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 584(24),

pp. 4865-4871. doi:10.1016/j.febslet.2010.11.036.

Sakr, M. A., Takino, T., Domoto, T., Nakano, H., Wong, R. W., Sasaki, M., Nakanuma, Y. y Sato, H. (2010) "GI24 enhances tumor invasiveness by regulating cell surface membrane-type 1 matrix metalloproteinase", *Cancer Science*, 101(11), pp. 2368-2374. doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01675.x.

Schildberg, F. A., Klein, S. R., Freeman, G. J. y Sharpe, A. H. (2016) "Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family", *Immunity*, 44(5), pp. 955-972. doi:10.1016/j.immuni.2016.05.002.

Schreiber, R. D., Old, L. J. y Smyth, M. J. (2011) "Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion", *Science*, 331(6024), pp. 1565-1570. doi:10.1126/science.1203486.

Strober, W. (2001) "Monitoring cell growth.", *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]*, Appendix 3, p. Appendix 3A. doi:10.1002/0471142735.ima03as21.

Wang, J., Wu, G., Manick, B., Hernandez, V., Renelt, M., Bi, M., Li, J., R, V. K., Systems, D. y Ne, M. P. (2016) "VSIG-3 / IGSF11 is a Ligand of VISTA / PD-1H and Inhibits Human T Cell Function", (2005), p. 55413.

Wang, L., Le Mercier, I., Putra, J., Chen, W., Liu, J., Schenk, A. D., Nowak, E. C., Suriawinata, A. A., Li, J. y Noelle, R. J. (2014) "Disruption of the immune-checkpoint VISTA gene imparts a proinflammatory phenotype with predisposition to the development of autoimmunity", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(41), pp. 14846-14851. doi:10.1073/pnas.1407447111.

Wang, L., Rubinstein, R., Lines, J. L., Wasiuk, A., Ahonen, C., Guo, Y., Lu, L.-F., Gondek, D., Wang, Y., Fava, R. A., Fiser, A., Almo, S. y Noelle, R. J. (2011) "VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses", *The Journal of Experimental Medicine*, 208(3), pp. 577-592. doi:10.1084/jem.20100619.

Ward-Kavanagh, L. K., Lin, W. W., Šedý, J. R. y Ware, C. F. (2016) "The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses", *Immunity*, 44(5), pp. 1005-1019. doi:10.1016/j.immuni.2016.04.019.

Wu, A. A., Drake, V., Huang, H.-S., Chiu, S. y Zheng, L. (2015) "Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells", *Oncology*, 4(7), p. e1016700. doi:10.1080/2162402X.2015.1016700.

Zhang, Q. y Vignali, D. A. A. (2016) "Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity", *Immunity*. Elsevier Inc., 44(5), pp. 1034-1051. doi:10.1016/j.immuni.2016.04.017.

Zhao Xinyu, Li Guoshun, L. S. (2013) "Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification", *Journal of analytical methods in chemistry*, 2013(Table 1), p. 18.

ANEXO 1: PCR

Anexo 1.1. Superior. Reactivos utilizados en función del tipo de PCR, detallando los volúmenes por unidad de reacción y la casa comercial de procedencia. **Centro.** Construcciones (vectores), cebadores empleados, secuencia nucleotídica de los mismos (sintetizada por la casa comercial Sigma) y T^a de hibridación o *annealing*. En negrita y subrayado se resaltan las dianas de restricción, en morado los codones de *STOP* y en naranja el triplete que codifica para el último aminoácido del epítipo FLAG. **Inferior.** Parámetros (tiempo y temperatura) de la PCR en función de la fase (desnaturalización inicial; ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión; extensión final) y de los cebadores empleados.

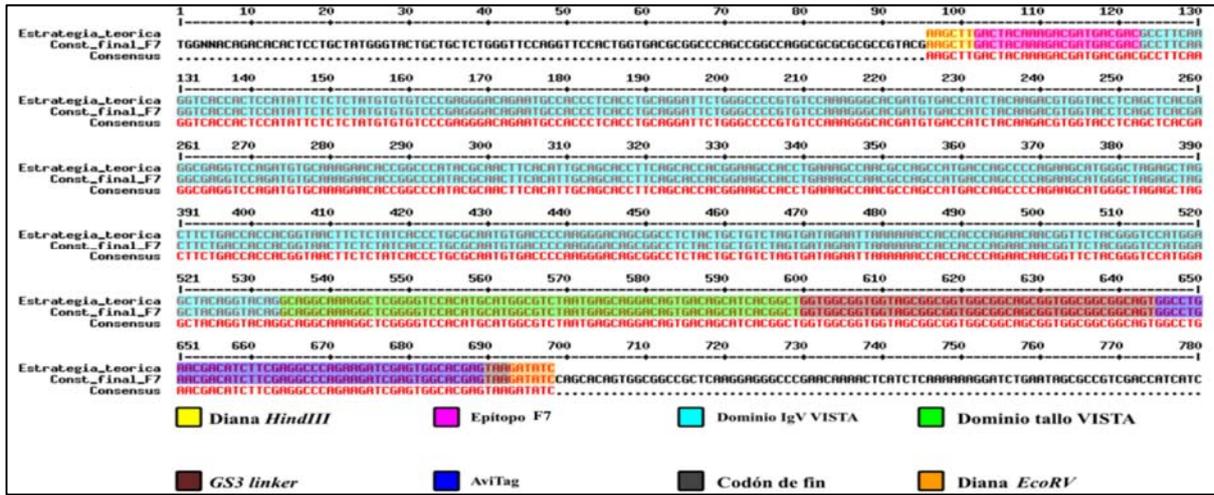
Reactivos	Unidad de reacción (μL)		Casa comercial		
	PCR Taq polimerasa	PCR Taq proof Reading <i>Pfu</i>			
Taq Buffer Regular (10X)	2,5	-	Biotools		
Taq Buffer <i>Pfu</i> (10X)	-	2,5			
dNTPs mix (25 mM)	0,25		GeneOne		
Cebador 5'-3' (10 μM)	0,5 (5 pmoles)		Sigma		
Cebador 3'-5' (10 μM)	0,5 (5 pmoles)				
Taq polimerasa (5 U/μL)	0,125	-	Biotools		
Proof Reading Taq polimerasa <i>Pfu</i> (2,5 U/μL)	-	0,25	Thermo Fisher Scientific		
ADN molde (50-100 ng)	2		-		
Agua de PCR (libre de nucleasas)	Hasta completar un volumen final de 25 μL		Braun Medical		
Construcción	Cebador	Secuencia nucleotídica (5'-3')	T ^a de <i>annealing</i>		
Mouse VISTA (PD-1H) template-VISTA	pIB-313F	AATAAGA <u>AAGCTT</u> GACTACAAAGACGATGACG ACGCCTTCAAGGTCACCACTCCATAT	67,4°C		
	pIB-313F <i>new</i>	AATAAGA <u>AAGCTT</u> GACTACAAAGACGATGACG ACA <u>AAG</u> GCCTTCAAGGTCACCACTCCATAT	67,8°C		
	pIB-313RC	GACAGCATCACGGCTGGTGGCGGTGGTAGCGG CGGTGGCGGCAGCGGTGGCGGCGGCAGTGGCC TGAACGACATCTTCGAGGCCAGAAAGATCGAG TGGCACGAG <u>TAAGATAT</u> CATCTAC	80,9°C		
pJET1.2/blunt-VISTA	pJET1.2F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	74°C		
	pJET1.2RC	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	68°C		
pSecTag2/Hygro B-VISTA	pIB-313F	AATAAGA <u>AAGCTT</u> GACTACAAAGACGATGACG ACGCCTTCAAGGTCACCACTCCATAT	67,4°C		
	pIB-313F <i>new</i>	AATAAGA <u>AAGCTT</u> GACTACAAAGACGATGACG ACA <u>AAG</u> GCCTTCAAGGTCACCACTCCATAT	67,8°C		
	pIB-313RC	GACAGCATCACGGCTGGTGGCGGTGGTAGCGG CGGTGGCGGCAGCGGTGGCGGCGGCAGTGGCC TGAACGACATCTTCGAGGCCAGAAAGATCGAG TGGCACGAG <u>TAAGATAT</u> CATCTAC	80,9°C		
Primers	Parámetros de PCR				
	Desnat.	Ciclos (x30)			Extensión final
Desnat.		Hibridación	Extensión		
pIB-313F/pIB-313RC	95°C, 1'	95°C, 20''	62°C, 20''	72°C, 1'	72°C, 3'
pIB-313F <i>new</i> /pIB-313RC			63°C, 20''		
pJET1.2F/pJET1.2RC					

ANEXO 2: Métodos de detección de proteína

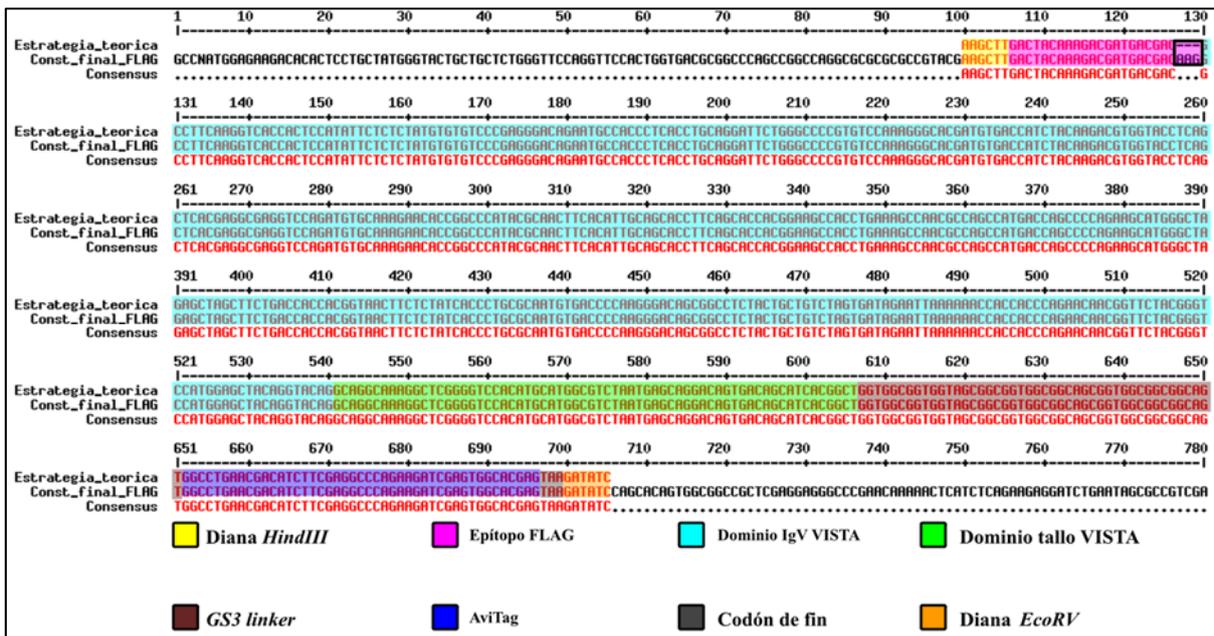
Tabla 2.1. Superior. Protocolos de detección de proteína. En verde se resaltan los pasos a seguir para el método directo, y en naranja los pasos del ELISA indirecto. El resto de pasos son comunes a ambos ensayos. **Inferior.** Reactivos empleados en los protocolos y composición.

Detección directa	ELISA indirecto
1. Añadir en la primera columna 150 µL de las soluciones a testar sin diluir (1:1), y 100 µL de PBS en el resto de columnas que se deseen utilizar (en este caso las cinco siguientes).	1. Añadir en la primera columna y en la séptima 150 µL de las soluciones a testar sin diluir (1:1), y 100 µL de PBS en el resto de columnas que se deseen utilizar (en este caso las cinco siguientes).
2. Diluciones 1:3 de las muestras: tomar 50 µL de las columnas sin diluir y mezclar por pipeteo con el contenido de la siguiente. Repetir esto de forma encadenada con todas las columnas excepto con la última, que se utiliza como blanco y solo tiene PBS (los 50 µL tomados de la penúltima columna se descartan).	
3. Cubrir la placa con parafilm e incubar durante una hora a 37°C.	
4. Bloqueo con PBS 1X-BSA 1%, añadiendo 250 µL/pocillo. Cubrir la placa con parafilm y guardar en la nevera a 4°C durante 24 horas.	
5. Retirado de la solución de bloqueo y secado de la placa (para secar, se coloca invertida y se dan toques sobre papel absorbente).	
6. Añadir 50 µL/pocillo solución de estreptavidina-peroxidasa (HRP) diluida 1:5000 en PBS al 1X. Incubar 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.	6. Añadir el anticuerpo primario (Anticuerpo monoclonal ANTI-FLAG BioM2 clon M2 murino (Sigma, N°: F9291)), empleando diluciones en PBS 1X-Tween 0,05% 1:2000 y 1:5000, 50 µL/pocillo.
7. Retirar la estreptavidina y secar la placa.	7. Incubar 1 hora a 37°C y lavar 3 veces con PBS 1X-Tween 0,05% (200 µL/pocillo), secando después de cada uno.
8. Realizar tres lavados con PBS 1X-Tween 0,05%, añadiendo 200 µL/pocillo. Secar tras cada lavado.	8. Añadir el anticuerpo secundario (IgG2a cabra anti-ratón-HRPO (Nordic Immunology, Tilburg, Holanda)), repitiendo el paso anterior.
9. Añadir 100 µL/pocillo de solución de revelado de la reacción. Incubación en oscuridad a temperatura durante 10-30 minutos o hasta que empiece a observarse coloración azulada en la última columna (la anterior al blanco).	
10. Parar la reacción con solución de H ₂ SO ₄ añadiendo 50 µL/pocillo (se produce un viraje rápido del azul al amarillo).	
Reactivos	Composición
Solución 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 PBS 10X de Gibco), hasta volumen final de 0,5 L.
Solución estreptavidina-HRP 1:5000	Estreptavidina-HRP de alta sensibilidad (BD Biosciences) diluida en PBS-1X.
PBS 1X-Tween 0,05% (1 L)	0,5 mL Tween 20 (Sigma).
	PBS 1X hasta un volumen final de 1 L.
Solución reveladora (5 mL)	25 µL de solución sustrato TMB (Thermo Fisher Scientific).
	1 µL de agua oxigenada.
	Acetato sódico hasta volumen final de 5 mL.

ANEXO 3: Alineamientos



Anexo 3.1. Alineamiento de la secuencia nucleotídica F7-mVISTA-AviTag teórica (**superior**) con la correspondiente al inserto integrado en la construcción final pSecTag2/Hygro B- F7-mVISTA-AviTag (**inferior**), realizado con el software online MultAlin (Corpet, 1988). En rojo se resaltan las bases que presentan identidad.



Anexo 3.2. Alineamiento de la secuencia nucleotídica FLAG-mVISTA-AviTag teórica (**superior**) con la correspondiente al inserto integrado en la construcción final pSecTag2/Hygro B-FLAG-mVISTA-AviTag (**inferior**), realizado con el software online MultAlin (Corpet, 1988). En rojo se resaltan las bases que presentan identidad. El único triplete que no alinea aparece recuadrado y se corresponde con las últimas bases