

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**SECRECIÓN DE DOMINIOS EXTRACELULARES DE PROTEÍNAS
ASOCIADAS A CÁNCER, EN *E. COLI* BL21 Y EN CÉLULAS HEK293FT**

**POR:
ERNESTO E. MORÁN O. 8-897-533**

Trabajo de graduación sometido a consideración por la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, como requisito parcial para optar por el título de Licenciado en Biología con especialización en Microbiología y Parasitología

**PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ
2019**

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

**“SECRECIÓN DE DOMINIOS EXTRACELULARES DE PROTEÍNAS
ASOCIADAS A CÁNCER, EN *E. COLI* BL21 Y EN CÉLULAS HEK293FT”**

Por:

Ernesto E. Morán O. _____

8-897-533

Asesor: Dr. Gerald Moncayo _____

Jurado: Dr. Alex Martínez _____

Mgtr. Humberto Cornejo _____

Dedicatorias y Agradecimientos

Este trabajo esta dedicado a Dios por haberme brindado la capacidad y sabiduría, así como la voluntad de cumplir las metas que he diseñado para mí. A mi padre Vidal Morán, quien ha sido un ejemplo para mí, quien con sus escasos y limitados recursos me ha mostrado que la felicidad no está apegado a lo material, y que las metas se logran a base de esfuerzo y dedicación por muy difícil que estén las circunstancias. A todos los capireños en especial a mi familia y a mis vecinos de Ollas Arriba, quienes me motivan a continuar esforzándome en educarme y así, salir de la pobreza. Y en especial a mi madre DINORA ORTEGA a quien Dios la tenga en su Gloria, por formar parte de mi carácter, a pesar de tantas enfermedades que acabaron con su vida, me transmitió mucha perseverancia, valentía y responsabilidad.

Ernesto Morán

Agradezco a Dios por haberme acompañado todos los días de mi vida y haberme dado la fuerza, sabiduría y dominio propio para culminar de manera favorable este trabajo. Al Dr. Gerald Moncayo, por brindarme sus conocimientos y destrezas, y también, por haber aceptado ser el director de este trabajo de graduación, y por haberme ayudado a realizar esta investigación científica a un nivel más elevado, de lo que se hace a nivel de Licenciatura. Al Dr. David Cárdenas quien me brindó su tiempo en la elaboración de metodologías en diversas ocasiones. A mis asesores de la Universidad de Panamá: los Profesores Dr. Alex O. Martínez Torres y Mgter. Humberto Cornejo, quienes me brindaron la ayuda y la paciencia, así como sus conocimientos en la revisión de la escritura de este trabajo. A la SENACYT, por haberme brindado los fondos necesarios para ejecutar este trabajo a través de la Convocatoria de Nuevos Investigadores. Al INDICASAT AIP, por haberme permitido utilizar las instalaciones y equipos de laboratorio. A la Fundación Benéfica DEVEAUX, por haberme brindado apoyo económico a lo largo de este proyecto. A mi padre Vidal Morán quien con humildad y sencillez, me brindó su apoyo incondicional a lo largo de la licenciatura. A mi madre Dinora Ortega que en paz descanse (QEPD), quien ha sido una de mis mayores inspiraciones para continuar superándome. Y A todos los que desinteresadamente y sin reproches, aportaron a que este trabajo de graduación fuera posible.

Mis más sinceros agradecimientos.

Índice

Dedicatorias y Agradecimientos.....	2
indice.....	5
resumen	7
abstrac	9
introducción	11
Capítulo I.....	14
Revisión Bibliográfica.....	15
Objetivos.....	40
Objetivo General	40
Objetivos específicos.....	40
Capítulo II	41
Metodología.....	55
Metodología Experimental	55-69
Capitulo III.....	70
Resultados	70-83
Capitulo IV.....	84
85discusión.....	83-
87	
Capitulo V	88
Conclusiones.....	89
Recomendaciones.....	92
Referencias Bibliográficas	92
Anexos.....	108-127

Índice de Tablas

Tabla 1. Reactivos y cantidades necesarias para un volumen de 50.0 μ l, en la amplificación de los dominios extracelulares de los receptores.....	45
Tabla 2. Protocolo de las temperaturas y tiempos utilizados en el termociclador para la amplificación de los dominios extracelulares de los receptores.....	46
Tabla 3. Protocolo de las cantidades a utilizar de enzima para de los sitios de restricción enzimática tabulado por INVITROGEN.....	47
Tabla 4. Sitios de restricción enzimática de cada secuencia de genes y la de los plásmidos.....	48
Tabla 5. Reactivos y cantidades necesarias para una de PCR de verificación de clonaje de un volumen de 10.0 μ l.....	50
Tabla 6. Protocolo ejecutado en el termociclador para la verificación del clonaje.....	50
Tabla 7. Reactivos y cantidades necesarias para una de PCR de verificación de clonaje en muestras de miniprep, PCR con un volumen de 10.0 μ l.....	51
Tabla 8. Protocolo ejecutado en el termociclador para la verificación del clonaje en los productos de la miniprep.....	51
Tabla 9. Diseños de los cebadores específicos de los dominios extracelulares de los receptores.....	87
Tabla 10. Cálculos de los tiempos de elongación de los dominios extracelulares de los receptores.....	93

Índice de Ilustraciones

Figura 1. residuos del receptor de señalización de membrana: glicoproteínas que permiten la interacción de determinadas sustancias con los mecanismos del metabolismo celular, su activación mediante un estímulo externo provoca una cascada interna de reacciones enzimáticas que facilita la adaptación de la célula a su entorno, por mediación de mensajeros secundarios (Viralkumar Davra, 2016)..... 22

Figura .2. **A)** Estructuras de los dominios y estructuras cuaternarias del receptor AXL, **B).** Isoformas referenciados de residuos de AXL, en humanos, en donde solo codifican para proteínas 5 isoformas. **C)** 19 exones unidos a intrones más el UTR terminal 5 los cuales serán madurados y los intrones saldrán y solo quedará el mRNA. **D)** Estructuras de los dominios sectorizados de cada parte del receptor AXL.....23

Figura 3. **A)** 5 isoformas de los residuos de las proteínas en donde 2 codifican para la proteína en el tamaño esperado. **B)** Estructura morfológica de MERTK, **C)** posición del receptor MERTK en el genoma del ser humano. **D)** 19 exones los cuales abarcan a los 999 residuos de aminoácidos que codificarán la proteína MERTK.....25

Figura 4. Dominios detallados del receptor MERTK **A).** Superfamilias y dominios. **B)** Dominios inteligentes, **C)** Dominios para transmitir respuestas **D)** Genes y todas las secuencias SPNy sus variantes.....26

Figura 5. Exones codificantes para la síntesis de las proteínas, **A).** Isoformas descritas para utilizar esta proteína en ensayos. **B).** estructura molecular del receptor CD32, con sus dominios y sus interacciones. **C)** exón de ORF de CD32, unidos a los UTR 5' no codificantes de ninguna proteína, e presenta el ARNm inmaduro de CD32.....27

Figura 6. **A)** Estructura molecular del receptor extracelular CLEC5A, con sus dominios de glicosilación y puentes de disulfuro. **B)** Isoformas de CLEC5A, en donde solo 3 de las formas reportadas son codificantes. **C)** Receptor CLEC5A en el cromosoma 7 en la posición q34.....28

Figura 7. **A)** posición del receptor en cromosoma 12, **B)** 11 isoformas reportadas para este receptor, las cuales solo hay 6 codificantes, tal vez algunas fueron reportadas en otras especies, **C)** Pequeño UTR terminal 5' y 3' unido a los exones que serán madurados y los intrones serán eliminados, y solo quedará la secuencia codificadora de los 201 residuos.....29

Figura 8. Aminoácidos o residuos de que componen a receptor CLEC7A, en donde quedan secciones que tiene especificidad para la fosforilación (azul) y para la ubiquitilación (naranja).39

Figura 9; Cultivo de las células HEK 293FT observado a través de microscopia de contraste de fases, a baja densidad y luego el alta densidad, estas células se generaron por la transformación de fibroblastos, endotelio o epiteliales, todas ellas abundantes en riñón. Estas células son líneas estables para expresión de proteínas. (ATCC, 2016).....32

Figura 10. Construcción y estrategia de clonaje en pQCXIH. **A.** Reconocimiento de los sitios de restricción de cada enzima endonucleasa, **B.** Digestión enzimática de los plásmidos con las enzimas de digestión, y digestión enzimática de los productos de PCR con las mismas enzimas de restricción, **C.** Ligación de los plásmidos con las secuencias de genes amplificadas en PCR mediado por catálisis enzimática.33

Figura 11. Estrategias de clonaje en bacterias, utilizando el vector pET-30a, al cual se le generaron nuevos sitios de restricción, unidos al promotor de lactosa. Y se subclonó para lograr la construcción del vector de expresión.....33

Figura 12. Estructura del vector pQCXIH, el cual consta de origen de replicación, sitios de clivaje para enzimas, sitios de proteínas fluorescentes o detectable a anticuerpos y marcador de selección en células eucariota (Alvarez, 2010).....35

Figura 13. Estructura del vector pGEX4T1, el cual consta de origen de replicación, sitios de clivaje para enzimas de restricción, marcadores a antibiótico ampicilina, promotor, sitio de unión a ribosomas, sitio de terminación de la transcripción, sitios de proteínas fluorescentes o detectable a anticuerpos y marcador de selección en células procariota (Alvarez, 2010).....36

Figura 14. Mapa del vector pET-30a (+), el cual consta de 5422 pares de bases, tiene resistencia a Kanamicina, tiene promotor T7, y la zona múltiple de clonaje. Puede ser secuenciado con cebadores que hagan hibridación en las regiones internas específicas.....37

Figura 15. Sistema de expresión para proteínas recombinantes utilizando como hospedador E.coli BL21 (DE3) y como vector de expresión pGEX4T1 A la izquierda de la figura es posible apreciar la inducción por IPTG de la transcripción de T7 RNA polimerasa, la cual una vez expresada transcribe el gen de la proteína recombinante CD32, AXL, CLEC7A, CLEC5A y MERTK, bajo la inducción del mismo compuesto, IPTG.....42

Figura 16. Proceso de expresión heteróloga de proteínas recombinantes, en E.coli como hospedero y plataforma de expresión.42

Figura 17. Sistema de transfección por medios biológicos, en este caso es transfección por lentivirus, esta transfección tiene un amplio rango de infección a las células en división y tiene una alta eficiencia de transfección (Alvarez, 2017).43

Figura 18. Esquema de los principios de western blot, basados en la detección de proteínas presentes en una muestra, esta técnica tiene alta sensibilidad para brindar informaciones de interacciones, expresiones y silenciamientos de proteínas, etc.....44

Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa, en donde se muestra la restricción enzimática del plásmido pQCXIX, utilizando 2 combinaciones de dianas de restricción, para lograr abrir el plásmido de expresión.....71

Figura 20. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de los receptores extracelulares para ser ligados al plásmido pQCXIX y lograr los clonajes.....72.

Figura 21. Resultados de electroforesis. A). Verificación de las ligaciones del plásmido abierto con los receptores amplificados través de electroforesis en agarosa, comparados al plásmido vacío. B). verificación de los clonajes realizados, luego de una extracción plasmídica.....73

Figura 22. Resultados de la evaluación por restricción enzimática del clonaje, de los receptores AXL y CLEC7A al plásmido pQCXIX.....74

Figura 23. Verificación de transfección de las células HEK293FT en microscopia de fluorescencia. HEK293FT con el vector pQCXIH ligado al dominio extracelular de CD32. HEK293 expresando el dominio extracelular de AXL, CLEC7A y CLEC5A. Las células mostraron luego de 3 días de transfección poca intensidad de fluorescencia, y se procedió a realizar lisados de la purificación, en donde se noto la producción de proteínas a baja concentración.....75

Figura 24. Resultados de SDS Page en donde la expresión de los dominios extracelulares en células HEK293T no fue exitosa, ni la purificación, por ende se procedió a cambiar de sistema de expresión en bacterias.....76

Figura 25. Resultados de western blot, en donde se purificó el dominio extracelular de AXL y de CLEC7A, y se confirmó mediante la técnica de western blot, utilizando colas de histidina para culminar la purificación y de forma simultánea, detectar la proteína con su propio anticuerpo (Anti -CLEC7A y Anti-AXL).....77

Figura 26. Resultados de electroforesis en donde el plásmido pGEX4T1 fue digerido con las dianas de restricción BAMH1 y NOT1, y con la combinación de E.cori 1 y Not1, en donde solo pudo ser digerido con BAMH y NOT1.....78

Figura 27. Resultados de electroforesis los cuales muestran las amplificación de las secuencias de los genes de cada dominio extracelular de los receptores, y se construyeron los nuevos clonajes, los cuales fueron evaluador por PCR y digestión enzimática.....79

Figura 28. Resultados de la evaluación por restricción enzimática del clonaje, de los receptores AXL y CLEC7A al plásmido pGEX4T1.....79

Figura 29. Evaluacion de los clonajes de los dominios extracelulares al plásmido pGEX4T1. A). Resultados de la PCR del extracelular de la proteína AXI ligado a pGE4T1 B). Resultados de la PCR de la ligación y clonaje del dominio extracelular de CLEC7A a pGE4T1.....80

Figura 30. Resultados de SDS Page. A). producción y purificación de proteínas recombinantes en la cepa BL21, en donde en un lapso de 4 horas hay una concentracion optima de proteínas. b). Resultados de inmunodeteccion con anticuerpos para identificar proteínas desconocidas, en esta parte de los resultados la elucion final fue sometida a western blot.....81

Figura 31. Resultados de laas proteínas expresadas en la cepa *E.coli* BL21 (DE3). fueron obtenidas en mayor concentración y fueron evaluadas mediante Western Blot. Se purificó el dominio extracelular de AXL y CLEC7A.....82

Índice de Anexo

1. Secuencias de genes de los receptores inmunológicos.....	107
2. Diseño de cebadores específicos para los dominios extracelulares de los receptores.....	116
3. Cálculos y preparaciones de las soluciones empleadas en las metodologías.....	117
3.5 Cálculos de eficiencia de transformación.....	118
3.6 Preparación de medios para transformación bacteriana.....	118
3.7 Preparación de placas de LB con antibióticos.....	119
3.8 Preparación de soluciones concentradas de ampicilina, Kanamicina y Cloranfenicol.....	119
3.9 Preparación de soluciones para western blot.....	119
3.9.1 Solución de separación de proteínas.....	119
3.9.2 solución de transferencia de proteínas.....	119
3.10 Preparación de SDS.....	119
3.11 Preparación de TBST 10X.....	120
3.12 Preparación de azul de comassie.....	120
3.13 Preparación del decolorante de geles.....	120
3.14 Preparación de geles de acrilamida.....	120
3.14.1 Gel separador de proteínas.....	120
3.14.2 Gel concentrador de proteínas.....	120
3.15 Electroforesis.....	121
3.15.1 Cálculos del gel de agarosa.....	121
3.16 Preparación de la PCR.....	122
3.17 Cálculos para los tiempos de elongación de cada fragmento de ADN.....	123
3.18 Cálculos para la PCR de colonias.....	123
3.19 Expresión y Purificación de proteínas recombinantes.....	123
3.19.1 Preparación de IPTG a 100mM.....	124
3.19.2 Preparación de la solución STE.....	127

Resumen

Resumen

En Panamá, el cáncer es la segunda causa más frecuente de defunciones. Entre los cánceres más comunes se encuentran el cáncer de pulmón, uterino, de mama, de colon y próstata. Cáncer no quiere decir muerte, entre más temprano se puede detectar más fácil será eliminado. En la actualidad, existen distintos tratamientos innovadores basados en anticuerpos, que están revolucionando el campo, como los son los de “*checkpoint inhibitor*” utilizados en inmunoterapia oncológica, como otros expresados en las células de cáncer (EGFR, CD22, etc.). En este proyecto, se estableció una plataforma de expresión de proteínas en células humanas y en bacterias, *E.coli* BL21 (DE3) pLysS. Se han seleccionado varias proteínas que están expresadas en cánceres, como también en el sistema inmune. Estas serán utilizadas para estudiar su función en células de cáncer, como también para elaborar nanocuerpos específicos. Se amplificaron las secuencias de genes de las proteínas extracelulares y fueron clonadas en bacterias, y finalmente, se produjo cada dominio extracelular de los receptores (AXL, CD32, CLEC5A y CLEC7A) en bacterias *E.coli* BL21 (DE3) pLysS y en células HEK293FT.

Abstract

Abstract

In Panama, the cancer is the second most frequent cause of death. Among the most common cancers are lung, uterine, breast, colon and prostate cancer. Cancer does not mean death, the earlier it can be detected the easier it is to eliminate it. There are different treatments based on antibodies that are revolutionizing the field, such as those of "checkpoint inhibitor" used in oncological immunotherapy, like others expressed in cancer cells (EGFR, CD22, etc.). In this project, a protein expression platform was established in human cells and bacteria *E.coli* BL21 (DE3) pLysS. We have already selected several proteins that are expressed in cancers as well as in the immune system. These will be used to study their function in cancer cells, as well as to elaborate specific nanobodies. The gene sequences of the extracellular proteins were amplified and were cloned in bacteria and finally, each extracellular domain of the receptors (AXL, CD32, CLEC5A and CLEC7A) was produced in bacteria *E. coli* BL21 (DE3) pLysS and in HEK293FT cells.

Introducción

El Cáncer es una de las principales causas de muerte y se espera que la tasa de mortalidad se incremente en los próximos años (Ryerson *et al.*, 2017). En Panamá, el cáncer es la segunda causa más frecuente de defunciones. Entre los cánceres más comunes se encuentran el cáncer de pulmón, uterino, mama, de colon y próstata (Badalà *et al.*, 2008). El cáncer de colon es la tercera principal causa de muerte por cáncer en las mujeres y el cuarto en los hombres, con 693,600 muertes en todo el mundo en 2012 y por ende, es de suma importancia identificar nuevos blancos de ataque contra el mismo (Zuo *et al.*, 2014). El cáncer no quiere decir muerte, entre más temprano se puede detectar, más fácil es eliminado, ya que debería tener menos mutaciones, menos mecanismos de escape, lo que hace que muchos cánceres sean letales (Badalà *et al.*, 2008). También, en el futuro se utilizará la medicina personalizada (Walther *et al.*, 2015) en que cada tumor se analizará de forma genética, metabolómica y proteómica para identificar qué modificaciones tiene y qué inhibidores o combinaciones podrán ser más efectivas contra estos cánceres (Mesri, 2014). Entre estas terapias revolucionarias esta la inmunoterapia (Fox *et al.*, 2011).

La inmunoterapia anticancerígena se basa en que el cáncer es simplemente otra enfermedad, la cual, debería ser eliminada por el cuerpo (Galluzzi *et al.*, 2014), el problema yace en que el cáncer se disfraza y evita ser reconocido por el sistema inmune (Friedman *et al.*, 2010). Para poder ayudar al sistema inmune a volver a reconocer a los tumores, se pueden usar varios métodos, entre estos están los de usar citoquinas o factores de crecimiento de células inmunes para estimularlas (Mostafa, 2014; Anestakis *et al.*, 2015). También, se pueden inyectar proteínas expresadas por los tumores las cuales actuarán como vacunas para dirigir a las células inmunes en contra de células cancerígenas que expresan estos marcadores (Jones, 2015). Muchas enfermedades se pueden tratar induciendo una inmunidad a corto plazo llamada inmunidad pasiva (Collet *et al.*, 2000), esta se adquiere a través de la infusión de anticuerpos "prefabricados" en forma de suero humano o animal, inmunoglobulina intravenosa o anticuerpos monoclonales en el individuo afectado (Creus *et al.*, 2002). Además de éstos, existen varios ejemplos de tratamientos con anticuerpo monoclonales contra marcadores tumorales expresados en cánceres como el colorrectal, de cabeza y cuello y cáncer de mama (Yanagita *et al.*, 2017), donde estos anticuerpos monoclonales atacan a proteínas específicas de las células cancerosas y señalan a las

células para que el sistema inmunitario pueda reconocerlas y destruirlas, en donde los linfocitos citotóxicos son activados, estos secretan perforinas, las cuales producen agujeros en la membrana celular tumoral o granzimas, las cuales degradan el ADN de la célula maligna (Kang *et al.*, 2015).

Hay varias formas de expresar proteínas. Entre las 2 más comunes son:

1.1.1. La expresión bacteriana.

La expresión bacteriana en *Escherichia coli* (*E. coli*) es la forma más económica y la cual puede producir la mayor cantidad de proteínas por litro de medio de cultivo (Xu *et al.*, 2012), el problema con este tipo de expresión es que carece de proteínas chaperonas para ayudar en el proceso de plegado y no contiene modificaciones secundarias como glicosilación (modificaciones post-traduccionales) (Hunt *et al.*, 2016), donde estas condiciones contribuyen a la inhibición del plegamiento adecuado de proteínas ricas en cisteína, dando lugar a una estructura terciaria incorrecta, y finalmente, inactiva y potencialmente insoluble (Keiski *et al.*, 2010). Estas proteínas por ende, tienen que volver a ser plegadas en tampones específicos. La ventaja de estas proteínas es que cuando se producen anticuerpo, estos pueden ser contra proteínas desnaturalizadas las cuales pueden ser usadas para teñir tejidos en parafina o “western blot” (Gilda *et al.*, 2015).

1.1.2. La expresión en células HEK293T.

Esta expresión es más costosa ya que se tienen que cultivar células en medio de cultivo, al cual se le tiene que añadir suero fetal bovino (SFB) (Yang *et al.*, 2015), pero la ventaja de esta expresión, es que las proteínas están en la forma en que estuviesen en el cuerpo (Sikosek y Chan, 2014), de esta forma deberían poder reconocer las células cancerígenas *in vivo* y podrían tener efectos estimulantes o inhibidores (Kiris *et al.*, 2015) y por ende, se podrían seleccionar anticuerpos estimulantes para estudiar su activación, como también, se podrían seleccionar anticuerpos inhibidores como tratamientos específicos (Galluzzi *et al.*, 2014).

Los anticuerpos humanos son proteínas que envuelven una estructura bioquímica compleja demarcada por la unión de cuatro cadenas proteicas: dos pesadas (CH) y dos ligeras (CL), unidas mediante puentes disulfuro funcionalmente (Urt-Filho *et al.*, 2016). Los anticuerpos se dividen en una fracción que involucra el reconocimiento antigénico, denominada Fab y una fracción cristalizable (Fc) que media funciones efectoras como la citotoxicidad celular y la citotoxicidad que depende del complemento (CD) (Lee *et al.*, 2017; Bona *et al.*, 1999). Una vía alternativa de activación de células inmunes como macrófagos y células NK, es a través del receptor CD16 o FC γ R III, el cual es el receptor de baja afinidad para la región Fc de la IgG (Yanagita *et al.*, 2012). Este mecanismo denominado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) se desarrolla cuando la célula tumoral se recubre de anticuerpo IgG, lo cual permite la unión de las células inmunes a través del CD16 (Büttner y Buttner, 2012).

Para comprobar que los anticuerpos son específicos contra las proteínas, se necesitan controles positivos y negativos (Schie *et al.*, 2015), para esto, se utilizarán las proteínas purificadas, pero también células las cuales sobre expresan los receptores como también células las cuales son negativas para estos receptores (El-Guindy *et al.*, 2014). Estas células positivas pueden ser hechas a través de transfección de un plásmido de expresión (Woodruff y Maerkl, 2016), mientras las células negativas podrán ser hechas a través de silenciamiento con ARNsi o método CRISPR (Richter, Chang, & Fineran, 2012).

Las proteínas que se han seleccionados para ser expresadas son MERTK, AXL, CLEC5A, CLEC7A y CD32, debido a que estas proteínas están asociadas en la proliferación y desarrollo de diferentes tipos de cáncer. La proteína- MERTK recubre el exterior de las células cancerosas de glioma y está involucrada en la resistencia contra tratamientos anticancerígenos (Weier *et al.*, 1999). El otro miembro de los receptores TAM, AXL confiere resistencia a cánceres de colon y próstata (Korshunov *et al.*, 2012). Las proteínas CLEC5A y CLEC7A son receptores de superficie celular expresados en células de glioma que señalan la vía TYROBP. La proteína CD32 es una proteína receptora de superficie la cual es también expresada por células de glioma y es un receptor del fragmento cristalizable de anticuerpo y está involucrado en la resistencia contra tratamientos basados en anticuerpos (Veri *et al.*, 2007).

Capítulo I

Revisión Bibliográfica

1.2. Proteínas para expresión.

1.2.1. La proteína AXL. Es una tirosin quinasa la cual es transductora de señales cuando se une a su ligando y ocurre la dimerización. La sobreexpresión de la AXL se correlaciona con las metástasis e invasiones de un cierto número de tumores, incluyendo el carcinoma de células renales, los glioblastomas y también, los cánceres de mama, pulmón y próstata (Axelrod y Pienta, 2014). La expresión de la AXL aumenta como respuesta a los fármacos quimioterápicos, confiriendo resistencia a estos en los cánceres de estromas gastrointestinales y en la leucemia mieloide aguda. Además, la AXL juega también un papel importante en la transición del cáncer de mama de epitelial a mesenquimatoso, una transición clave para la inducción de metástasis (Wu *et al.*, 2014). Es un receptor tirosina quinasa que puede funcionar como un transductor de señales entre tipos celulares específicos de origen mesodérmico. Interactúa con SKP1. La sobreexpresión en el cultivo de tejidos provoca la transformación oncogénica. Sobreexpresado en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de tiroides, ovario, gástrico, er + de mama y leucemia mieloide aguda, donde se asocia con un pronóstico desfavorable. La señalización de AXL es esencial para VEGF mediando la activación de PI3K/ y migración de las células endoteliales, donde esa AXL también es un mecanismo de resistencia a terapia antiangiogénica (Gay, Balaji, & Byers, 2017). La proteína codificada por este gen, es un miembro de la subfamilia del receptor tirosina quinasa. Aunque es similar a otras tirosina quinasa receptoras, la proteína AXL representa una estructura única de la región extracelular que yuxtapone las repeticiones IgL y FNIII. (Wang *et al.*, 2016) El receptor AXL transduce las señales de la matriz extracelular en el citoplasma mediante la unión de factores de crecimiento como la vitamina K-dependiente de la proteína de crecimiento de detención de genes específicos 6 (GAS6). Además, está implicado en la estimulación de la proliferación celular. Este receptor también puede mediar en la agregación celular por unión homófila. La AXL está implicada en la transición inducida por el regulador de cáncer de mama metástasis del epitelio esencial al mesenquimal y a la supervivencia del paciente (Kanlikilicer *et al.*, 2017). Además, la AXL puede desempeñar un papel importante en la infección por el virus Zika, permitiendo la entrada del virus en las células huésped. Las proteínas AXL de la superficie de las células cancerosas parecen pequeñas cerdas o pelos y tan solo necesitan

recibir las señales bioquímicas de las proteínas GAS6 para entrar en una fase mucho más preocupante de acción. Cuando dos proteínas GAS6 se enlazan con dos AXL y las señales que se generan permiten a las células cancerosas abandonar el lugar original del tumor, migrar hacia otras partes del cuerpo y formar en ellas, nuevos nódulos cancerosos (metástasis)(Happonen., et al 2016). Además, la AXL esta implicado en otros procesos como aclaramiento celular apoptótico, remodelación de vasos sanguíneos, diferenciación y maduración celular (Bansal *et al.*, 2015).

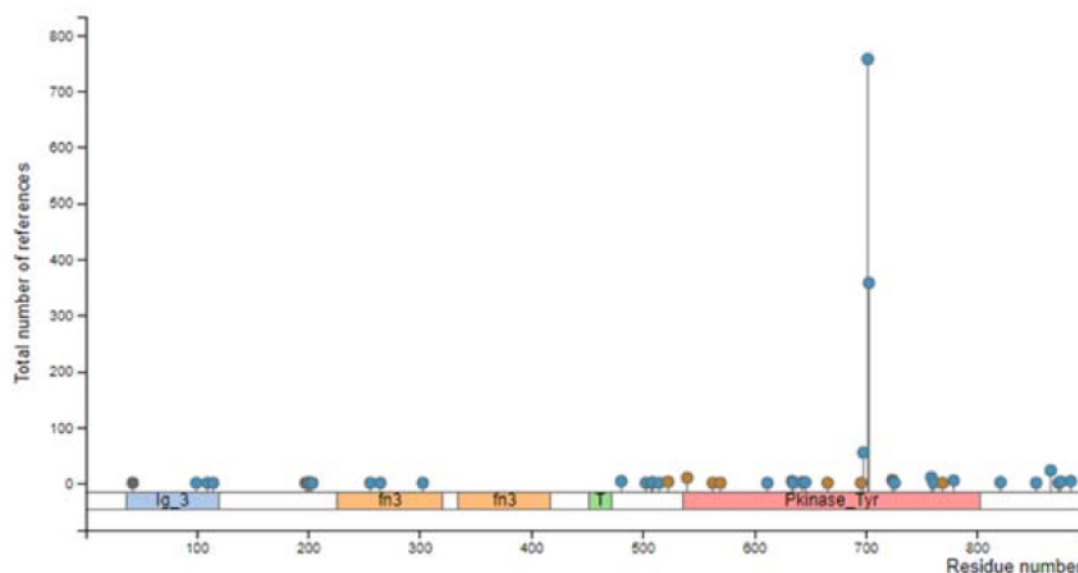


Figura 1. esiduos del receptor de señalización de membrana: glicoproteínas que permiten la interacción de determinadas sustancias con los mecanismos del metabolismo celular, su activación mediante un estímulo externo provoca una cascada interna de reacciones enzimáticas que facilita la adaptación de la célula a su entorno, por mediación de mensajeros secundarios (Viralkumar Davra, 2016). (Figura Modificada por Ernesto Moran (2019), tomada de www.ensembl.com y www.uniprot.org).

1.1.1.1. Estructura y composición molecular de AXL.

La secuencia genómica de este receptor se encuentra en el cromosoma 19 posición q13.2, tiene 9 isoformas y la más acertada es la que tiene 807 residuos. La fosforilación de esta tirosinas kinasa es importantes en la transmisión del crecimiento y diferenciación de señales, donde de sus 819 aminoácidos, del 27 al 128 abarca el dominio IG C1 tipo 1, del 139 al 222 abarca el dominio de IG C2 tipo 2, del 227 al 331 abarca el dominio de fibroectina tipo III 1, del 336 al 448 abarca el dominio de la fibronectina tipo III 2, y del 536 al 807 abarca el dominio kinasa. Este receptor interactua con GAS6 en la posición 26 a

la 92 de los residuos que lo forman. Esta proteína consta de 2421 pares de bases (Partanen *et al.*, 1990)

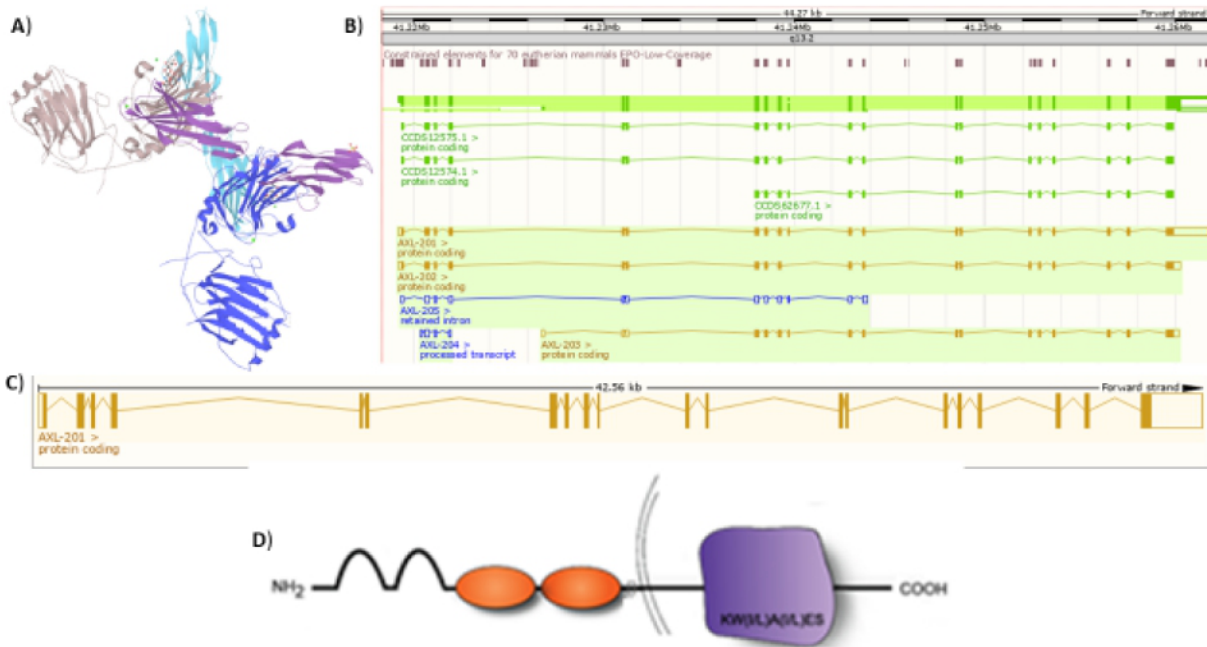


Figura 2. A) Estructuras de los dominios y estructuras cuaternarias del receptor AXL, B). Isiformas referenciads de residuos de AXL, en humanos, en donde solo codifican para proteínas 5 isoformas. C) 19 exones unidos a intrones más el UTR terminal 5, los cuales serán madurados y los intrones saldrán, y solo quedará el mRNA. D) Estructuras de los dominios sectorizados de cada parte del receptor AXL. (Figura Modificada por Ernesto Moran (2019), tomada de www.ensembl.com y www.uniprot.org).

1.2.2. La proteína MERTK: es una proteína que recubre el exterior de las células cancerosas, transmite señales dentro de las células para inducir un crecimiento descontrolado, esta proteína promueve la supervivencia de las células cancerosas (Nguyen *et al.*, 2014). Las mutaciones en esta proteína, se han asociado con la interrupción de la ruta de la fagocitosis del epitelio del pigmento retiniano y el inicio de la retinitis pigmentosa autosómica recesiva. La MERTK se expresa normalmente en los macrófagos y las células dendríticas, y facilita el engolfamiento de los desechos apoptóticos. A través de este proceso, la MERTK promueve la tolerogenicidad y la producción de citoquinas anti-inflamatorias, se sobre expresa en más del 80% de las muestras de pacientes pediátricos y adultos comparadas con células precursoras de médula ósea normales, y las células B y T

de personas con leucemia, también presentan la proteína MERTK en su superficie (Mässenhausen *et al.*,2016). Este receptor está presente en cáncer de mama y próstata, en donde se une a GAS6 y se autofosforila, activando la vía TYROBP causando desarrollo de cáncer (Cackowski *et al.*, 2017).

1.2.2.1. Estructura y complemento molecular de MERTK

Este receptor consta de 3954 pares de bases y 999 aminoácidos. Posee 19 exones en su ARNm inmaduro, ligado a UTR pequeño en el extremo terminal. Tiene 5.5943 de punto isoeléctrico, tiene un peso molecular de 100,249.15 g/mol. De los 999 aminoácidos que la conforma, el dominio extracelular abarca del aminoácido 21 al 505, del 506 al 526 abarca el dominio transmembrana y del 527 al 999 abarca el dominio citosólico. Este receptor está ubicado en el cromosoma 2q13 en los seres humanos.(Kayashima., *et al* 2017).

EL dominio extracelular transduce señales de la matriz extracelular al citoplasma mediante la unión a varios ligandos, incluidos LGALS3, TUB, TULP1 o GAS6. Esta proteína regula muchos procesos fisiológicos, que incluyen la supervivencia celular, la migración, la diferenciación y la fagocitosis de las células apoptóticas (efferocitosis). La unión del ligando en la superficie celular, induce la autofosforilación de MERTK en su dominio intracelular que proporciona sitios de acoplamiento para las moléculas de señalización descendentes. Tras la activación por ligando, interactúa con GRB2 o PLCG2 e induce la fosforilación de MAPK1, MAPK2, FAK/PTK2 o RAC1. La señalización de MERTK desempeña un papel en varios procesos, como el aclaramiento de macrófagos de las células apoptóticas, la agregación plaquetaria, la reorganización del citoesqueleto y el engullimiento. Funciones en el epitelio pigmentario de la retina (RPE) como regulador de la fagocitosis de fragmentos de segmento externo de la varilla. Por tanto, desempeña un papel importante en la inhibición de la respuesta inmune innata mediada por los receptores tipo Toll (TLR) mediante la activación de STAT1, que induce la producción de supresores de señalización de citoquinas por SOCS1 y SOCS3.(Nguyen., *et al* 2014).

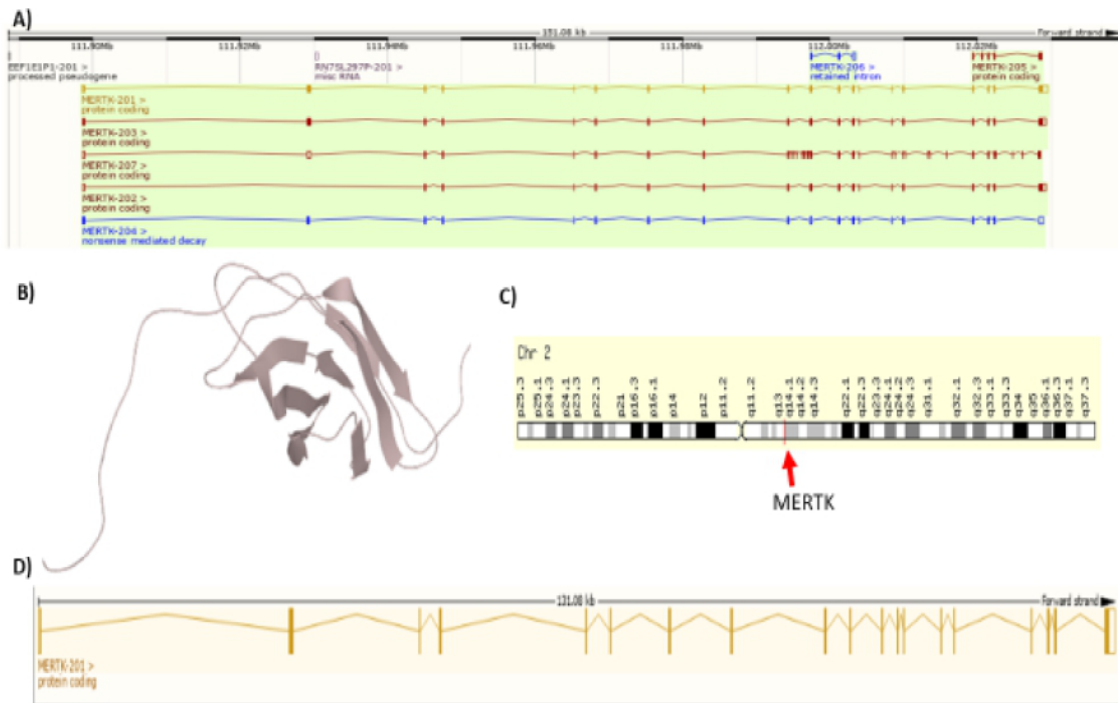


Figura 3. **A)** 5 isoformas de los residuos de las proteínas en donde 2 codifican para la proteína en el tamaño esperado. **B)** Estructura morfológica de MERTK, **C)** posición del receptor MERTK en el genoma del ser humano. **D)** 19 exones los cuales abarcan a los 999 residuos de aminoácidos que codificarán la proteína MERTK. (Figura Modificada por Ernesto Moran (2019), tomada de www.ensembl.com y www.uniprot.org).

1.2.3. La proteína CD32: es una proteína receptora de superficie y parte de una gran población de co-receptores de células B, que actúan para modular la señalización. Tiene una baja afinidad por los anticuerpos IgG y regula la producción de anticuerpos en presencia de IgG. Este circuito de retroalimentación actúa para disminuir la producción de IgG por las células B cuando hay un exceso en el cuerpo. Los anticuerpos monoclonales pueden distinguirse entre CD32A y CD32B. Todos los receptores Fc γ (Fc γ R) pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulinas y son los más importantes receptores Fc para inducir fagocitosis de los receptores opsonizados (Marcados) de microbios. Esta familia incluye varias Miembros, Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32), Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA (CD16a), Fc γ RIIIB (CD16b), que difieren en sus afinidades de anticuerpos debido a su diferente estructura

molecular. Por lo tanto, la CD32 es una molécula esencial para el efecto de APL contra

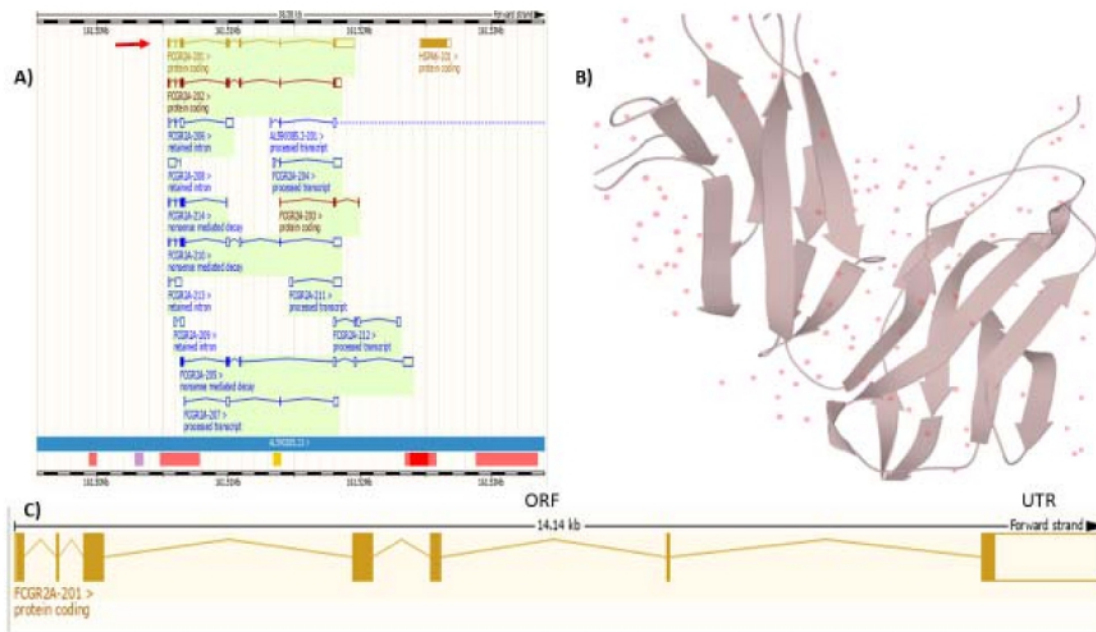


Figura 4. Dominios detallados del receptor MERTK A). Superfamilias y dominios. B) Dominios inteligentes, C) Dominios para transmitir respuestas. D) Genes y todas las secuencias SPNy sus variantes. (Figura Modificada por Ernesto Moran (2019), tomada de www.ensembl.com y www.uniprot.org).

β GPI causando la activación plaquetaria, la generación de tromboxano A y la liberación de gránulos después de su unión a los fragmentos Fc de APL. El Fc γ RIIA humano reacciona mejor con las subclases IgG 1 y 3, pero débilmente con la subclase 2, que incluye la mayoría de los anti- β GPI observados en pacientes autoinmunes.

1.2.3.1. Estructura y funcionabilidad molecular de CD32.

El gen de cd32 es FCGR2A(Fc Fragmento Del Receptor De IgG IIa) y existen 9 isoformas para esta quinasa, donde su ARN consta de 317 residuos al ser madurado el ARNm. De las isoformas reportadas, solo hay 3 isoformas que indican la expresión de esta proteína. Contiene una copia de un motivo citoplásmico que se conoce como el motivo inhibidor basado en tirosina inmunoreceptor (ITIM). Este motivo está involucrado en la modulación de las respuestas celulares. El motivo ITIM fosforilado se puede unir al dominio SH2 de varias fosfatasa que contienen SH2.(Abdel-Mohsen., et al 2018).

El dominio extracelular de esta proteína abarca desde el residuo 43 al residuo 217, el dominio transmembrana abarca del residuo 218 al 240 y el dominio del citoplasma abarca del residuo 241 al 317. Este receptor tiene un peso molecular de 35,000.68 g/mol, tiene un punto isoeléctrico de 6.6496 y un peso molecular de residuos de 110.412g/mol.

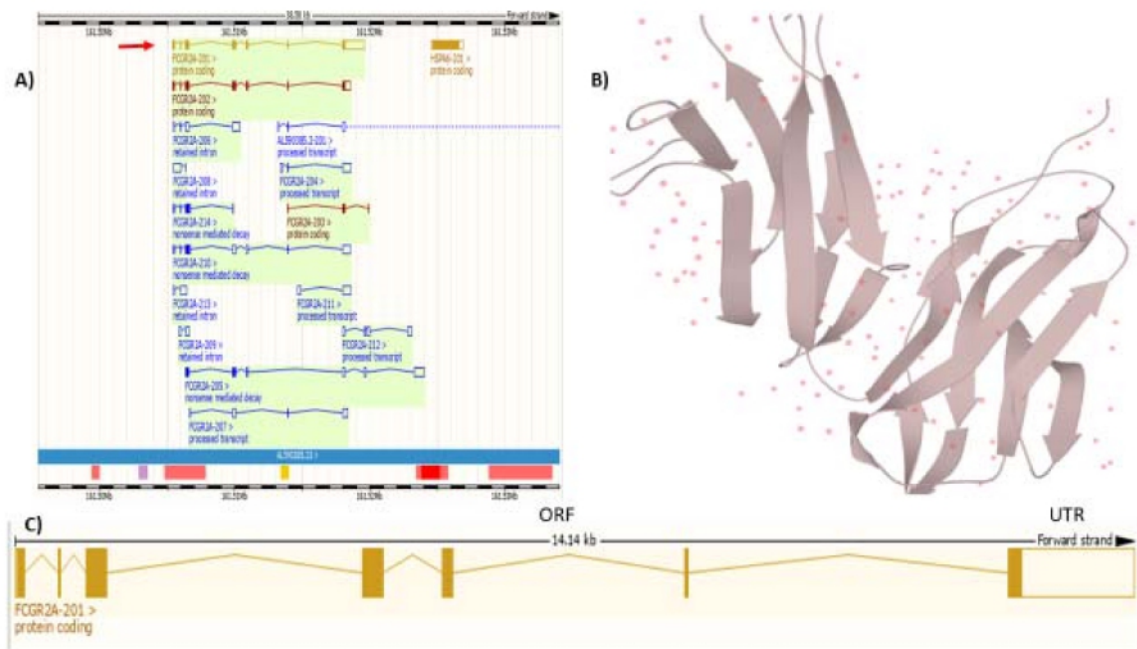


Figura 5. Exones codificantes para la síntesis de las proteínas, **A).** Isoformas descritas para utilizar esta proteína en ensayos. **B).** estructura molecular del receptor CD32, con sus dominios y sus interacciones. **C)** exón de ORF de CD32, unidos a los UTR 5' no codificantes de ninguna proteína, e presenta el ARNm inmaduro de CD32. (Figura Modificada por Ernesto Moran (2019), tomada de www.ensembl.com y www.uniprot.org).

1.2.4. La proteína CLEC5A: funciona como regulador positivo de la osteoclastogénesis, es un receptor de superficie celular que señala vía TYROBP (S. Chen et al., s/f). También, regula las respuestas inflamatorias, actuando como un regulador clave de la lesión sinovial y la erosión ósea durante la inflamación de la articulación autoinmune (por similitud) (Huang et al., 2016). Es receptor de macrófagos críticos para los serotipos del virus del dengue 1-4, puede actuar como un receptor para el virus del dengue en los macrófagos (Fey

et al., 2012). La unión del virus del dengue a la CLEC5A desencadena la señalización a través de la fosfilación de TYROBP, esta interacción no da lugar a la entrada viral, sino que estimula la liberación de citoquinas proinflamatorias. La mayoría de CLEC5A se expresa como una forma monomérica en los macrófagos. Además, interactúa con TYROBP/DAP12. La interacción con TYROBP es necesaria para la expresión de la superficie celular de la CLEC5. Interacciona con HCST/DAP10. Forman un complejo trimolecular de la CLEC5A/TYROBP/HCST dependiendo casi exclusivamente de TYROBP (Chen ST, et al 2017)

1.2.4.1. Estructura y composición molecular de CLEC5A.

Este receptor tiene 188 aminoácidos residuales que forman la proteína completa, el dominio citosólico abarca del aminoácido 1 al 4, el dominio transmembrana abarca del aminoácido 5 al 27 y el dominio extracelular abarca del aminoácido 28 al 188. Este receptor tiene 664 pares de bases, y cuenta de un tamaño de 21.5 kDa.

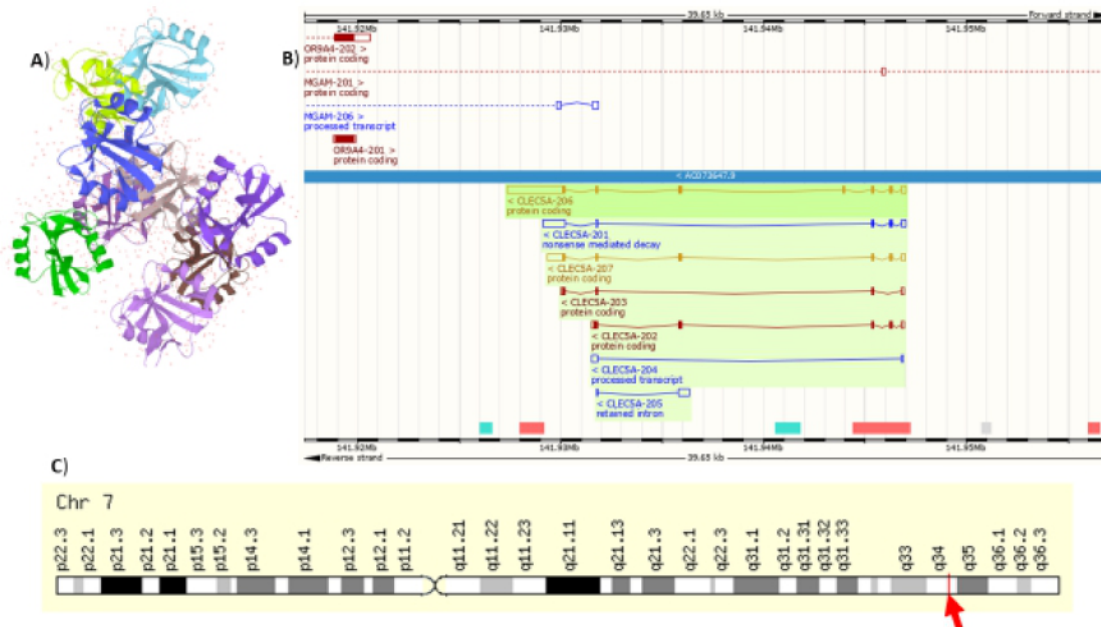


Figura 6. A) Estructura molecular del receptor extracelular CLEC5A, con sus dominios de glicosilación y puentes de disulfuro. B) Isoformas de CLEC5A, en donde solo 3 de las formas reportadas son codificantes. C) Receptor CLEC5A en el cromosoma 7 en la posición q34.(Figura Modificada por Ernesto Moran (2019), tomada de www.ensembl.com y www.uniprot.org).

1.2.5. La proteína CLEC7A: Familia de dominio 7 de lectina de tipo C, miembro A o Dectin-1 es una proteína que en humanos está codificada por el gen CLEC7A y contiene

una activación basado en tirosina inmunoreceptor (ITAM) -como con motivos en su cola intracelular (que está implicado en la activación celular) (Bennabi *et al.*, 2015). La glicoproteína codificada es un receptor de membrana de tipo II pequeño con un pliegue de dominio de tipo lectina de tipo C extracelular y un dominio citoplasmático con un motivo de activación basado en tirosina de inmunoreceptor parcial. La expresión se encuentra en células dendríticas mieloides, monocitos, macrófagos y células B. Este gen está estrechamente relacionado con otros miembros de la superfamilia CTL/CTLD en el cromosoma 12p13 en la región compleja del gen asesino natural (Walachowski1, 2016).

Los receptores de lectina de tipo C son una clase de receptores de reconocimiento de patrones de señalización que participan en la inmunidad antifúngica, pero también desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria a otros patógenos, como bacterias, virus y nematodos. La unión del ligando induce la señalización intracelular a través del motivo de tipo ITAM, CLEC7A puede inducir vías dependientes de Syk o independientes de Syk (Sancho, 2015). La dimerización de dectin-1 tras la unión del ligando conduce a la fosforilación de la tirosina por las quinasas de la familia Src y al reclutamiento de Syk. Syk activa el factor de transcripción NFκB. Este factor de transcripción es responsable de la producción de numerosas citocinas inflamatorias (Viriyakosol, 2012)

1.2.5.1. Composición molecular de CLEC7A.

El receptor CLEC7A esta forma por 201 residuos de aminoácidos, tiene un tamaño de 22.6 kDa, tiene un peso molecular de 27,627 g/mol, y un punto isoeléctrico de 5.21, además tienes 6 exones en su ARNm inmaduro, el gen codifica un miembro de la superfamilia de tipo Lectina de tipo C/Llectina de tipo C (CTL/CTLD). La glicoproteína codificada es un pequeño receptor de membrana de tipo II, con un pliegue extracelular tipo dominio de Lectina de tipo C y un dominio citoplásmico con un motivo de activación inmunoreceptor tirosina basado en tirosina. Este gen está estrechamente vinculado a otros miembros de la superfamilia CTL/CTLD en el cromosoma 12p13 en la región del complejo del gen asesino natural. La CLEC7A esta presentes en procesos de señalización mediada por carbohidratos; reconocimiento celular; respuesta de defensa al protozoo; respuesta inflamatoria. Y cumple funciones moleculares como enlace de carbohidratos; unión de iones metálicos; Unión a

proteínas MHC; unión a proteínas; señalización de actividad del receptor de reconocimiento de patrones(Kalia., et al 2018).

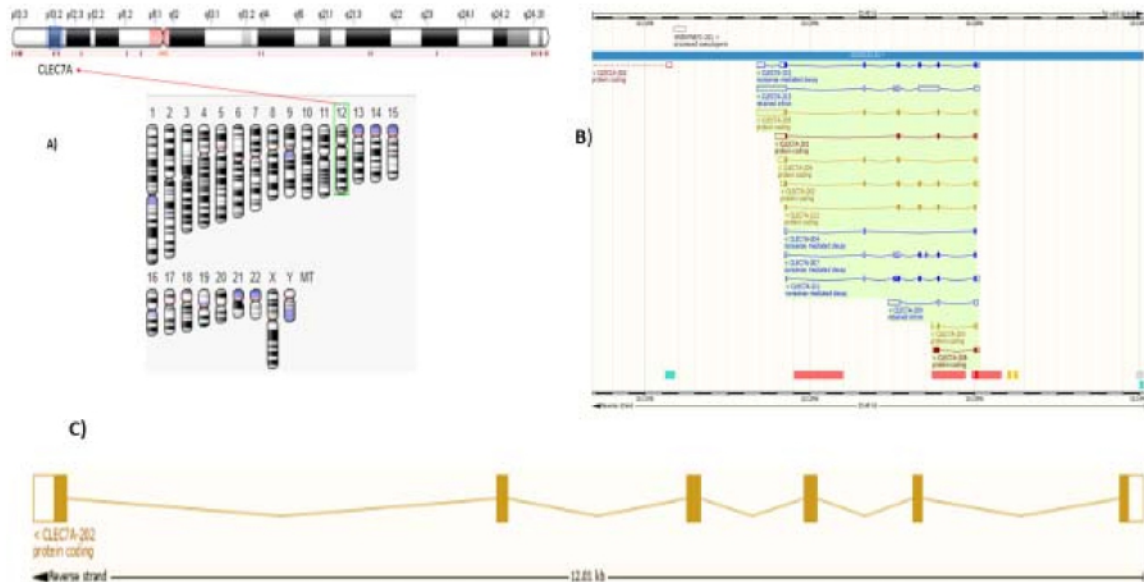


Figura 7. A) posición del receptor en cromosoma 12, B) 11 isoformas reportadas para este receptor, las cuales solo hay 6 codificantes, tal vez algunas fueron reportadas en otras especies, C) Pequeño UTR terminal 5'y 3'unido a los exones que serán madurados y los ntrones serán eliminados, y solo quedará la secuencia codificacorea de los 201 residuos.

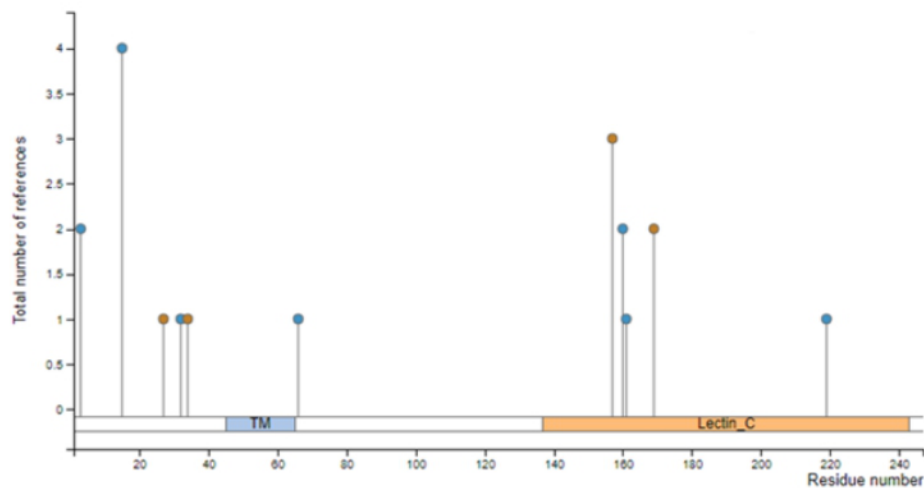


Figura 8. Aminoácidos o residuos de que componen a receptor CLEC7A, en donde quedan secciones que tiene especificidad para la fosforilación (azul) y para la ubiquitilación (naranja).

1.3. Células de expresión de proteínas recombinantes.

1.3.1. *Escherichia coli* BL21 (DE3) plyss

La *E. coli* es una enterobacteria anaeróbica facultativa, que puede crecer en presencia o ausencia de oxígeno, esta cepa normalmente es utilizada para expresión de proteínas recombinantes, debido a que el hospedero bacteriano más importante para la producción de Proteínas recombinantes (Kru *et al.*, 2011) La *E. coli* es la especie más empleada y estudiada tanto genética como fisiológicamente. Entre las ventajas que brinda este microorganismo como hospedero están: rápida generación de biomasa (elevada velocidad de crecimiento), fácil manipulación genética, no posee requerimientos costosos asociados a medios de cultivo o equipamiento, alta eficiencia en la incorporación de material genético foráneo, gran variedad de vectores de expresión y variantes mutantes. Los parámetros importantes para una exitosa producción de proteínas recombinantes en *E. coli* incluyen estabilidad proteolítica, localización y plegamiento de la proteína (Quiroga, 2010).

1.3.2. Células HEK293T.

Las células embrionarias de riñón humano 293, también conocidas como HEK 293, HEK-293 o de forma menos precisa, células HEK, son una línea celular proveniente de células de riñón de embrión humano (Yang *et al.*, 2016). Estas células son muy sencillas de cultivar y se transfectan fácilmente, por lo que se han usado ampliamente durante muchos años para la investigación en biología celular. Además, se utilizan en la industria biotecnológica para producir virus y proteínas para terapia génica (Termini *et al.*, 2017).

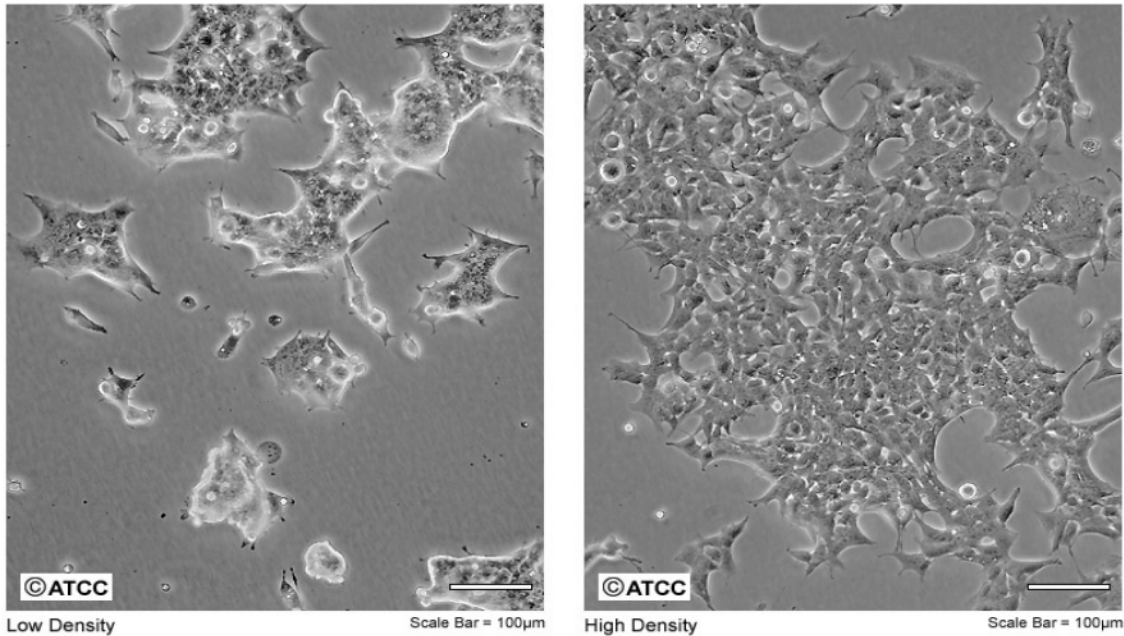


Figura 9; Cultivo de las células HEK 293FT observado a través de microscopia de contraste de fases, a baja densidad y luego el alta densidad, estas células se generaron por la transformación de fibroblastos, endotelio o epiteliales, todas ellas abundantes en riñón. Estas células son líneas estables para expresión de proteínas (ATCC, 2016).

1.4. Clonación de vectores de expresión de proteínas.

La clonación de ADN es una técnica de biología molecular que hace muchas copias idénticas de un fragmento de ADN, como un gen. En un experimento típico de clonación, se inserta un gen blanco en un fragmento circular de ADN llamado plásmido (Vogl, *et al.*, 2015). El plásmido se introduce en bacterias mediante un proceso llamado transformación y las bacterias que contengan el plásmido se seleccionan mediante antibióticos (Cui *et al.*, 2015). Las bacterias con el plásmido correcto se utilizan para hacer más ADN plasmídico o en algunos casos, se induce la expresión del gen para hacer proteína (Spath *et al.*, 2012)

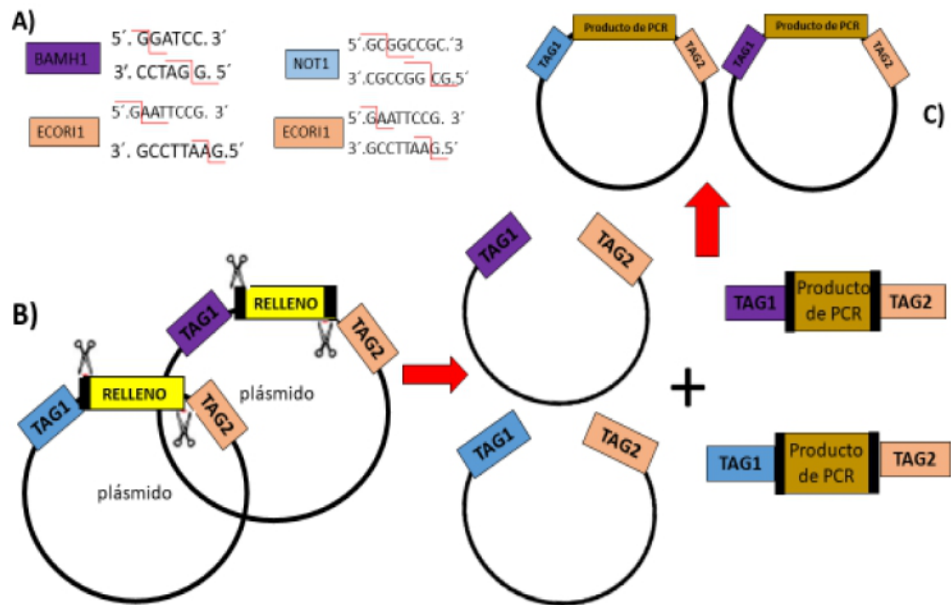
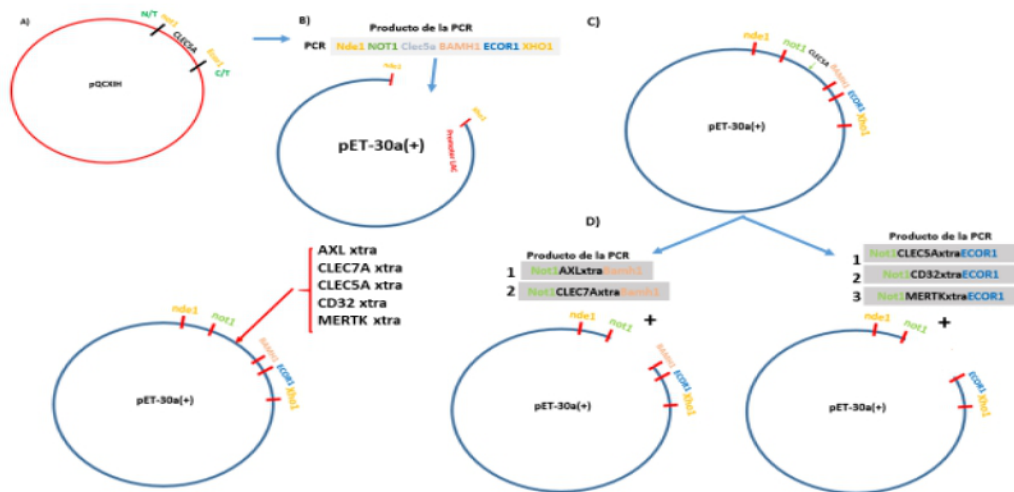


Figura 10. Construcción y estrategia de clonaje en pQCXIH. **A.** Reconocimiento de los sitios de restricción de cada enzima endonucleasa, **B.** Digestión enzimática de los plásmidos con las enzimas de digestión, y digestión enzimática de los productos de PCR con las mismas enzimas de restricción, **C.** Ligación de los plásmidos con las secuencias de genes amplificadas en PCR mediado por catálisis enzimática. (Figura Elaborada por Ernesto Moran 2019)



1.4.1. Plásmidos de expresión.

Figura 11. Estrategias de clonaje en bacterias, utilizando el vector pET-30a, al cual se le generaron nuevos sitios de restricción, unidos al promotor de lactosa. Y se subclonó para lograr la construcción del vector de expresión. Figura elaborada por Ernesto Moran (2019)

Un vector de expresión debe contener, además del gen de interés, un origen de replicación, un gen que confiera resistencia a antibióticos, un promotor y un terminador transcripcional. El origen de replicación determina el número de copias del vector, el cual influye en la estabilidad del plásmido, es decir, la conservación del plásmido dentro de las células durante la división celular. Un efecto positivo en el alto número de copias es la alta estabilidad de los plásmidos cuando ocurre un particionamiento aleatorio en la división celular. Por otro lado, un alto número de plásmidos generalmente disminuye la velocidad de crecimiento. La elección del vector puede incrementar la solubilidad y/o plegamiento de 3 formas: fusión a un polipéptido soluble, fusión a una enzima que catalice la formación de puentes disulfuro y fusión a una secuencia señal para transporte al espacio periplasmático. La exportación de proteínas al periplasma permite que la proteína posea un buen plegamiento y además favorece la formación de puentes disulfuro debido a la presencia de enzimas que catalizan su formación. En consecuencia se obtienen proteínas solubles y activas. La regulación de expresión se encuentra ligada a la fuerza del promotor. Un sistema promotor regulable proporciona la habilidad de activar la expresión del gen foráneo variando un factor ambiental, como la concentración de un componente particular en el medio de cultivo. El promotor lac, proveniente del operón lactosa de *E. coli*, es uno de los promotores más comúnmente utilizados para regular la expresión de genes recombinantes en bacterias y ha sido extensamente caracterizado a nivel molecular (Quiroga, 2010).

1.4.1.1. pQCXIH

Vector retroviral bicistrónico autoinactivante para la expresión de un gen junto con un marcador de resistencia a la higromicina (Muraki *et al.*, 2013). Tras la transfección en una línea celular de envasado, este vector puede expresar transitoriamente o integrar y expresar de manera estable, un transcripto genómico que contiene el promotor temprano inmediato de CMV Citomegalovirus, el gen de interés, sitio interno de entrada de ribosomas (IRES) y el gen de resistencia a la higromicina (Hygr). El gen de interés y la resistencia a la higromicina son co-traducidos, a través del IRES, como un mensaje bicistrónico en células de mamífero (Muraki *et al.*, 2015).

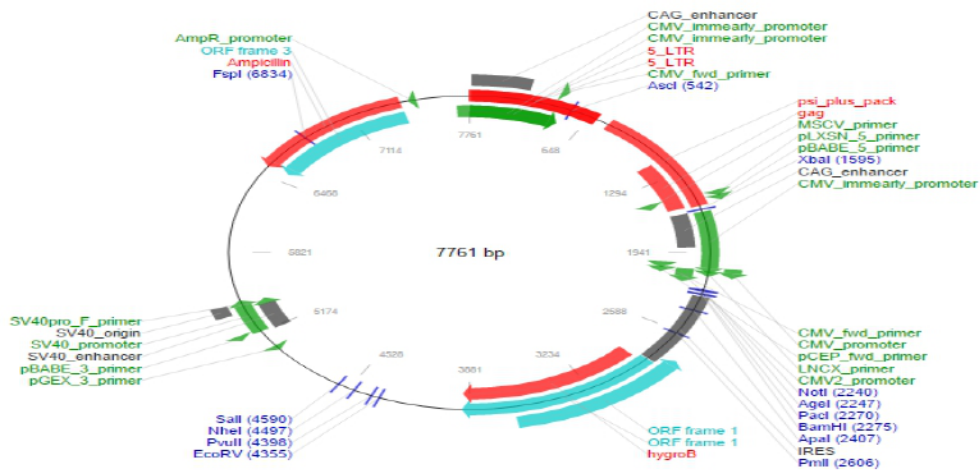


Figura 12. Estructura del vector pQCXIH, el cual consta de origen de replicación, sitios de clivaje para enzimas, sitios de proteínas fluorescentes o detectable a anticuerpos y marcador de selección en células eucariota (Alvarez, 2010).

1.4.1.2. pGEX4T1

El pGEX4T1 se deriva de pGEX-2T y contiene un sitio de reconocimiento de trombina. El pGEX-4T-1 puede aceptar y expresar directamente insertos de ADNc aislados, este vector tiene ADN de doble cadena y se replica usando una ADN polimerasa dependiente del ADN, no usando el ARN como intermediario durante la replicación. Este plasmido es utilizado en la expresión de proteínas recombinantes en bacterias, tiene la particularidad de tener GST para poder identificar la proteínas y finalizar con ensayos de pull down, al expresar las proteínas estas quedan de forma insoluble dentro de la bacteria, y en estas estructuras se le llama cuerpos de inclusión, este vector tiene resistencia a la ampicilina como marcador positivo de transformación y presencia del vector como tal en medio líquido o en placas de LB con Agar. (Paulo *et al.*, 2017).

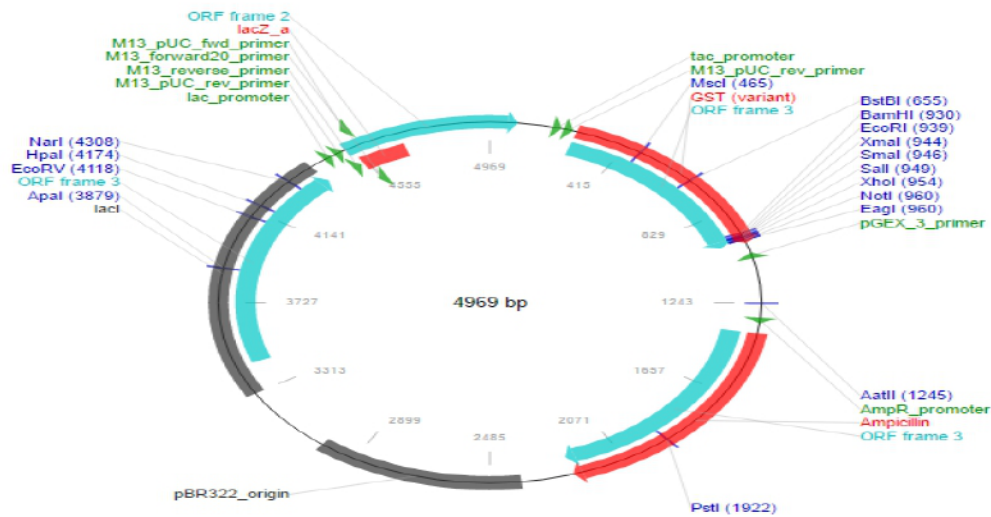


Figura 13. Estructura del vector pGEX4T1, el cual consta de origen de replicación, sitios de clivaje para enzimas de restricción, marcadores a antibiótico ampicilina, promotor, sitio de unión a ribosomas, sitio de terminación de la transcripción, sitios de proteínas fluorescentes o detectable a anticuerpos y marcador de selección en células procariota (Alvarez, 2010).

1.4.1.2.pET-30a(+)

Vector funcional para expresiones de proteínas recombinantes, este vector consta de origen de replicación, y es diseñado para realizar expresiones heterólogas. Tiene 5422 pares de bases, consta de su sitio múltiple de clonaje, ligado al promotor del operon de la lactosa, es utilizado en altas expresiones de proteínas, debido a su alto número de copias, tiene resistencia a Kanamicina, esta resistencia está localizada en su genoma de la par de base 4000 a la 5000, para identificarlo se pueden utilizar cebadores delanteros de T7, con la secuencia 5'd[TAATACGACTCACTATAGGG]3, este vector marca a las proteínas con histidina en la parte N-terminal y C-terminal; también es presente en expresiones de proteínas en condiciones desnaturizantes. (Marder *et al.*, 2014)

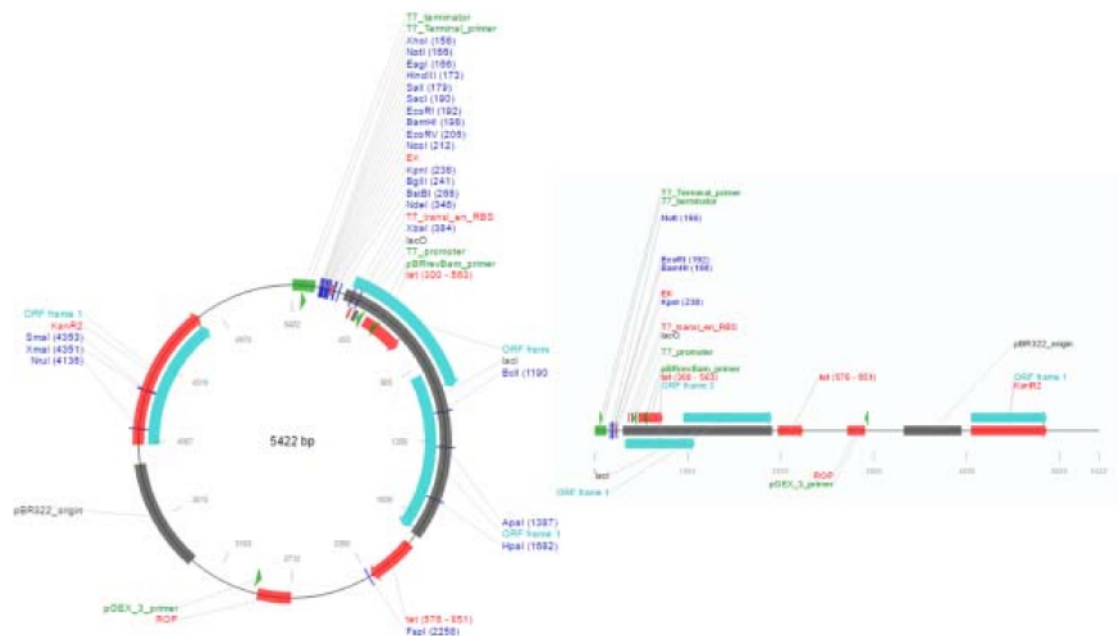


Figura 14. Mapa del vector pET-30a (+), el cual consta de 5422 pares de bases, tiene resistencia a Kanamicina, tiene promotor T7, y la zona múltiple de clonaje. Puede ser secuenciado con cebadores que hagan hibridación en las regiones internas específicas.(Addgene).

1.5. Células de clonaje

1.5.1 *Escherichia Coli* XL-10 GOLD

Cepa utilizada para clonajes, ya que es una cepa ultracompetente y ha sido utilizada para expresar bacteriófagos (Kamal *et al.*, 2013). Estas células XL-10 Gold fueron creadas para la transformación de grandes moléculas de ADN. Las XL-10 GOLD son ideales para construir bibliotecas de ADN plasmídico, porque disminuye el sesgo del tamaño. Esta cepa es deficiente en los sistemas de restricción y en la endonucleasa (endA), mejorando de esta manera la calidad del ADN plasmídico. También, tienen deficiencias en la recombinación, lo cual ayuda a la estabilidad del ADN en el clonaje (Wang *et al.*, 2015).

1.6. Miniprep

La miniprep es una extracción de ADN de naturaleza plasmídica de un cultivo bacteriano. La miniprep es la técnica inicial de purificación y concentración de ADN plasmídico para

cualquiera de sus posibles fines, entre los que destaca la clonación (biología) (Pronobis *et al.*, 2016). La purificación de ADN plasmídico de *E. coli*, es una técnica de importante para la clonación molecular. La purificación a pequeña escala (miniprep) de menos de 5 mL del cultivo, es una forma rápida para la verificación de clones o el aislamiento del ADN, seguido por otras reacciones enzimáticas (reacción en cadena de la polimerasa y digestión por restricción enzimática) (Zhang y Cahalan, 2007).

1.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa-PCR

La técnica de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que consiste en la amplificación *in vitro* de un fragmento de ADN específico o genomas completos (Guerrini *et al.*, 2016). Para llevar a cabo el experimento de amplificación es necesario conocer, al menos parcialmente, la secuencia del fragmento a amplificar (un gen, una parte de un gen, una región no codificadora) (Krebschull y Zador, 2015). Básicamente, se trata de replicar una y otra vez un mismo fragmento de ADN y para ello, se debe realizar *in vitro* lo que hacen las células *in vivo* para replicar su ADN (Shagin *et al.*, 2017).

Así, se trata de disponer en un tubo de ensayo el ADN de la especie objeto de estudio. Además, se debe añadir en dicho tubo un par de oligonucleótidos que actúen como cebadores para la ADN polimerasa (Nikzad *et al.*, 2017). La elección de estos oligonucleótidos (cebadores o primers) es crucial, dado que han de delimitar la región a amplificar (Chan *et al.*, 2016).

1.8. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa, es una técnica utilizada para separar fragmentos de ADN según su tamaño. Las muestras de ADN se cargan en pozos (ranuras) en un extremo de un gel y se aplica una corriente eléctrica para arrastrarlas a través del gel (Li *et al.*, 2016). Los fragmentos tienen carga negativa, por lo que se mueven hacia el electrodo positivo (Kunkel y Asuri, 2014). Puesto que todos los fragmentos de ADN tienen la misma cantidad de carga por masa, los fragmentos pequeños atraviesan el gel más rápido que los grandes (Gili *et al.*, 2016). Cuando un gel se tiñe con un pigmento que se une al ADN, los

fragmentos de ADN pueden verse como bandas, las cuales representan un grupo de fragmentos de ADN del mismo tamaño (Article *et al.*, 2016).

1.9. Transformación bacteriana

Las bacterias pueden recolectar ADN de otros organismos en un proceso llamado transformación. La transformación es un paso clave en la clonación de ADN (Datey *et al.*, 2017). Ocurre después de los tratamientos de digestión con enzimas de restricción y ligación, y se transfiere ADN plasmídicos recién hechos a las bacterias. Después de la transformación, las bacterias se seleccionan en platos con antibióticos (Johnsen *et al.*, 2016). Las bacterias con un plásmido son resistentes a los antibióticos y cada una formará una unidad formadora de colonia (UFC). Las colonias con el plásmido adecuado, pueden cultivarse para producir grandes cantidades de cultivos de bacterias idénticas que se utilizan para producir plásmidos o hacer proteínas (Moradigaravand y Engelstädter, 2014).

1.9.1. Células calcio competentes

Las células naturalmente competentes son generalmente transformadas de manera más eficiente con ADN linear que con plásmidos (Ton *et al.*, 2015). La competencia artificial no está codificada en los genes celulares. Sino que es inducida por procedimientos en el laboratorio, en donde las células son convertidas en permeables de forma pasiva, a través de diversas condiciones que normalmente no ocurren en la naturaleza (Gode-potratz *et al.*, 2010).

Las células enfriadas en presencia de cationes divalente como Ca^{2+} (en CaCl_2) prepara las membranas celulares para ser permeables al ADN plasmídico (Hakansson *et al.*, 2011). Las células son incubadas en hielo con el ADN y luego, darles brevemente un shock térmico (ej: 42°C por 30 a 120 segundos), lo que causa que el ADN entre en la célula. Éste método funciona muy bien en ADN plasmídico circular. Una excelente preparación de células competentes, entrega $\sim 10^8$ UFC por μg de plásmido. Una pobre preparación, entrega aproximadamente 10^4 UFC/ μg o menos. Buenas preparaciones no-comerciales debiesen arrojar 10^5 a 10^6 células transformantes por μg de plásmido (Cheng *et al.*, 2013).

1.10. Expresión de proteínas recombinantes

La producción de proteínas en el periplasma tiene variadas ventajas. Primero, el producto secretado puede ser idéntico al producto nativo, ya que la secuencia señal es cortada por peptidasas. Segundo, la actividad proteasa es considerada mucho más baja en el espacio periplasmático que en el citoplasma. Tercero, la purificación de la proteína recombinante es simplificada, puesto que el periplasma contiene menor cantidad de proteínas endógenas. Cuarto, la correcta formación de los puentes disulfuro puede ser facilitada porque el espacio periplasmático entrega el ambiente oxidativo necesario (Quiroga, 2010).

La temperatura óptima de crecimiento de *E. coli* es 37°C, la cual coincide con la temperatura de máxima actividad de la T7 ARN polimerasa, pero no es necesariamente la temperatura óptima de producción de proteínas heterólogas, porque se ha demostrado que la sobreproducción de proteínas recombinantes en *E. coli* a 37°C, induce al plegamiento correcto de las proteínas en los compartimentos deseados (Chen *et al.*, 2003; Novagen, 2006).

1.10.1. Expresión de proteínas recombinantes en bacterias

Las bacterias son microorganismos que pueden servir como medio para expresar proteínas y son los microorganismos más utilizados para la síntesis de proteínas recombinantes, más concretamente la especie *E. coli* (Summary, 2015). Esta bacteria es fácil de cultivar y de modificar genéticamente. A nivel de síntesis de proteínas, es un trabajador rápido de alto rendimiento y puede acumular proteínas recombinantes en una proporción que puede llegar hasta el 80% de su peso seco, lo que hace que sea la primera posibilidad que se tiene en cuenta cuando se quiere expresar proteínas recombinantes (Jafari *et al.*, 2012).

Las bacterias son ideales para producir proteínas de pequeño tamaño que no requieran modificaciones post-traduccionales. Pero al ser procariotas, no son tan idóneas para sintetizar proteínas de gran tamaño o procedentes de organismos superiores (Pieper *et al.*, 2011). Éstas últimas, a menudo muestran plegamientos complejos que incluyen muchos puentes disulfuro o que necesitan la intervención de chaperonas celulares en el plegamiento, características no presentes en los procariotas. Además, muchas de estas proteínas requieren para su función la inclusión de modificaciones tras su síntesis, que no pueden llevarse a cabo en organismos procariotas. Un ejemplo de ello, es la glicosilación, esencial para la función de muchas proteínas eucariotas (Adediran *et al.*, 2014).

1.10.1.2. Inducción de bacterias con IPTG

Las células transformantes que han captado plásmidos con el operón lac intacto, una vez inducidas con IPTG, están expresando activamente β -galactosidasa, que hidroliza X-gal y colorea de azul sus UFC (Adediran *et al.*, 2014). Las UFC de células transformantes que han captado un plásmido con el operón lac recombinante, en cuyo interior ha sido insertado el gen de la proteína de interés, sufren con la inserción la inactivación del gen *lacZ* (uno de los genes que codifica la β -galactosidasa) y por tanto, no pueden expresar β -galactosidasa ni degradar el X-gal, permaneciendo sus UFC de color blanco (Iniasta, 2012). La molécula de IPTG es absorbida por la bacteria a través de la acción de la enzima permeasa de lactosa. Una vez dentro de la célula, induce la transcripción del gen que codifica la β -galactosidasa, una enzima hidrolasa que cataliza la hidrólisis de β -galactósidos a monosacáridos (Dvorak *et al.*, 2015).

El IPTG es un inductor del operón lac, ya que es capaz de unirse al represor lacI e inactivarlo, pero no es sustrato para β -galactosidasa. Para producir grandes cantidades de una proteína en *E. coli*, se procura ubicar el gen de la proteína deseada bajo el control de un promotor fuerte como el promotor T7, la sobreexpresión de proteínas recombinantes provoca, una rápida respuesta de estrés incrementando la actividad proteasa y la lisis celular. Los inconvenientes del uso de IPTG son: costo, toxicidad en humanos, uso para producción de proteínas terapéuticas; formación de proteínas en agregados insolubles o cuerpos de inclusión, a altas concentraciones de inductor; crecimiento retardado como consecuencia del desvío del metabolismo celular hacia procesos de producción del ADN plasmídico y expresión de la proteína recombinante (Quiroga, 2010).

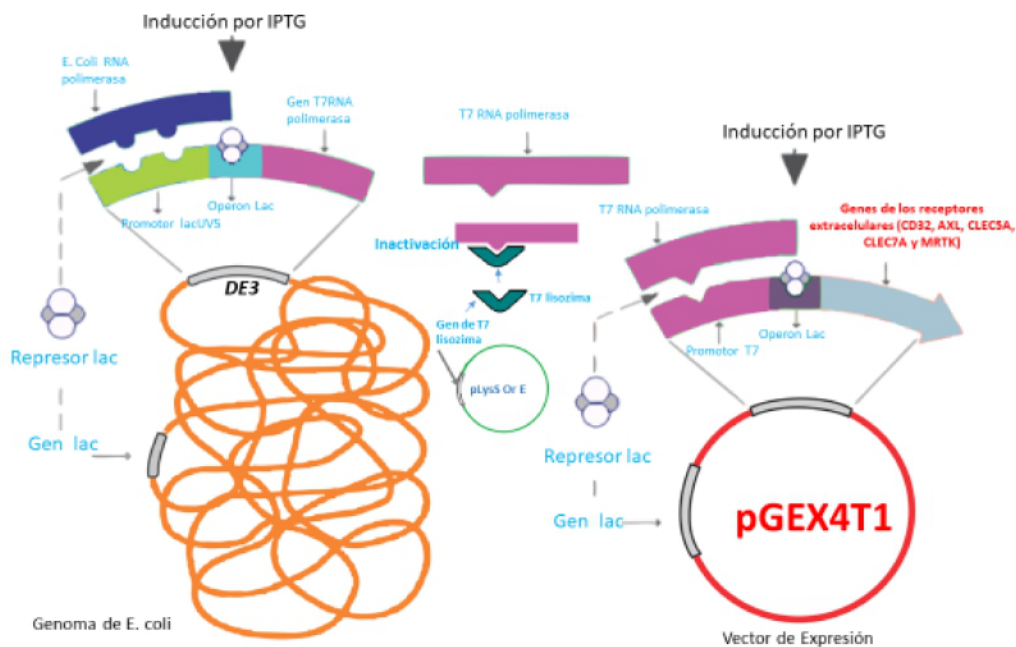


Figura No.15. Sistema de expresión para proteínas recombinantes utilizando como hospedador *E.coli* BL21 (DE3) y como vector de expresión pGEX4T1. A la izquierda de la figura, es posible apreciar la inducción por IPTG de la transcripción de ARN polimerasa T7, la cual una vez expresada, transcribe el gen de la proteína recombinante CD32, AXL, CLEC7A, CLEC5A y MERTK, bajo la inducción del mismo compuesto, IPTG. Figura modificada por Ernesto Moran(2019), tomada de (Quiroga., 2010)

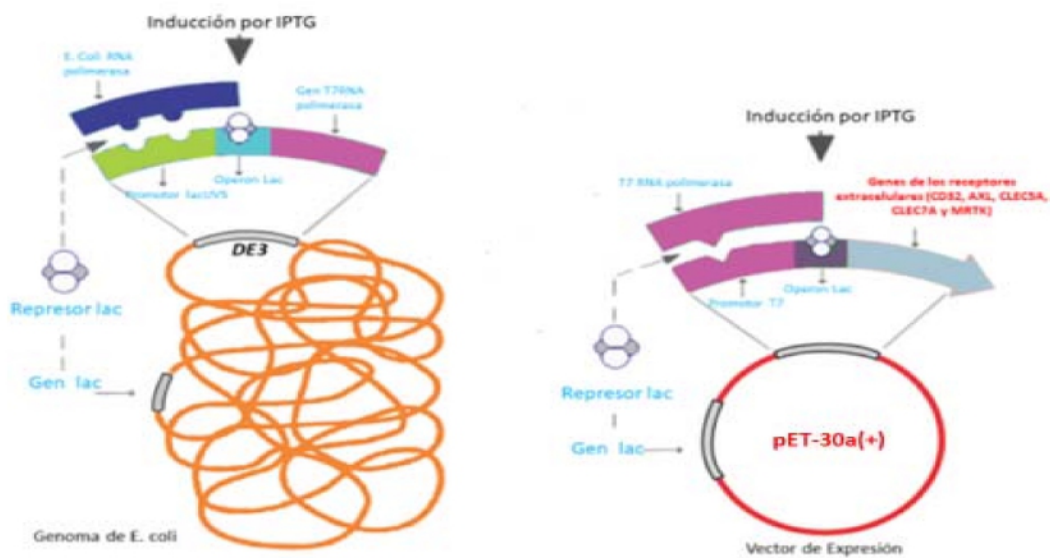


Figura 16. Proceso de expresión heteróloga de proteínas recombinantes, en *E.coli* como hospedero y plataforma de expresión. Figura modificada por Ernesto Moran(2019), tomada de (Quiroga., 2010)

1.10.2. Expresión de proteínas en células eucariotas.

1.10.2.1 Transfección

La transfección consiste en la introducción de material genético externo en células eucariotas mediante plásmidos, vectores víricos u otras herramientas para la transferencia (Durán *et al.*, 2011). En un sentido más reducido, frecuentemente se usa solo para referirse a la introducción de material genético en células animales, prefiriéndose otros términos para otras células (Kim y Tang, 2015)

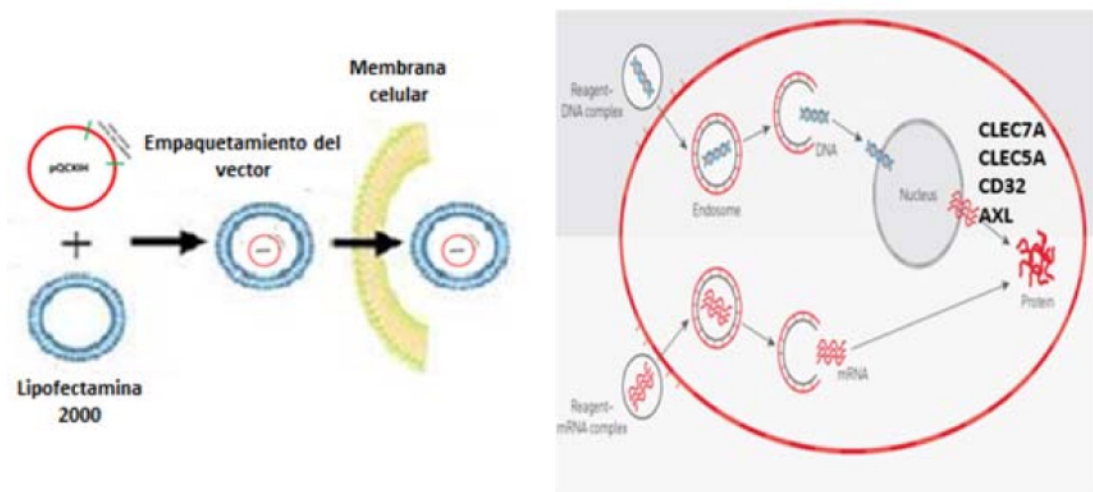


Figura 17. Sistema de transfección por medios biológicos, en este caso es transfección por lentivirus, esta transfección tiene un amplio rango de infección a las células en división y tiene una alta eficiencia de transfección (Alvarez, 2017).

1.11. Verificación de expresión y purificación de proteínas recombinantes.

1.11.1. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.

Sin duda alguna, es una de las técnicas más ampliamente usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas (Magdeldin *et al.*, 2014). La electroforesis en poliacrilamida es un método conveniente (Durán *et al.*, 2011), rápido y económico a nivel de muestra, pues se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína (Yan y Forster, 2010). La electroforesis en geles de poliacrilamida, se puede realizar empleando sistemas de uno o más tampones, en estos casos se habla de sistemas tampón continuos o discontinuos (Laremore *et al.*, 2011). En los sistemas discontinuos, el primer tampón asegura la

migración de todas las proteínas en el frente de migración, provocándose la acumulación de todas las que se han cargado en el pocillo. La separación realmente comienza a partir del momento en el que el frente de migración alcanza la frontera del segundo tampón (Jakob *et al.*, 2017).

1.11.1.1 SDS-PAGE

Es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. Su nombre significa la electroforesis en geles de poliacrilamida que se realiza en presencia de SDS (Wu *et al.*, 2015). Se trata de un tipo de electroforesis desnaturizante en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes (β -mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína con cargas netas negativas) y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas (Pujol-Pina *et al.*, 2015).

1.11.1.2 Gel separador

Es un gel que tiene lugar en la separación de los componentes a la hora de la corrida de las proteínas. Este gel consta de un pH más básico (pH: 8.8) y es fundamental en la separación de las proteínas por su tamaño (kDa). (Zhang *et al.*, 2016).

1.11.1.3. Gel apilador o concentrador.

Es de mayor poro (menor porcentaje de acrilamida+bisacrilamida) y tiene un pH más ácido que el segundo gel. Tiene como efecto, concentrar la muestra en una banda estrecha (L. Chen *et al.*, 2015).

1.11.2. Western Blot

El Western Blot, inmunoblot o electrotransferencia, es una técnica analítica usada en biología celular y molecular para identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, tal como la que se presenta en extractos celulares o de tejidos (Gilda *et al.*, 2015). Esta técnica utiliza tres etapas para lograr esto: separación por tamaño, transferencia a un soporte sólido y finalmente, visualización mediante la marcación de proteínas con el uso de anticuerpos primarios o secundarios apropiado (Ghosh *et al.*, 2016).

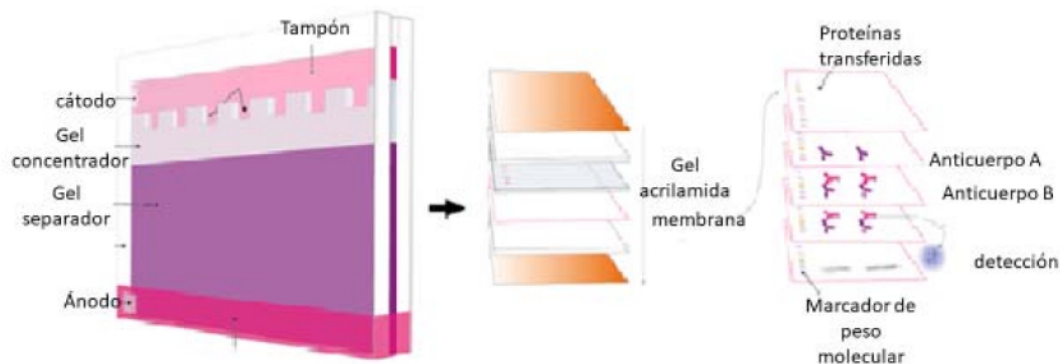


Figura 18. Esquema de los principios de western blot, basados en la detección de proteínas presentes en una muestra, esta técnica tiene alta sensibilidad para brindar informaciones de interacciones, expresiones y silenciamientos de proteínas, etc (W.NealBurnette, 1985).

1.11.3. Tinción con comassie.

Técnica aplicada para evaluaciones de sobreexpresión en células procariontas y eucariotas. La técnica consiste en teñir el gel separador con el tinte de azul de comassie, este tinte esta prepara con ácidos y grupos cetónicos, los cuales se intercalaran en las proteínas expresadas y separadas en el gel(Nowakowski., et al 2014)

1.11.4. Purificación de proteínas

Una purificación de proteínas es una serie de procesos que permiten aislar un sólo tipo de proteína de una mezcla compleja (HHS Public Access, 2016). La purificación de proteínas es vital para la caracterización de la función, estructura en interacciones de la proteína de interés, por ejemplo una enzima un receptor celular o un anticuerpo (Costa *et al.*, 2014).

1.11.4.1 Purificación mediante His-Tag

En el proceso de expresión y obtención de proteínas de fusión, una de las etapas más críticas y que mayores retos supone, es la purificación de proteínas recombinantes (England *et al.*, 2015). Este paso constituye un especial desafío cuando se trabaja con proteínas no caracterizadas o con proteínas para las que no existe un buen anticuerpo (Asher y Bren, 2010).

Los tags de afinidad, suelen ser generalmente, pequeñas secuencias de aminoácidos cuya fusión a la proteína diana, se hace mediante técnicas de ingeniería genética, que permite en teoría, la purificación de cualquier proteína mediante cromatografía de afinidad, sin necesidad de tener un conocimiento previo sobre las propiedades bioquímicas de la misma (Stotz *et al.*, 2014). Esta entrada trae los tags de afinidad utilizados para la purificación de proteínas recombinantes (Gabe *et al.*, 2017).

1.12. Reactivos de expresión de proteínas recombinantes.

1.12.1. Medio LB

El medio de cultivo LB (Luria Bertani) es el medio utilizado por excelencia para el mantenimiento de las cepas de *E. coli* recombinante en procesos de microbiología molecular (Devidas *et al.*, 2014). El caldo Luria Bertani-LB o caldo LB, contiene peptona de caseína y extracto de levadura que proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos. El cloruro de sodio, ayuda a mantener el equilibrio osmótico (Süle *et al.*, 2014).

1.12.1.1. Triptona

Es un digerido pancreático de caseína, se utiliza como fuente de nitrógeno en los medios de cultivos. Es capaz de soportar el crecimiento exigente y no exigente de microorganismos (Hensley *et al.*, 2016).

1.12.1.2. Extracto de levadura

El Extracto de levadura, es un extracto soluble en agua formado por el autolisado de células de levaduras. Es un producto rico en vitaminas, especialmente

del complejo B, aminoácidos y otros factores de crecimiento. Es utilizado en microbiología en la preparación de una amplia variedad de medios de cultivo como excelente fuente de nutrientes (Kram y Finkel, 2015).

1.12.1.3. Cloruro de Sodio-NaCl

Es una sustancia cristalina y de color blanco, que se utiliza para realizar medios de cultivo y tiene una gran importancia, ya que el **NaCl** mantiene el balance osmótico (Medina et al., 2017).

1.12.2. Medio DMEM

Es una fórmula modificada que permite el crecimiento celular *in vitro*, proporcionando los nutrientes esenciales requeridos por la célula, y es considerado como un medio enriquecido para el mantenimiento y expansión de líneas celulares, siendo este medio es enriquecido con glucosa, L-glutamina y suero fetal bovino, para el óptimo funcionamiento de líneas celulares (Sundararajan *et al.*, 2016).

1.12.2.1. Suero fetal bovino

El suero fetal bovino (SFB) es un producto utilizado en la ciencia, especialmente en medicina y biotecnología. Los medios de cultivo contienen normalmente SFB (u otros tipos de sueros animales) y el producto se utiliza en varios campos de aplicación, como por ejemplo: investigación de cáncer, toxicología, diagnóstico, producción de vacunas e investigación de células madres. El SFB, es el único medio universal aplicable para el cultivo y proliferación *in vitro*, y en la producción biológica de células animales (Huang *et al.*, 2015).

1.12.3. Agarosa

Polisacárido, producto purificado de algas (composición similar al agar-agar). Se disuelve en caliente (50-60°C) y al enfriar, solidifica formando un gel de alta porosidad. Este gel tiene amplias funciones para evidenciar la presencia de ADN (Kunkel y Asuri, 2014).

1.12.4. Bromuro de etidio

Es un agente intercalante usado comúnmente como aclarador de ácidos nucleicos en laboratorios de biología molecular para procesos como la electroforesis en gel de agarosa. Cuando se expone esta sustancia a luz ultravioleta, emite una luz roja-anaranjada, que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de ADN (Gomes-pereira y Monckton, 2017).

1.12.5. TBE

El TBE, es una disolución tampón formada por Tris, borato y EDTA, de uso frecuente en electroforesis, en especial en gel de agarosa, para separar ácidos nucleicos. Es el tampón en el que se funde la agarosa y tiende a ser, mejor solvente para que el ADN pueda desplazarse. El TBE tiene una interacción pegajosa con la agarosa, lo que provoca una recuperación baja del ADN y para fragmentos pequeños de ADN (100 – 500bp), corren más rápido y tiene mayor capacidad de discriminación en gel de agarosa al 2% (Gomez, 2012).

1.12.5.1 Ácido bórico

El ácido bórico es utilizado como tampón en la regulación del pH. El primer ácido bórico fue elaborado por wilhem Homberg y se ha utilizado en la elaboración de la solución TBE para fines en la biología molecular, en lo que respecta la técnica de electroforesis (Henderson *et al.*, 2009).

1.12.6. EDTA

El Acido etilendiaminotetraacético (EDTA), es un quelante de cationes divalentes y la función principal en la electroforesis, es secuestrar el Mg^{2+} , con lo que evita que las posibles nucleasas presentes degraden el ADN por completo. Dentro de la biología molecular, es utilizado para combinarlo con tris y guardar del ADN de forma estable. También, es utilizado en la preparación de soluciones como el TBE y el TAE, para ejecutar las técnicas de electroforesis (Martinez-Andrade *et al.*, 2018).

1.12.7. Desoxirribonucleótidostrifosfato (dNTPs)

Los dNTPs, son los nucleótidos fosfatados y éstos son la materia prima del ADN. Literalmente, son los "ladrillos" para construir una hebra de ácido nucleico (Ji *et al.*, 2014). La polimerasa toma estos dNTPs y los va organizando sobre una cadena de hexosas (desoxirribosa en el ADN), en una secuencia determinada. La amplificación mediante la PCR, se hace de manera exponencial (Delagoutte y Baldacci, 2011), es decir, siempre se dobla la cantidad anterior de fragmentos, por que se denaturaliza las dos hebras que sirven como molde para las cadenas siguientes (Yamashige *et al.*, 2012).

1.12.8. *PFU* polimerasa

La polimerasa *PFU*, es un tipo de ADN polimerasa termoestable y es frecuentemente utilizada en las técnicas de PCR, un método que se utiliza para amplificar secuencias cortas de ADN. La utilización de la polimerasa *PFU* termoestable, elimina la necesidad de añadir nuevas cantidades de polimerasa durante el proceso de termociclado (Spangler *et al.* 2009). De esta forma, es posible utilizar un único tubo cerrado en una máquina de termociclado relativamente simple, para realizar todo el proceso (Millar *et al.*, 2015). Por lo tanto, el uso de la polimerasa *PFU*, fue la idea clave que permitió hacer aplicable el proceso de PCR a una gran variedad de problemas de biología molecular relacionados con el análisis de ADN, evitando errores en el marco de lectura (Yamagami *et al.*, 2014).

1.12.9. Cebadores o primers

Un cebador, iniciador o primer, es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN (Schneider *et al.*, 2012). Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde (Y. Wang *et al.*, 2014).

Siempre se necesita un cebador, porque la mayoría de ADN polimerasas, enzimas que catalizan la replicación del ADN, no pueden empezar a sintetizar una nueva cadena de ADN de la nada, sino que solo pueden añadir nucleótidos a una hebra preexistente. Se necesitan dos para la reacción de PCR, uno en el extremo 3' y el otro complementario para

la otra hebra. Son de aproximadamente 20 nucleótidos, porque es la cantidad necesaria para que de manera probable se una a un sitio específico de la cadena de ADN (Busk, 2014).

1.12.10. Kanamicina

La Kanamicina inhibe el desarrollo bacteriano, Aminoglucósido, bactericida. Interfiere en la síntesis proteica bacteriana, se le añade a los medios de cultivo en el momento de crecer plásmidos, e inducir alguna expresión (DNA, 2015).

1.12.11. Ampicilina

Antibiótico fundamental en la producción y crecimiento de plásmidos, y en clonaje de células, se añade al medio de cultivo al momento de crecer algún vector, o clonar algún vector, debido a que por medio de este antibiótico, se confirman las incorporaciones de ADN externo a las células (Sakoulas *et al.*, 2012).

1.12.12. Acrilamida

La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además, tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro (Hogervorst *et al.*, 2014).

1.12.13. SDS

El SDS es un detergente de acción desnaturizante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturizadas con una relación de 1.4 g de SDS por g de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Esta unión masiva de moléculas de SDS, bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo (Sanderson *et al.*, 2015).

1.12.14. TEMED

Reactivo que es utilizado con persulfato amónico para catalizar la polimerización de acrilamida en la fabricación de geles de poliacrilamida, utilizados en electroforesis en gel para la separación de proteínas o ácidos nucleicos (Silva y McMahon, 2014).

1.12.15. Amonio persulfato

El persulfato amónico es un compuesto inorgánico de fórmula $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, son las sales de amonio del ácido peroxisulfúrico, es un agente oxidante fuerte, se presenta en forma de cristales o polvo de color blanco, cuenta con muy buena solubilidad en agua. Por ser un inductor de polimerización de la acrilamida, es utilizado en la preparación de geles para concentrar y separar proteínas (Mun y Olle, 2014).

1.12.16. Tris

Tris es el nombre abreviado del compuesto orgánico conocido como tris (hidroximetil) aminometano, de fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$. Se utiliza ampliamente en bioquímica y biología molecular, en particular para preparar disoluciones tampón (por ejemplo, tampones Tris-HCl, Tris-Gly, TAE y TBE). Es una amina primaria, con la reactividad típica, por ejemplo la condensación con aldehídos y el establecimiento de un equilibrio ácido-base (responsable de su capacidad tamponante) (Ibrahim-hashim *et al.*, 2017).

1.12.17. PBS

El PBS es una solución empleada en la investigación biológica, bioquímica e inmunología, esta solución es acuosa y salina la cual contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. La osmolaridad, concentración de iones de esta solución (Cl^- , Na^+ y K^+), es semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución es empleada en técnicas de elaboración de TBST en técnicas de western para el lavado de membranas de nitrocelula y también, es utilizado en cultivo de células para hacer lavados (Yost y Joshi, 2015).

1.12.18. Azul de Coomassie

La tinción con Coomassie puede emplearse para la determinación de proteínas cuando estas son abundantes, pero no para la determinación de pureza de proteínas trazas. Esta tinción requiere un medio ácido para la generación de la atracción electrostática entre las moléculas del colorante y los grupos amino de las proteínas. La atracción iónica es a través de las fuerzas de Van Der Waals, que une a las proteínas y al colorante formando un complejo. Esta unión es totalmente reversible en condiciones apropiadas (Ata *et al.*, 2012).

1.12.19. Azul de tripano

El azul de tripano, azul de tripán o azul tripán, es un colorante azoico que se utiliza en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad que permiten diferenciar células vivas de células muertas, las células vivas o tejidos con la membrana celular intacta no se colorean, debido a que la membrana celular es selectiva respecto a qué compuestos pueden atravesarla (Grisanti, *et al.*, 2017). En las células viables, con membrana intacta, no se incorpora el azul de tripano; por el contrario, sí atraviesa la membrana de las células muertas. Por lo tanto, las células muertas se muestran de un distintivo color azul debido a que las células vivas excluyen al colorante y no se tiñen. (Lade *et al.*, 2015).

1.12.20. Tween

Es una solución acuosa con una estabilidad y relativa no toxicidad que le permite ser utilizada como detergente y emulsionante en una serie de aplicaciones domésticas, científicas y farmacológicas. Como su nombre lo indica, el proceso de etoxilación deja a la molécula con 20 unidades repetidas de polietilenglicol. Es utilizada en preparaciones de soluciones para lavados de membranas y en preparación de muestras para microscopía confocal (Kang *et al.*, 2016).

I. Objetivos:

A. Objetivo general:

- Conocer el sistema de excreción de proteínas en *E. coli* BL21 y en HEK 293T y
- purificar las proteínas MERTK, AXL, CLEC5A, CLEC7A, CD32 generadas por *E. coli* BL21 y en HEK 293T.

B. Objetivos específicos:

- Generar células *E. coli* BL21 (DE3) pLysS con la capacidad de aceptar genes de las proteínas: MERTK, AXL, CLEC5A, CLEC7A, CD32.
- Generar células HEK293T con capacidad de aceptar genes de las proteínas: MERTK, AXL, CLEC5A, CLEC7A, CD32.

II. Hipótesis

Expresar y purificar las partes extracelulares de las proteínas MERTK, AXL, CLEC5A, CLEC7A y CD32, que serán las bases de la posible inmunoterapia basada en nanocuerpos contra cáncer.

III. Hipótesis estadística

Ho: Las células *E. coli* BL21 y HEK293T, no son viable para las expresiones de las proteínas extracelulares MERTK, AXL, CLEC5A, CLEC7A, CD32.

Ha: Las células *E. coli* BL21 y HEK293T, si son viable para las expresiones de las proteínas extracelulares MERTK, AXL, CLEC5A, CLEC7A, CD32.

Capítulo II

Metodología

2.1 Diseños de Cebadores.

Se identificaron las secuencias de ADN específica de cada receptor inmunológico y esa secuencia de ADN, se pasó al programa (software) Gene Runner, se tradujo la secuencia y luego, se seleccionaron los cebadores para el extremo de 5' a 3' (forward) y del extremo 3' a 5' (reverse). En la parte forward, se tomó como inicio al primer aminoácido metionina para seleccionar las 3 bases nitrogenadas que sintetizan la metionina y a partir de esas 3 bases nitrogenadas, se seleccionaron de 18 a 22 bases nitrogenadas terminando en citocina. Y en el extremo reverse, se seleccionaron las 3 bases nitrogenadas que dan origen a la glutamina, y a partir de esas 3 bases nitrogenadas, se seleccionaron de 18 a 22 bases nitrogenadas terminando en citocina. Luego, se le añadió la secuencia kozac y la secuencia TATA que funciona como promotor de todos los factores de transcripción. En el programa (software) gene Runner, se buscaron los sitios de restricción y con ellos, se seleccionaron las enzimas de restricción, y en el cebador también se le añadió a la secuencia de ADN en donde corta la enzima de restricción. El diseño del vector en la parte delantera constó de la fórmula (**TATA + GC + Secuencia de ADN de la enzima de restricción + 18-22 bases nitrogenadas de la secuencia de cada proteína**). Y la parte interna de 5 a 3', constó de la fórmula (**secuencia de la enzima de restricción + codón de terminación + 18-22 bases nitrogenada de la secuencia de cada proteína**). En base a este diseño, se mandó a generar estos cebadores en IDT para poder utilizarlo en la PCR.

2.2 Preparación de Placas de LB.

Se preparó medio LB con agar en 2 matraces de 1L, luego enfriamos el medio LB con agar a una temperatura de 50°C para añadirle antibióticos de una solución stock 100 mg/mL (ampicilina y Kanamicina a concentración de trabajo 100 µg/mL). Además, se sirvió el medio LB en platos Petri y se dejó en la cámara extractora de gases por 20 min abiertos para eliminar la humedad, y evitar contaminación. Y los platos Petri, fueron guardados a 4°C para su posterior utilidad.

2.3 Preparación de solución stock de ampicilina, Kanamicina a [100 mg/mL] y cloranfenicol a [20 mg/mL]

Se pesó 2g de antibiótico ampicilina y fue añadido a 20 mL de agua destilada-deshionizada, se homogenizó la solución y con una jeringa se tomó todo el volumen, y se le colocó un filtro a la punta de la jeringa y se filtró la solución de ampicilina, guardé 2 tubos a 4°C y los demás, a -20°C, forrados con papel de aluminio.

La solución de Kanamicina estaba a 100X (10 mg/mL) y se prepararon alícuotas de 5 mL para guardarlas a 4°C, y el frasco de Kanamicina a 100X, guardarlo a -20°C.

La solución de cloranfenicol fue preparada a [20 mg/mL] y las alícuots fueron guardadas a -20°C.

2.4. Plásmidos

Para la obtención del control positivo se optó por la transformación bacteriana con un vector plasmídico. La cepa de *E. coli* que se empleó fue XL10 GOLD, proporcionadas por el Dr. Gerald Moncayo y las BL21 DE3 pLysS fueron compradas en Thermo Fisher.

Los plásmidos empleados para la transformación fueron pQCXIH y pGEX4T1, los cuales sirvieron para clonación y expresión de proteínas. Cada plásmido tiene resistencia a la ampicilina como marcador de la transformación. Se recibió 400 µL de cada plásmido diluido en el buffer TE estéril. La muestra se congeló a -20°C.

2.5. Células ultracompetentes

Para la obtención de las células competentes se empleó el protocolo reportado por (INVITROGEN), al cual se le hicieron algunas modificaciones para adecuarlo a las condiciones imperantes. La preparación de las soluciones para la preparación de las células competentes está en la sección de anexos.

El método consistió en descongelar las células XL10 GOLD y BL21 (DE3) pLysS, y sembrarlas en una placa de 100 mm con LB más agar sin antibiótico, y luego, se tomó una UFC y se añadió en un tubo tipo falcon de 15 mL, que contenía 10 mL de medio LB líquido sin antibiótico, y un tubo falcon con 10 mL de medio LB con cloranfenicol a 20 µg/ml, se dejó en el agitador a 37°C por toda la noche y se inoculó 300 mL de medio LB líquido con 3 mL del medio LB líquido con crecimiento. Este medio fue incubado en el

agitador a 37°C hasta que el medio alcanzara una densidad óptica OD₆₀₀ de 0.3-0.6 (3 a 4 h aproximadamente).

Una vez se obtuvo la densidad óptica OD₆₀₀ adecuada, los siguientes pasos fueron a temperatura de 4°C. Se pasaron los 300 mL de medio LB con crecimiento a tubos tipo

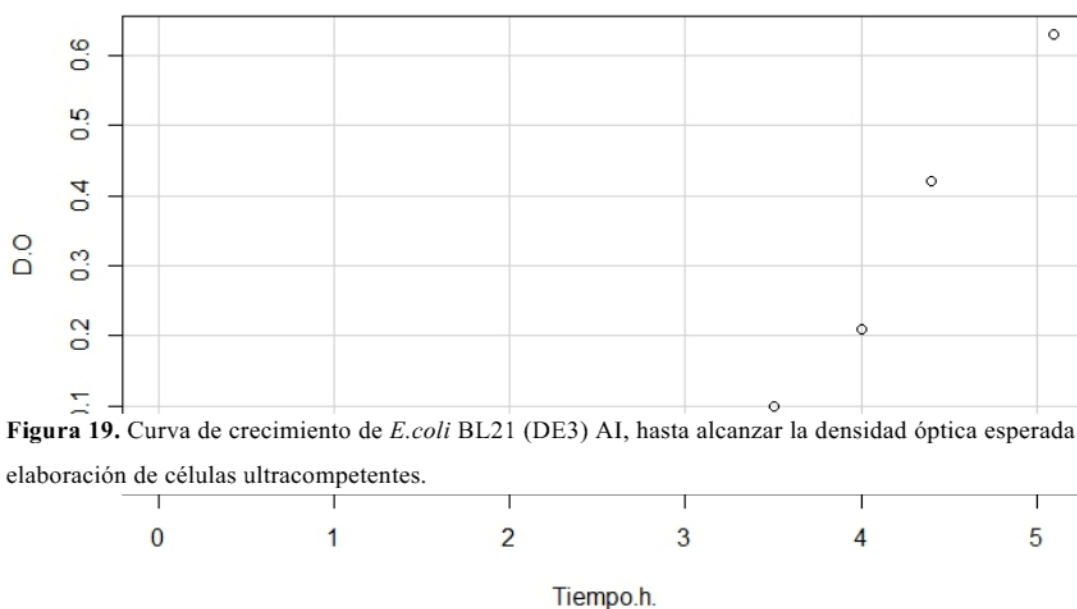


Figura 19. Curva de crecimiento de *E.coli* BL21 (DE3) AI, hasta alcanzar la densidad óptica esperada para la elaboración de células ultracompetentes.

falcon de 50 mL y fueron centrifugados por 10 min a 4000 rpm a 4°C, y luego, se descartó el sobrenadante y cada pellet, fue resuspendido con 30 mL de CaCl₂ 0.1M, se incubó por 30 min en hielo, y luego, se centrifugó por 10 min a 4000rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y los precipitados fueron resuspendidos en 10 mL de medio SOC, el cual estaba suplementado con 5% de glicerol, 10% de polietilenglicol (PEG) y 10% de Dimetilsulfoxido (DMSO). Se añadieron alícuotas de 200 µl en cada tubo y cada tubo, fue colocado en nitrógeno líquido, para hacer congelación rápida. Los tubos fueron guardados a -80°C para su posterior utilidad.

2.6. Transformación bacteriana

Para la transformación de las células competentes previamente obtenidas, se siguió el protocolo complementario (Zúñiga-soto *et al.*, 2015).

Se utilizó 100 µL de células competentes, fueron colocadas en un tubo eppendorf y se añadió 4 µL de la solución del plásmido pQCXIH, se incubó por 30 min a 4°C, y luego, 45 seg a 42°C, y finalmente, 5 min a 4°C. Seguido, se añadió 200 µL de medio SOC y se

colocó en el agitador por 1 h a 37°C. Se sembró 100 µL en cada placa de LB con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL.

Se transformó células *E.coli* XL-10 Gold, introduciéndole ADN complementario (ADNc) que le da resistencia a ampicilina y Kanamicina, introduje ADNc de CD32, AXL, MERTK, CLEC7A, CLEC5A, para aumentar la concentración [ng/mL] de cada ADNc

La eficiencia de transformación se calculó mediante las siguientes fórmulas:

UFC transformadas:
$$\frac{(No.de\ UFC)(coeficiente\ de\ dilución)(volumen\ original\ de\ transformación)}{Volumen\ empleado\ en\ la\ placa}$$

Eficiencia de transformación:
$$\frac{(UFC\ transformada)}{ADN\ de\ Plásmido\ (en\ \mu g)}$$

2.7. Miniprep (extracción de ADN plasmídico)

Para la extracción del ADN plasmídico se siguió el protocolo del kit de extracción de Bioland.

De las transformaciones bacterianas se inoculó 5 mL de medio LB con ampicilina y se colocó en el agitador toda la noche a 37°C, y luego, se centrifugó por 20 min a 3500 rpm, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet con 250 µL de la solución A1, se añadió 250 µL de la solución A2 y 350 µL de la solución N1. El lisado de las bacterias, se centrifugó por 5 min a 13000 rpm, a la columna se le añadió 100 µL de buffer de columna y se centrifugó por 1 min a 11000rpm, se transfirió 750 µL del sobrenadante a la columna y se centrifugó por 1 min a 11000 rpm. Luego, se descartó el sobrenadante, se le añadió 750 µL de buffer de lavado de ADN y se centrifugó por 1 min a 11000rpm, y finalmente, se eluyó el ADN en 100 µL del tampón de elución (TE), se midió la concentración en el nanodrop y se guardaron los tubos a -20°C.

2.8. Electroforesis de los cDNA extraídos.

Se preparó un gel de agarosa a 1.0%, en donde se pesó 1.0 g de agarosa en 100 mL de TBE1X y se calentó por cuatro tiempos de 30 segundos en el microonda, una vez bajó la temperatura, se le añadió 1.5 µL de bromuro de etidio; también se tomó 2.0 µL de ADNc de cada tubo, se le añadió 2.0 µL de agua esteril y 2.0 µL de tampón de carga de ADN, se

cargó en cada pocillo del gel y se corrió por 45 min a 110 V, para finalmente, revelar el gel en el programa (software) ultraquant.

2.9. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación se realizó en base al protocolo estandarizado por BIOLINE.

Cuadro 1. Reactivos y cantidades necesarias para un volumen de 50.0 μ L, en la amplificación de los dominios extracelulares de los receptores, datos establecidos por BIOLINE

Reactivos	Cantidad (μ l)
10x AccuBuffer	5
50 mM MgCl ₂	1.2
100 mM dNTP Mix	1.2
ADN	1.0
Cebadores 20mM	1.0
ACCUZYME DNA	1.0
Polimerasa 2.5 U/uL	
agua (ddH ₂ O)	Completar a 50.0

Para la amplificación de 5 secuencias de genes que sintetizan 5 proteínas, 5 pares de cebadores que hibridizan el dominio extracelular de cada proteína. Se realizó la mezcla de tampón y dNTPs, en cada tubo (10 en total) de PCR, se añadió cebadores de adelante y atrás (forward y reverse), también, se le añadió ADN plasmídico, agua libre de nucleasas y PFU polimerasa. Y luego, se colocaron los tubos en el termociclador para realizar la reacción y seguido de ello, se guardaron los tubos a -80°C, para después realizar la electroforesis.

Cuadro 2. Protocolo de las temperaturas y tiempos utilizados en el termociclador para la amplificación de los dominios extracelulares de los receptores.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Primera desnaturalización	94°C	5.0 min	1
Desnaturalización	94°C	1.0 min	35
Hibridación	48°C	1.0 min	
Extensión	72°C	8.0 min	
Post- ciclo(extensión)	72°C	12.0 min	1

2.10. Electroforesis de los productos de la PCR

Se preparó un gel de agarosa a 1.0%, pesando 0.8g de agarosa en 80 mL de TBE 1X, para que se mezclara el TBE 1X con la agarosa, se calentó la mezcla en un microonda y cuando bajó la temperatura a 50°C, se le añadió 1.5 µL de bromuro de etidio 1.100, para teñir las bandas de ADN.

En tubos de PCR se añadió 50 µL de los resultados de la PCR y 20 µL de buffer de carga. Cuando el gel se solidificó, se colocó el marcador de peso molecular y las muestras en los pocillos, y se corrieron las muestras a 110 voltios por 45 min, y luego, utilizando el programa (software) ultraquant, se reveló el gel.

El TBE1X fue preparado utilizando esta formula:

$$(V1)(C1) = (V2)(C2)$$

$$V1 = \frac{(volumen\ total)(concentración\ final)}{(concentración\ inicial)}$$

2.11. Digestión Enzimática

Para la digestión enzimática, se utilizó el protocolo que trae cada enzima de restricción de marca INVITROGEN.

Se cortó cada segmento de cada secuencia de gen, del gel agarosa que estuvo en el rango esperado, y con un kit específico, se purificó el ADN, en donde el ADN fue eluido en 35 μ L de TE buffer. A cada secuencia de genes (inserto) se digirió con enzimas de restricción por 2 h y se volvió a purificar en 50 μ L como volumen final, se calculó la concentración cada inserto en el nanodrop. También, al plásmido pQCXIH y pGEX4T1 se le digirió toda la noche a 37°C, con combinaciones de enzimas de restricción **1) BAM H1 y NOT 1 y 2) NOT 1 y ECO RI1.**

Cuadro 3. Protocolo de las cantidades a utilizar de enzimas de restricción para los sitios de restricción enzimática tabulado por INVITROGEN.

Reactivos	Enzima 1	Enzima 2	Enzima 3
Agua libre de nucleasa	Agregar la cantidad necesaria para ajustar al vol. total		
10X buffer	1.0 μ l	1.0 μ l	1.0 μ l
ADN	0.2-1.0 μ g	0.2-1.0 μ g	0.2-1.0 μ g
BAMH1	1.0 μ l	-	-
ECORI1	-	1.0 μ l	-
NOT1	-	-	1.0 μ l
Volumen total(5x)	20.0 μ l	20.0 μ l	20.0 μ l

Cuadro 4. Sitios de restricción enzimática de cada secuencia de genes y la de los plásmidos.

INSERTO	EcoRI	NotI	KpnI	BamHI	AgeI
MERTK			x		
MERTKextra			x		
AXL			x	x	
AXLextra			x		
CLEC5A				x	
CLEC5Aextra				x	

CLEC7A			x		
CLEC7Aextra			x		
CD32				x	
CD32extra				x	
Plásmidos	EcoRI	NotI	NDE1	BamHI	AgeI Xho1
pGEX4T1	X	X		X	
pQCXIH		X		X	X
pET30a			X		X

2.12. Electroforesis de los productos de la digestión enzimática

Se preparó un gel de agarosa a 1.0%, pesando 0.8 g de agarosa en 80 mL de TBE 1X, para que se mezclara el TBE 1X con la agarosa, en un microonda se calentó la mezcla y cuando bajó la temperatura, se le añadió 1.5 μ L de bromuro de etidio, para teñir las bandas de ADN.

Cada digestión de pQCXIH y pGEX4T1 con las combinaciones de enzimas de restricción, fue resuspendida con buffer de carga de ADN. Cuando el gel se solidificó, se colocó el marcador de peso molecular y las muestras de las digestiones enzimáticas en los pocillos, se corrieron las muestras a 110 voltios por 45 min y luego, utilizando el programa (software) ultraquant, se reveló el gel, para cortar el segmento de interés del mismo gel de agarosa. Cada segmento de pQCXIH y pGEX4T1 fue eluido en 50 μ L, y la concentración fue calculada en el nanodrop.

2.13. Ligación y clonaje

Se realizó una ligación dirigida con dos enzimas de restricción, para esto, se utilizó cada inserto tratado con las mismas enzimas con las que se digirió los plásmido pQCXIH y pGEX4T1. Se tomó 1.0 μ L de buffer T4, 1.0 μ L de cada vector digerido, 1.0 μ L de T4

ligasa y 7.0 μL de Inserto digerido para completar una ligación con un volumen de 10 μL . Esta ligación fue colocada a temperatura ambiente toda la noche.

Se descongeló células competentes y se utilizaron 10 platos Petri de LB con ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Luego, se introdujo el producto de la ligación a las células competentes y se realizó transformación bacteriana a las células *E.coli* XL-10 Gold, para realizar el clonaje del dominio extracelular de los receptores MERTK, AXL, CD32, CLEC5A y CLEC7A. Cuando se hizo la transformación bacteriana, se puso a crecer en medio SOC por 1 h en el agitador, después, fueron sembradas en los platos Petri y se incubaron a 37°C por 24 h, posterior a esto, de las UFC que se crecieron en cada plato, se inoculó en un tubo tipo falcon de 15 mL que contenía 5 mL de caldo LB con ampicilina, y se colocó en el agitador por 24 h a 37°C, para luego, hacer extracción de ADN plasmídico. Cada extracción de ADN de los tubos, fue llevada al nanodrop para calcular la concentración. También, cada UFC de cada plato, fue estriada en un plato nuevo y a las 24 h, cada plato se guardó a 4°C. Se amplificó CLEC5A clonado en pQCXIH, mas sitios de restricción NOT1 y ECOR1, con enzimas NDE1 y XHO1 como dianas, luego se digirió el vector pET-30a con las mismas enzimas para hacer la ligación dirigida por enzimas. Después, se digirió este nuevo vector con las enzimas de restricción NOT1-ECOR1 y NOT1-BAMH1, para ligar los insertos de la PCR. Esto se hizo debido a que los cebadores diseñados tenían las dianas de pQCXIH y se necesitó introducir las dianas en pET-30^a, para así, culminar el clonaje. Ya que en pGEX4T1 se expresó la proteína en forma inversa y de la forma no esperada, porque las dianas de restricción no estaban presentes.

2.14. Identificación de UFC positivas a través de PCR.

Previo a la extracción de ADN plasmídico de cada tubo, se tomó UFC y se resuspendió en 5 μL de agua libre de nucleasa, y luego, se procedió a amplificar con Taq polimerasa cada tubo que fue resuspendido, se calculó en base a un volumen final de 10 μL .

Cuadro 5. Reactivos y cantidades necesarias para una de PCR de verificación de clonaje de un volumen de 10.0 μ l.

Reactivos	Cantidad (μ l)
10x Master mix	2.0
ADN	1.0
Cebadores 20 mM	1.0
agua (H ₂ O)	6.0

Cuadro 6. Protocolo ejecutado en el termociclador para la verificación del clonaje.

Paso	Temperatura	Tiempo (min)	Ciclos
Primera desnaturalización	94°C	5.0	1
Desnaturalización	94°C	1.0	35
Hibridación	62°C	1.0	
Extensión	72°C	5.0	
Post-ciclo(extensión)	72°C	12.0	1

2.15. PCR del producto de las extracciones de ADN plasmídico.

Para obtener esta amplificación, se realizó en un volumen de 10.0 μ l, utilizando Taq polimerasa, donde se tomó 21 tubos de la extracción de ADN plasmídico y se ejecutó la amplificación.

Cuadro 7. Reactivos y cantidades necesarias para una de PCR de verificación de clonaje en muestras de miniprep, PCR con un volumen de 10.0 μ L

Reactivos	Cantidad (μ l)
10x Master mix	2.0
ADN	1.0
Cebadores 20mM	1.0
agua (ddH ₂ O)	6.0

Cuadro 8. Protocolo ejecutado en el termociclador.

Paso	Temperatura	Tiempo (min)	Ciclos
Primera desnaturalización	94°C	5.0	1
Desnaturalización	94°C	1.0	35
Hibridación	62°C	1.0	
Extensión	72°C	5.0	
Post- ciclo(extensión)	72°C	12.0	1

2.16. Expresión de Proteínas en *E.coli* BL21 (DE3) pLysS

Del clonaje de cada secuencia de genes del dominio extracelular de receptores inmunológicos (AXL, CD32, CLEC5A y CLEC7A), con el plásmido pGEX4T1 en las células *E. coli* XL-10 GOLD, se realizó extracción de ADN plasmídico. Luego, se descongelaron células *E.coli* BL21 y fueron transformadas con los productos de la extracción del ADN plasmídico de las XL-10 GOLD, una vez crecieron las bacterias *E.coli* BL21, se tomaron UFC y se inocularon en caldo LB con antibiótico a 100 µg/mL. Se crecieron las bacterias hasta un $D.O_{600}=0.4-0.6$ y se procedió a inducir las con IPTG 1:10 por un periodo de 16 h; se colectaron volúmenes del medio y se centrifugaron las bacterias, para identificación de la sobreexpresión de dominios extracelulares de los receptores inmunológicos a través de tinción con comassie.

Con el primer vector utilizado, no se expresó la proteína de interés y se repitió los mismos ensayos de expresión utilizando el vector pET-30a.

2.17. Verificación de expresión por Western Blot y por tinción de comassie.

Se prepararon geles de acrilamida utilizando el protocolo estandarizado por BIO-RAD. Se prepararon los tampones de separación y transferencia de las proteínas. Se midió la concentración de las proteínas existentes en el medio de bacterias inducidas con IPTG y se añadió el tampón de carga para las proteínas. Se calentaron las muestras por 5 min a 95°C y posterior a esto, se introdujeron en cada pozo del gel de acrilamida previamente preparado.

Se corrieron las proteínas por 40 min a 20 mA y luego, fueron transferidas a la membrana de nitrocelulosa. Se prepararon los anticuerpos primarios con la dilución 1:1000, se le añadieron los anticuerpos a la membrana previamente bloqueada con leche al 5% por 30 min, después de 24 h se incubaron las membranas por 2 h con los anticuerpos secundarios y finalmente, se hizo la reacción de quimioluminiscencia para identificar las proteínas CLEC5A, CLEC7A, CD32, AXL, y MERTK. También, se tiñeron los geles con azul de comassie para verificar la sobreexpresión de los receptores extracelulares.

2.18. Solubilización y purificación de las proteínas expresadas.

Para la solubilización de las proteínas expresadas a partir de los centrifugados, se siguió el protocolo establecido por Moreno *et al.* (2013) con algunas modificaciones. Luego de los centrifugados de cada expresión, los precipitados (pellet) fueron lavados con la solución STE (Tris-HCl 10mM, pH 8.0, NaCl 150mM y EDTA 1mM). Posteriormente, el pellet de las células fue resuspendido en 50 mL de la solución STE y tratado con 100 µg/mL de lizosima durante 15 min con agitación constante a 4°C. A las mezclas anteriores, se les añadieron 5 mM DTT, 1% de N-laurilsarcosina y para completar la lisis celular, las mezclas fueron sonicadas durante 4 ciclos de 15 segundos, y centrifugadas a 10000 rpm por 15min a 4°C.

2.19. Cultivo de Células HEK293FT

Se le dió mantenimiento a las células que fueron las bases de la plataforma de expresión de receptores inmunológicos, primeramente se descongelaron las células HEK293FT y se resuspendieron en 5 mL de medio de cultivo DMEM, fueron centrifugadas por 5 min a 1500 rpm, para eliminar el DMSO (crio preservante), se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido con 10 ml de medio de cultivo DMEM, y se sembraron las células en los platos adherentes; dos días a la semana fueron tripsinizadas y cuando las células llegaron a una confluencia de 100%, una parte fue congelada y la otra parte se mantuvo creciendo en un plato de 6 pozos.

Para utilizar el medio de Cultivo DMEM, se le añadió 50 mL de suero fetal bovino para suplementarlo a 10% de suero, 3 mL de L-glutamina y 2 mL de antibiótico en esta caso 100 u/mL de penicilina/100 µg/mL de estreptomina. También, se preparó la tripsina en volumen de 500 mL, se le añadió una concentración de 0.25% de tripsina en PBS 1X y DMEM sin suero, y finalmente, se le añadió 2 mM de EDTA a partir de un EDTA más concentrado (0.5M).

2.20. Viabilidad celular

Para obtener los datos pertinentes a la viabilidad celular, nos basamos en el protocolo estandarizado por nano entek, se tomó 5.0 µL de células en resuspensión, se le añadió 5.0 µL de azul de tripan^{1.20}, la solución de azul de tripan y células en resuspensión fue preparada a una relación 1:1, y este paso fue realizado para cada plato con célula transfectadas antes de transfectar y luego, de transfectarlas. En un porta objeto el cual es específico para nano entek, se le añadió 5.0 µL de la solución preparada y fue introducido en el equipo EVE y el equipo calcula la cantidad de células muertas, células viables y brinda el valor de la viabilidad celular. Adicional a esto, también brinda la cantidad de células que hay en cada plato. Además, se procedió a utilizar las curvas de crecimiento de cada célula transfectada creadas por el equipo EVE.

2.21. Transfección de células HEK293T

Un plato de 6 pozos fue plateado con 1 millón de células. Después de 24 h, el plato fue transfectado con 1.0 µg de cada vector proveniente del clonaje de pQCXIH con cada parte extracelular de los receptores inmunológicos. Después de 6 h, el medio fue cambiado con medio de cultivo nuevo con 2% de suero de ternera (medio de mantenimiento). Después de 48 h, se tomó el sobrenadante y las células fueron centrifugadas.

2.22. Microscopía de inmunofluorescencia

Las células transfectadas por lentivirus, fueron evaluadas en el microscopio de inmunofluorescencia con el filtro rojo, para observar la presencia de células que fluorescencia en rojo al adquirir el plasmido pQCXIH previamente clonado.

2.23. Aislamiento y purificación de las proteínas por marcadores de histidina

Las células centrifugadas fueron lisadas con urea a 8 M, luego fueron cnetrifugadas las muestras, y seguido de ello, se lavo el pellet con Tween al 0.1% en PBS 1X y se evaluó la localización de las proteínas. Después, se utilizaron triton 100X y Tween como detergentes para aumetar la afinidad de las proteínas, y se procedió a realizar cromatografía de afinidad a colas de hisitina para la purificaión

2.24. Verificación de la purificación por gel SDS-PAGE.

Las eluciones de la purificación fueron montadas en gel de acrilamida 10% y fueron separadas en el gel, y luego, se le realizó la tinción con comassie y se aclaró el gel para evaluar las purificaciones.

2.25 Identificación de proteínas desconocidas por Western Blot anti-histidina

Las elución final fue montada en gel de acrilamida al 10% y fueron separadas, luego transferidas a la membrana, se bloqueo con leche al 5% en buffer TBST (contiene tris, PBS y Tween). 1X, y se incubó con anticuerpo que detecta proteínas que tengan colas de histidinas, después, se agrego el anticuerpo secundario que reacciono contra el epitome del primer anticuerpo y al final, se realizó la reacción de inmunofluorescencia.

Capítulo III

Resultados

3.1. Resultados.

Luego de realizar los procedimientos para la obtención de células competentes, la transformación bacteriana de *E. coli* XL10 GOLD resultó exitosa, al introducirle el plásmido pQCXIH y pGEX4T1. Se obtuvo la eficiencia de transformación de *E. coli* XL-10 GOLD (9.4×10^9 UFC/ μ g). Durante las fases de la PCR, se obtuvieron las bandas esperadas, de cada amplificación del dominio extracelular de los receptores AXL, CD32, CLEC5A y CLEC7A. La secuencia de genes del receptor MERTK no amplificó (figura). De las digestiones enzimáticas se obtuvo de forma exitosa el corte de los vectores plasmídico pQCXIH y pGEX4T1. Adicional a esto, se obtuvieron los clonajes en cada vector plasmídico de los dominios extracelulares de los receptores AXL, CD32, CLEC5A, y CLEC7A. De las UFC de *E. coli* XL-10 Gold que crecieron de cada clonaje, se obtuvo UFC positivas que determinaron la presencia de los receptores AXL, CD32, CLEC5A y CLEC7A.

Luego de realizar los clonajes de cada receptor inmunológico ligados al vector pGEX4T1, se obtuvo la transformación de *E. coli* BL21 DE3 pLysS. Y al inducir con IPTG las bacterias, se obtuvo la expresión de los receptores inmunológicos la cual fue evaluada mediante western blot. De forma simultánea se obtuvieron células HECK293FT expresando dominios extracelulares de los receptores AXL, CD32, CLEC5A y CLEC7A. Estas células tenían una viabilidad celular de 73%, con una concentración de 2.3×10^6 /mL. Posteriormente de las transfecciones por lentivirus, se obtuvo células que fluorescieron en rojo como indicador de que las células HECK293FT incorporaron el vector pQCXIH con las secuencias de genes de cada receptor extracelular.

Finalmente, se obtuvieron 2 proteínas recombinantes en condiciones desnaturizantes, se obtuvo 765 mg/ μ l de AXL y 488 mg/ μ l de CLEC7A, y fueron identificadas mediante western blot.

1. Elaboración de vectores y Expresión de proteínas en células HEK293

1.1 Construcción de los vectores para expresión en células HEK293

1.1.1 Restricción Enzimática del vector de expresión y de los productos de PCR.

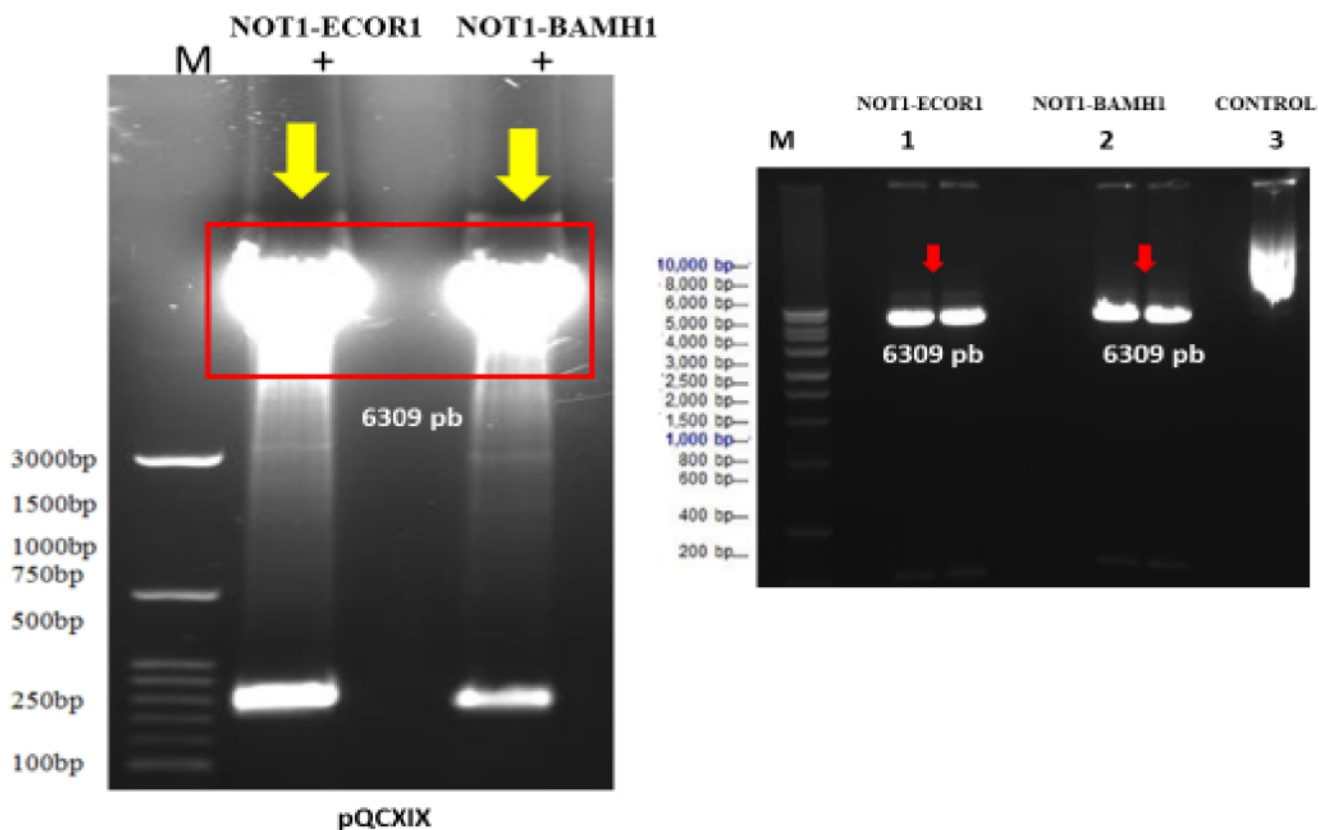


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa, en donde se muestra la restricción enzimática del plásmido pQCXIX, utilizando 2 combinaciones de dianas de restricción, para lograr abrir el plásmido de expresión.

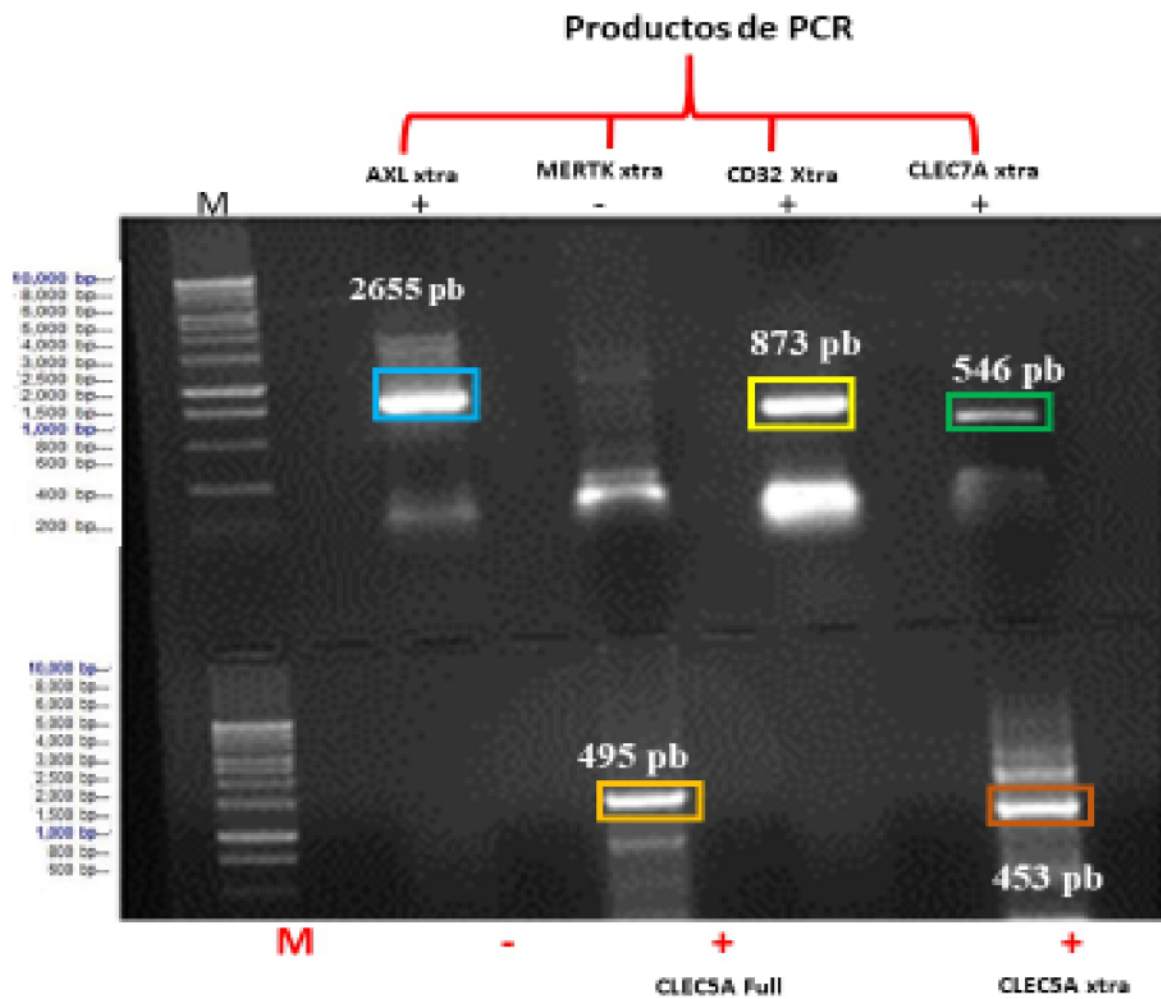


Figura 20. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones de los receptores extracelulares para ser ligados al plasmido pQCXIX y lograr los clonajes.

1.2 Evaluación de PCR de las colonias de pQCXIH ligados a los genes de los dominos extracelulares y evaluación de la presencia del vector pET-30a en dos bacterias de clonaje.

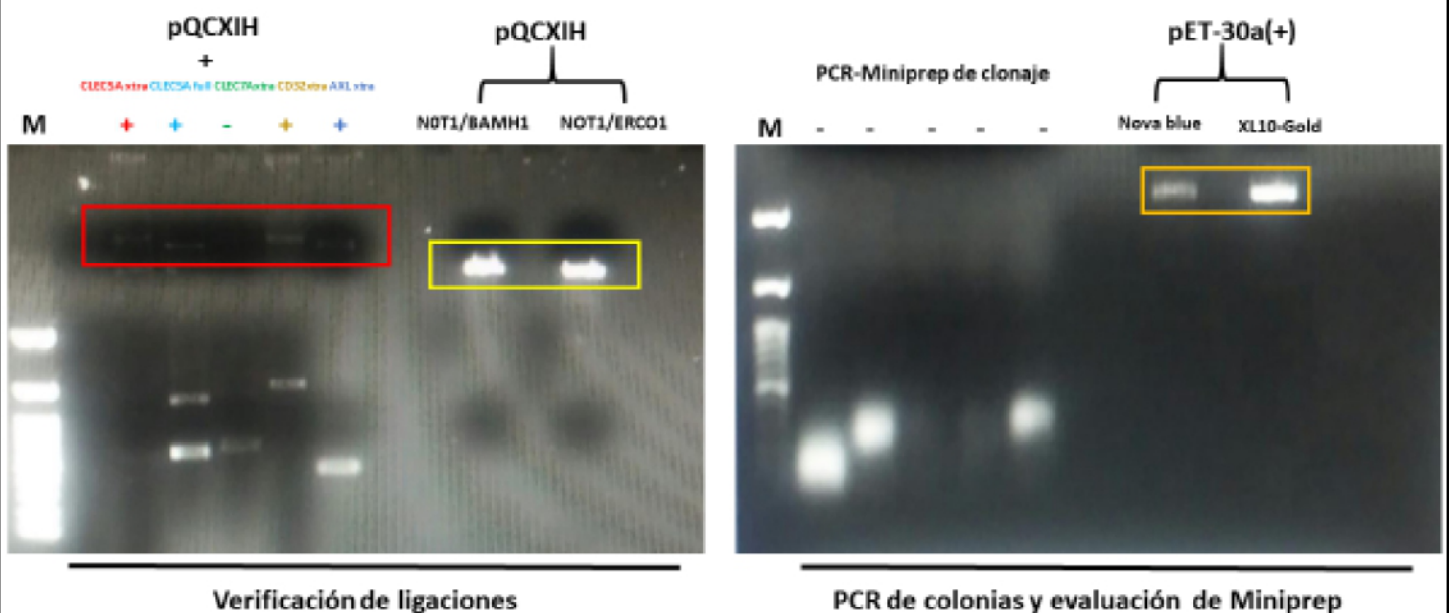


Figura 21. Resultados de electroforesis. A). Verificación de las ligaciones del plásmido abierto con los receptores amplificados través de electroforesis en agarosa, comparados al plásmido vacío. B). verificación de los clonajes realizados, luego de una extracción plasmídica.

1.3 Evaluación de colonias positivas por PCR y digestión enzimática.

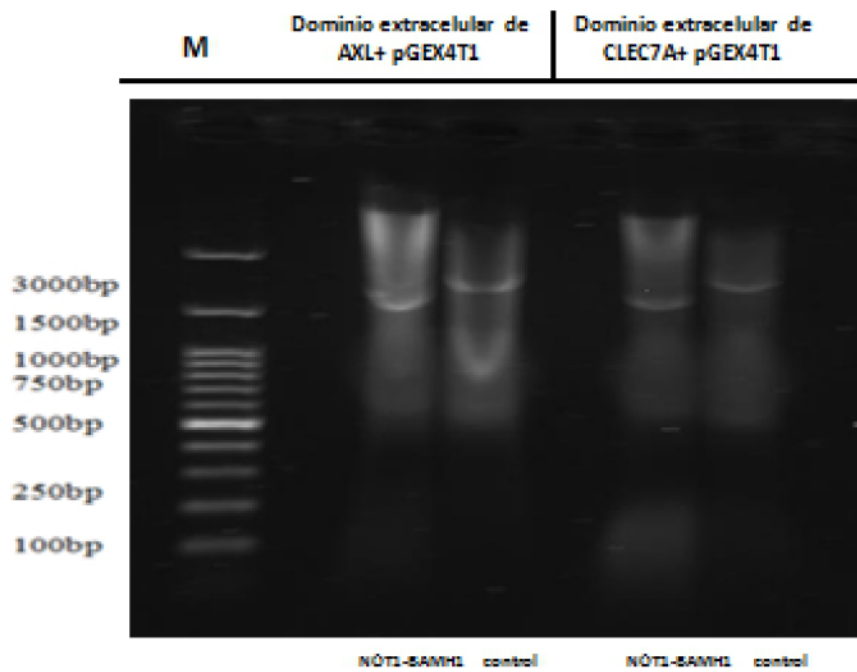


Figura 22. Resultados de la evaluación por restricción enzimática del clonaje, de los receptores AXL y CLEC7A al plasmido pQCXIX.

1.4 Resultados de la transfección de las células HEK293T.

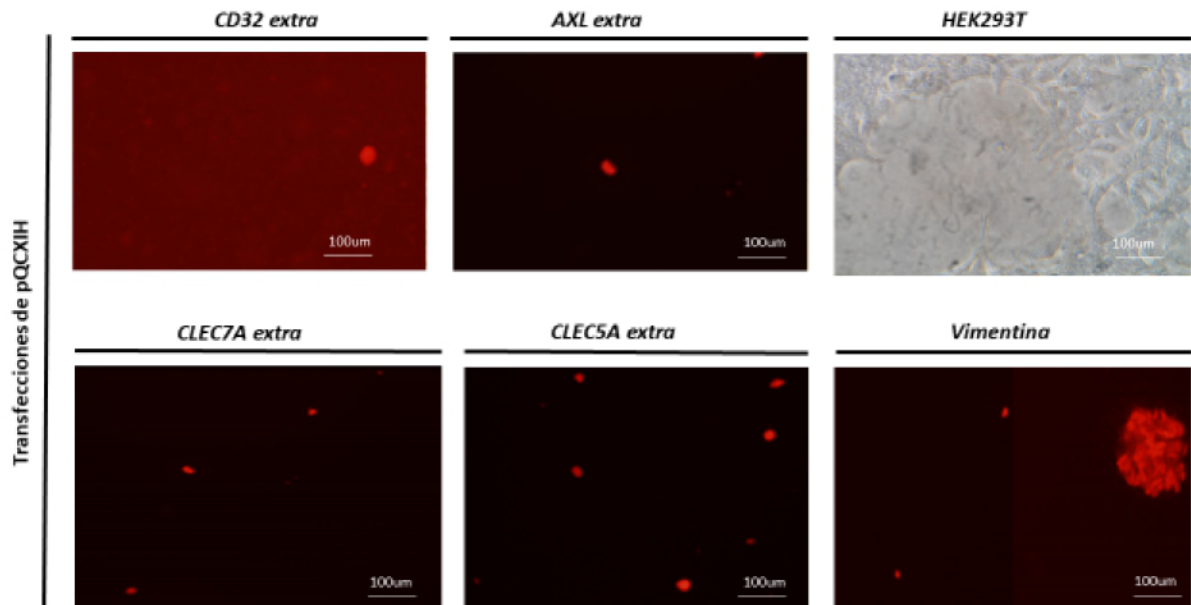


Figura 23. Verificación de transfección de las células HEK293FT en microscopia de fluorescencia. HEK293FT con el vector pQCXIH ligado al dominio extracelular de CD32. HEK293 expresando el dominio extracelular de AXL, CLEC7A y CLEC5A. Las células mostraron luego de 3 días de transfección poca intensidad de fluorescencia, y se procedió a realizar lisados de la purificación, en donde se noto la producción de proteínas a baja concentración.

1.5 Purificación de los dominios extracelulares expresados en HEK293T.

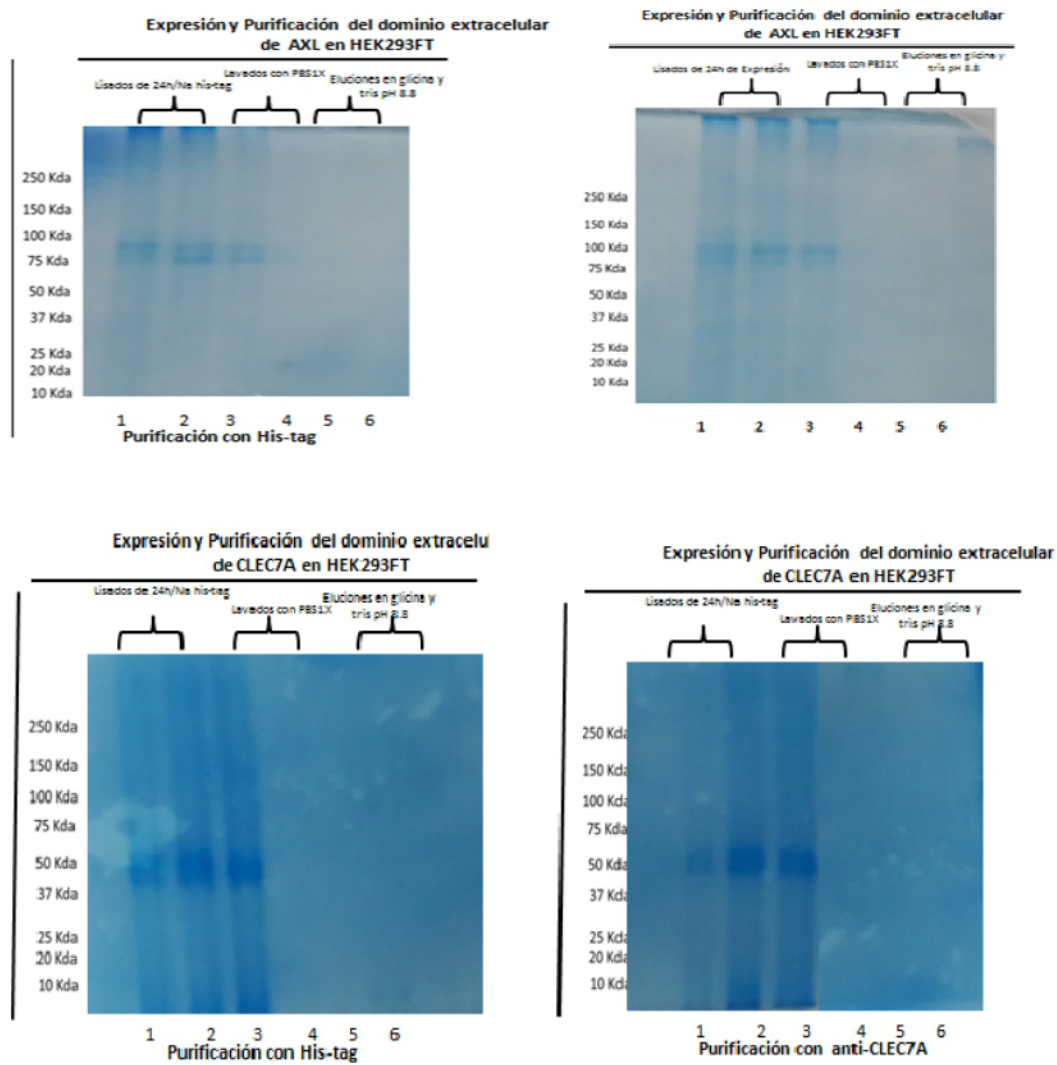


Figura 24. Resultados de SDS Page en donde la expresión de los dominios extracelulares en células HEK293T no fue exitosa, ni la purificación, por ende se procedió a cambiar de sistema de expresión en bacterias.

1.6 Resultados de la inmunodetección de los receptores extracelulares por anticuerpos.

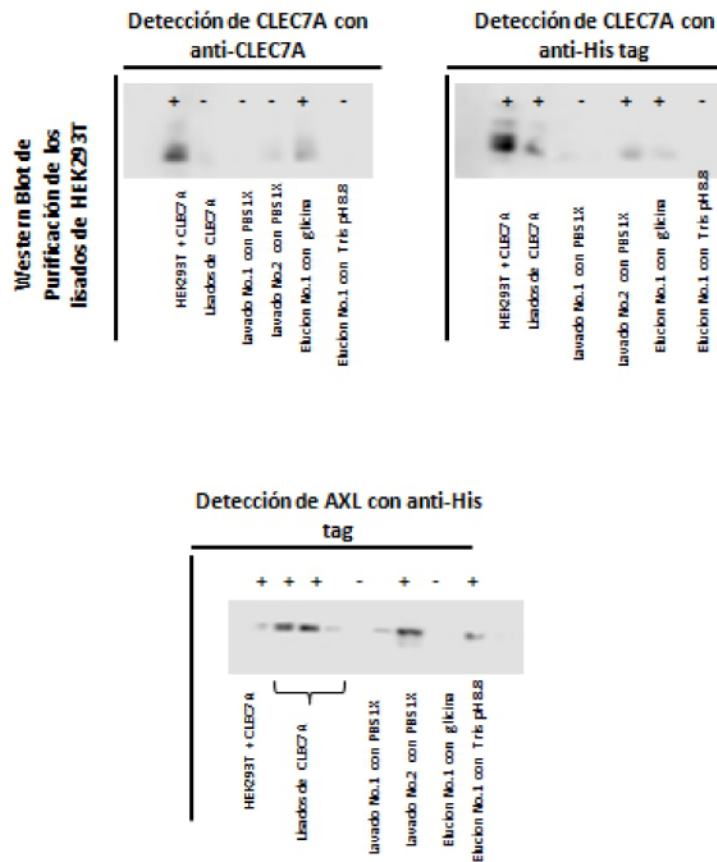


Figura 25. Resultados de western blot, en donde se purificó el dominio extracelular de AXL y de CLEC7A, y se confirmó mediante la técnica de western blot, utilizando colas de histidina para culminar la purificación y de forma simultánea, detectar la proteína con su propio anticuerpo (Anti -CLEC7A y Anti-AXL)

2. Elaboración de vectores y Expresión de proteínas en *E.coli* BL21 (DE3)

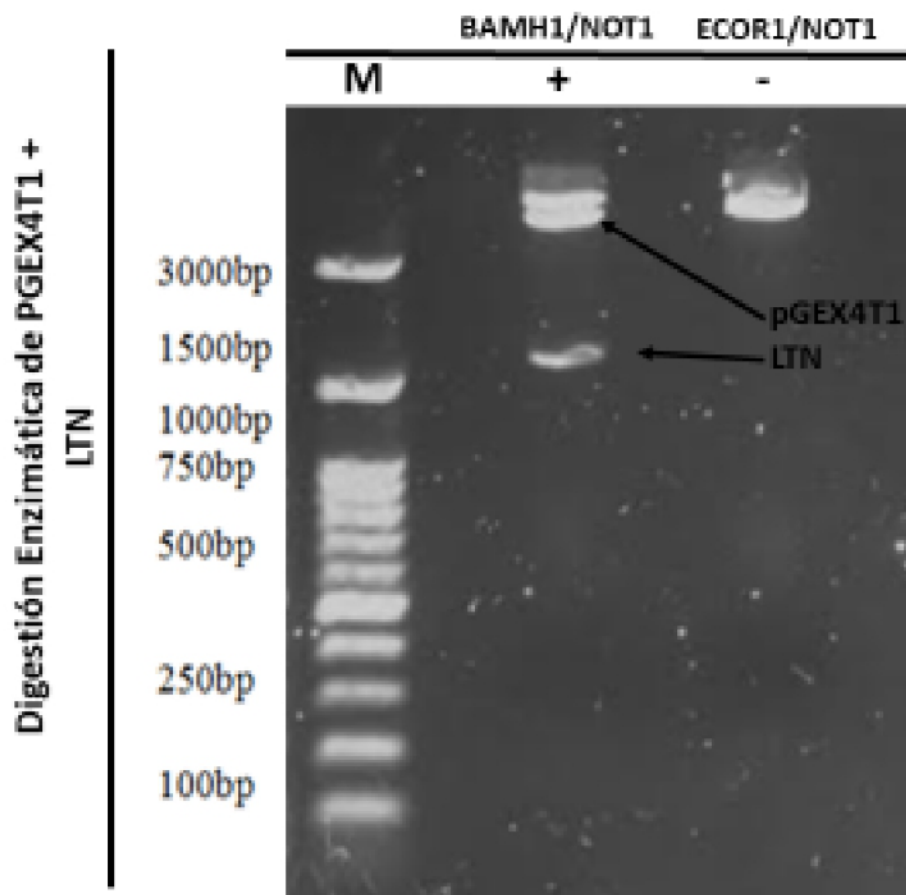


Figura 26. Resultados de electroforesis en donde el plásmido pGEX4T1 fue digerido con las dianas de restricción BAMH1 y NOT1, y con la combinación de E.cori 1 y Not1, en donde solo pudo ser digerido con BAMH y NOT1.

2.1 PCR de dominios extracelulares y Digestión enzimática del vector pGEX4T1.

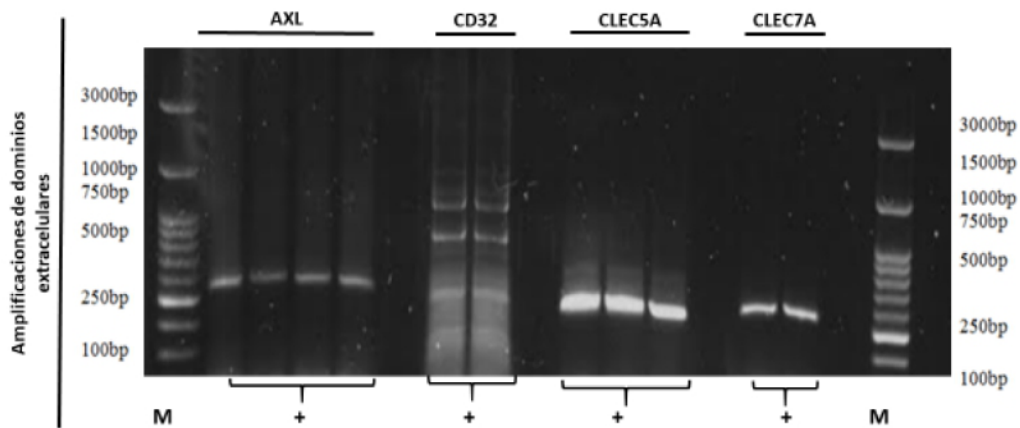


Figura 27. Resultados de electroforesis los cuales muestran las amplificación de las secuencias de los genes de cada dominio extracelular de los receptores, y se construyeron los nuevos clonajes, los cuales fueron evaluador por PCR y digestión enzimática.

2.2 Evaluación de las UFC positivas del suclonaje.

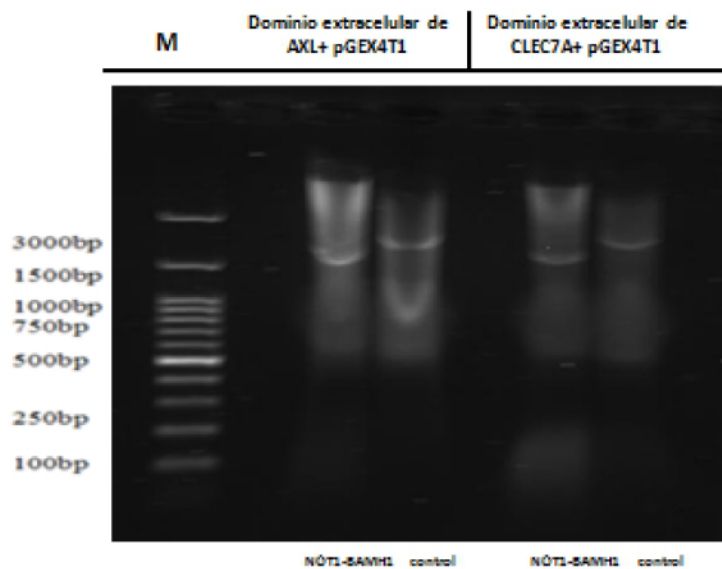


Figura 28. Resultados de la evaluación por restricción enzimática del clonaje, de los receptores AXL y CLEC7A al plásmido pGEX4T1.

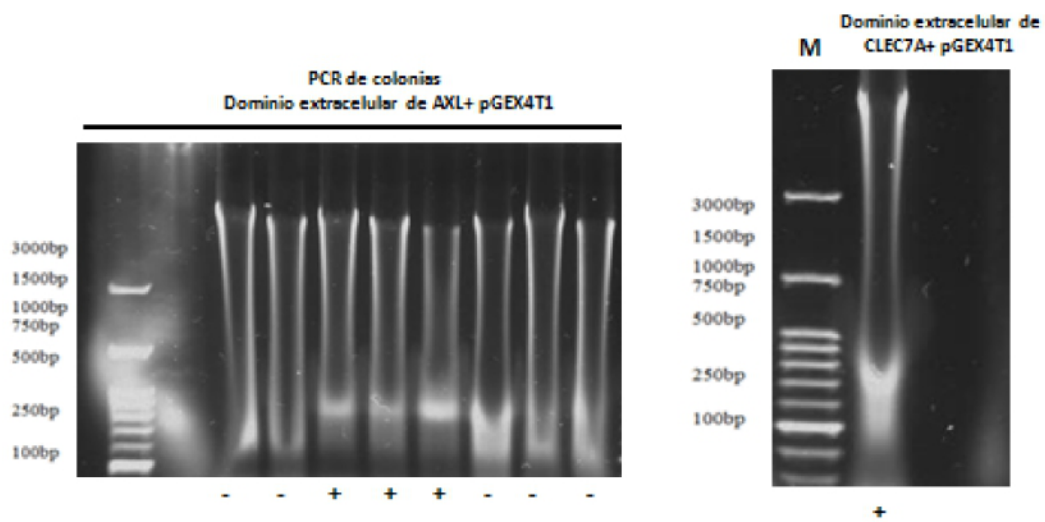


Figura 29. Evaluación de los clonajes de los dominios extracelulares al plásmido pGEX4T1. A). Resultados de la PCR del extracelular de la proteína AXI ligado a pGE4T1 B). Resultados de la PCR de la ligación y clonaje del dominio extracelular de CLEC7A a pGE4T1.

2.3 expresión de proteínas recombinantes en E.coli BL21 (DE3)

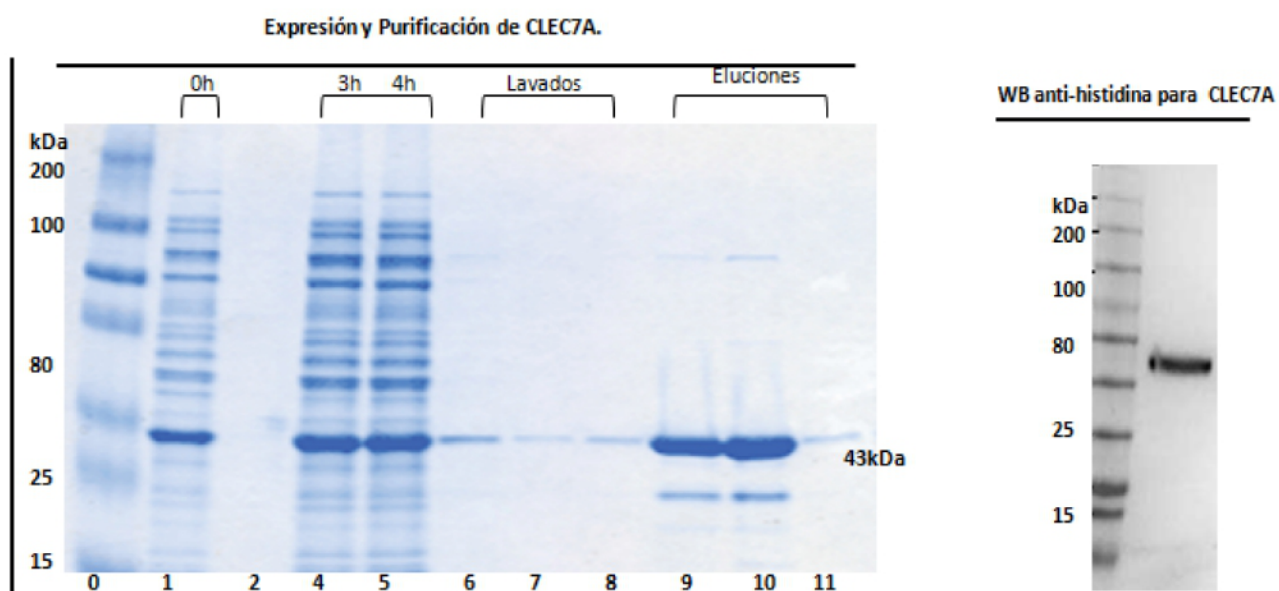


Figura 30. Resultados de SDS Page. A). producción y purificación de proteínas recombinantes en la cepa BL21, en donde en un lapso de 4 horas hay una concentración óptima de proteínas. b). Resultados de inmunodetección con anticuerpos para identificar proteínas desconocidas, en esta parte de los resultados la elución final fue sometida a western blot.

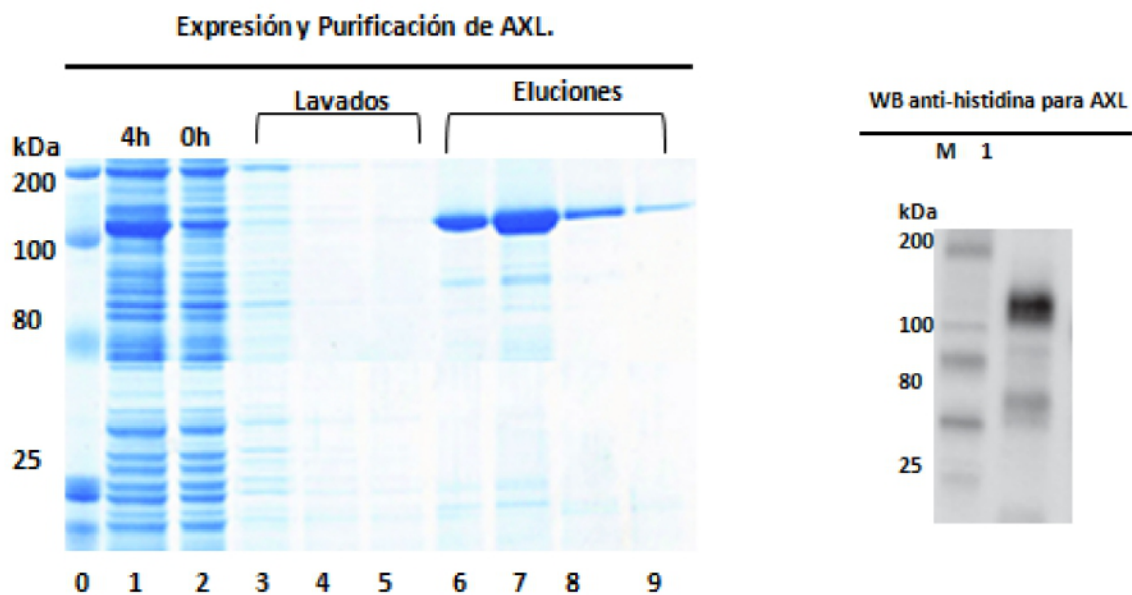


Figura 31. Resultados de las proteínas expresadas en la cepa *E.coli* BL21 (DE3). fueron obtenidas en mayor concentración y fueron evaluadas mediante Western Blot. Se purificó el dominio extracelular de AXL y CLEC7A.

Capítulo IV

Discusión

En este trabajo, los resultados obtenidos de las amplificaciones y clonaciones del dominio extracelular de los receptores CLEC5A, AXL, CD32 y CLEC7A, son comparables con el trabajo realizado por Lu *et al.*, (2017), quienes elaboraron amplificaciones y clonaciones de diferentes fragmentos de los 849 aa que tiene el receptor AXL. La importancia yace en que AXL está sobreexpresado en cáncer de pulmón, páncreas y en cáncer de mama. Y que el dominio extracelular de AXL, transduce señalizaciones que se correlacionan a las quimio resistencias de pequeños tumores de cáncer de pulmón (Lu *et al.*, 2017). Lee (2015), reportó que la parte extracelular de AXL está asociada a la ligación de una linfotoxina (LIGTH) presente en linfomas de células T y que inhibir el dominio extracelular de AXL, es la base para reprimir la expresión de linfotoxinas, y con esto, se logra disminuir el volumen y crecimiento de tumores (Lee *et al.*, 2015). La expresión de esta proteína en condiciones desnaturalizantes fueron óptimas, se pudo purificar y obtenerla para futuras aplicaciones.

Por otra parte, los resultados obtenidos de la amplificación del dominio extracelular del receptor CLEC5A, serán claves para aportar nuevos registros, ya que no hay referencias de algunos cebadores que hayan utilizado para amplificar estas secuencias de genes, de los 288 aminoácidos que forman al receptor CLEC5A. Aunque esta proteína no pudo ser expresada por no dar positiva la clonación, se puede seguir trabajando en esta clonación para lograr la expresión de esta proteína, ya que es importante dilucidar su rol en cáncer y aportar nuevos datos. Este dominio tiene interacciones con TYROBP/DAP12. Teng (2015), reportó las respuestas inmunes de CLEC5A frente a infecciones por bacterias. Según Batliner (2012), el dominio extracelular del receptor CLEC5A, es un nuevo objetivo transcripcional durante la diferenciación meiloidal, porque se asocia con una proteína adaptadora DAP12 para activar una cascada de señalización, que activa quinasas en respuestas inflamatorias en pacientes con leucemias. Los reportes que asocian a CLEC5A con algún tipo de cáncer, son aun incipientes y por ende, podríamos ser los primeros en reportar interacciones de CLEC5A con cáncer.

La construcción de la clonación del dominio extracelular del receptor CLEC7A, estuvo basada en la posición 66 a la 266 de los aminoácidos que forman el dominio extracelular

del receptor como tal. Este receptor está altamente expresado en macrófagos en el adenocarcinoma y el dominio extracelular, interactúa con otros receptores indispensables en la inmunidad anti-tumor (Daley *et al.*, 2017). Esta expresión fue exitosa, en donde se logró establecer los primeros métodos de purificación de receptores asociados en cáncer, lo cual, es aplicable al campo de la inmunología, ya que con este receptor se pueden realizar proyectos en donde se evalúen los efectos específicos de este receptor.

El dominio extracelular del receptor CD32 que fue amplificado, constó de 174 aminoácidos, donde el receptor CD32 está conformado por 310 aminoácidos, pero el dominio extracelular inicia en el aminoácido 43 y termina en el 217. Yang (2017), menciona que el dominio extracelular de CD32 está ligado a FcγRII y activan la ruta p38MAPK-Twist, y mejora la secreción de citosinas en células osteolíticas, en mielomas. El CD32 es un marcador de la activación de las células T y la expresión de CD32, está asociada con proliferación celular en tumores (Badia *et al.*, 2018). Este receptor no pudo ser expresado mediante bacterias de expresión, pero se puede volver a realizar los clonajes específicos evaluando en detalle el vector a utilizar y estandarizando los métodos de una mejor forma.

Los resultados de las restricciones enzimáticas de los vectores pQCXIH y pGEX4T1 en la parte delantera con Eco RI y Bam HI, en la parte de reversa con NotI, que fueron realizadas en las fases de digestión enzimática, son comparable con las restricciones y clonajes realizados por Vogl *et al.* (2015), quienes digirieron 40 vectores plasmídicos con dos enzimas de restricción *Eam* 1104I y *Bsa* I y clonados en *E.coli*. Los clones positivos de las ligaciones de los dominios extracelulares de AXL y CLEC7A se obtuvieron en *E.coli* XL-10 GOLD, porque esta cepa es la que tiene una mejor eficiencia de clonaje con fragmentos grandes de ADN. Wang *et al.* (2014), realizaron el clonaje del plásmido pSVK-HBVA en la cepa XL-10 GOLD, el cual tiene 16 KB y concluyeron con que esta cepa, que es la más adecuada para realizar clonajes de fragmentos grandes de ADN.

Las expresiones de los dominios extracelulares de los receptores AXL, y CLEC7A en bacterias BL21 (DE3), son contrastables con la expresión de proteína recombinante

realizada por Kiaie *et al.* (2014), quienes utilizaron el vector plasmídico pGEX4T1 clonado con el factor de patogenicidad llamado TcpA y obtuvieron 8 mg/L de TcpA expresado y purificado. Otra expresión de proteínas recombinantes similar a la realizada en este trabajo, es la de Yunta *et al.* (2011), quienes expresaron la quinasa SnRK2.6/OST1, utilizando el mismo vector plasmídico pGEX4T1 y *E.coli* BL21 (DE3) pLysS. Estas bacterias utilizadas en la expresión de las proteínas, carecen totalmente de la actividad de las cuatro [NiFe]-hidrogenasas, sin embargo, tienen todos los genes estructurales necesarios para la síntesis de las respectivas proteínas en mayor volumen y de manera más sencilla (Pinske *et al.*, 2011).

Estas proteínas serán de gran relevancia en estudios de interacciones, según Bae *et al.* (2015), se pueden realizar modulaciones proteolíticas contra AXL, las cuales serían las bases de una nueva terapia contra este receptor.

Conclusiones

- Los dominios extracelulares de los receptores fueron expresados en bacterias, debido a que estas bacterias pudieron adquirir el vector plasmídico, para la expresión heteróloga de cada proteína.
- La expresión en HEK293FT fue aun más costosa de lo esperado, ya que las células no fluorescieron de la manera esperada al ser observadas en microscopía de inmunofluorescencia. La expresión de los dominios extracelulares fueron obtenidos en menor escala en comparación con las bacterias.
- Las proteínas expresadas, fueron aisladas y purificadas, lo cual haría posible inyectarlas en modelos animales para inmunizarlos y generar nanocuerpos contra estas proteínas.

Recomendaciones

1. Estandarizar una PCR anidada, que amplifique la secuencia de genes que solo codifiquen la parte extracelular. Diseñar otros cebadores específicos para MERTK.
2. Clonar en un plásmido pET11b las secuencias de genes de CLEC5A y CD32 para lograr realizar ensayos de interacciones con CLEC5A, ya que no existen referencias que lo asocien a cáncer y podríamos ser los primeros en evidenciar esto.
3. Verificar el estado funcional de las proteínas expresadas.
4. Inyectar las proteínas purificadas en modelos animales, y partir de allí, para la elaboración de nanocuerpos para cada proteína, y así, probarlos en un futuro, en modelos *in-vivo*.

Referencias Bibliográficas

Referencias Bibliográficas

1. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum R, Bast RC, Gansler TS, Holland JF, editors (2003). *Oncogenes in the initiation and progression of neoplasia*. Cancer medicine <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/query.fcgi?db=books&cmd=search&term=oncogen>
2. Litman GW, Rast JP, Shablott MJ, et al (1993). «Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire». *Mo Biol. Evol.* 10 (1):60-72. PMID 8450761.
3. Dean, Laura (2005). «Chapter 4: Hemolytic disease of the newborn». *Blood Groups and Red Cell Antigens*. NCBI Bethesda (MD): National Library of Medicine (US).
4. Ghaffer A (26 de marzo de 2006). «Immunization». *Immunology - Chapter 14*. University of South Carolina School of Medicine. Archivado desde el original el 30 de noviembre de 2015. Consultado el 6 de junio de 2007.
5. Hunt EA, Moutsopoulos A, Broyles D, Head T, Dikici E, Daunert S, Deo SK (4 de agosto 2016) Expression of a soluble truncated Vargula luciferase in *Escherichia coli* pii: S1046-5928(17)30027-X. doi: 10.1016/j.pep.2017.01.007.
6. Kagi B, Ledermann Burki R. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Ann Rev Immunol* 1994; 12: 207-32.
7. JanewayChA, Travers P. En: Janeway FC receptor-bearing accessory cells in humoral immunity. En: JanewayChA, Travers P. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. Currentbiology. London: Garland, 1997:t 8:24-8;32.
8. Yanagita T, Murata Y, Tanaka D, Motegi SI, Arai E, Daniwijaya EW, Hazama D, Washio K, Saito Y, Kotani T, Ohnishi H, Oldenborg PA, Garcia N, Miyasaka M, Ishikawa O, Kanai Y, Komori T, Matozaki T. Anti-SIRP α antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. *Jan* 12;2(1):e89140. doi: 10.1172/jci.insight.89140.
9. Bona CA, Bonilla FA. *Textbook of immunology*. Second edition. Amsterdam: Harwood Academic Publisher; 199
10. Anticuerpos monoclonales terapéuticos. Informe de vigilancia tecnológica. Genoma España, Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid. Consultado el 13 de junio de 2012.
11. Rojas W, Cano LE. *Inmunología*. 12a edición. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2001. p.155-6.
12. Parnes J. T-cell differentiation antigens: Proteins, genes and function. *Bioessays* 1987;4(6):255-9.
13. Hannet I, ErkellerYuksel F, Lydyard P, Deneys V, DeBruyere M. Development and malnutritional changes in human blood lymphocyte subpopulation. *ImmunolToday* 1992;13(6):215-8.
14. Sahin U, Tureci O, Schmitfr H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R et al. Human neoplasms elicit multiple specific immune response in the autologous host. *Immunology* 1995; 92: 11810-
15. Kasture VS, Musmade DS, Aher SJ, Patil PP. Tyrosine Kinases: promising targets for cancer chemotherapy. *Med Chem Drug Discov.* 2012; 2(2): 37-51

16. Mossman TR, Sad S. The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol* 1996; 17:138-96. 20.
17. Kagi B, Ledermann Burki R. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Currentbiology*. London:Garland, 1997;t 8:24-8;32.
18. Lambrecht BN, Pauwels RA, Fasekas D. Induction of rapid T cell activation, division, and recirculation by intratracheal injection of dendritic cell in a TCR transgenic model. *J Immunol* 2000; 164: 2937-46
19. Ben-Efrain S. One hundred years of cancer Immunotherapy. A criticalappraisal. *Tumor Biol* 1999; 20: 1-24.
20. Abba AK, Lichtman AH, Pober JS. Immunity to tumors. En: Abbas AK, Lichtman AH, Pober TS. *Cellular and Molecular Immunology*. W.B Saunder, 1994:357-75.
21. Villaverde A and Carrio M. Protein Aggregation in Recombinant Bacteria: Biological Role of Inclusion Bodies. *Biotechnology Letters* (2003), vol. 25, p. 1385– 1395.
22. Kane F and Hartley L. Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* (1988), vol. 6, p. 95–101.
23. Jonasson P, Lilijevqvist S, Nygren A and Stahl S. Genetic Design for Facilitated Production and Recovery of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and appliedbiochemistry* (2002), vol. 35, p. 91–105.
24. Morgan – Kiss R, Wadler C and Cronan J. Long-term and Homogeneous Regulation of the *Escherichia coli* arabad Promoter by Use of a Lactose Transporter of Relaxed Specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2002), vol. 99, p. 7373–7377. 69.
25. Khlebnikov A and Keasling D. Effect of lacy Expression on Homogeneity of Induction from the P(tac) and P(trc) Promoters by Natural and Synthetic Inducers. *Biotechnologyprogress* (2002), vol.18, p. 672–674.
26. Ehrnsperger M, Graber S, Gaestel M and Buchner J. Binding of Nonnative Protein to Hsp25 During Heat Shock Creates a Reservoir of Folding Intermediates for Reactivation. *EMBO J.* (1997), vol. 16, p. 221–229. 71.
27. Veinger L, Diamant S, Buchner J and Goloubinoff P. The Small Heatshock Protein ibpbf from *Escherichia coli* Stabilizes Stress-denatured Proteins for Subsequent Refolding by a Multichaperone Network. *Journal of biologicalchemistry* (1998), vol. 273, p. 11032–11037
28. Bessette h, Aslund f, Beckwith j and Georgiou g. Efficient Folding of Proteins with Multiple Disulfide Bonds in the *Escherichia coli* Cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1999), vol. 96, p. 13703– 13708. 77.
29. Wall G and Pluckthun A. Effects of Overexpressing Folding Modulators on the in vivo Folding of Heterologous Proteins in *Escherichia coli*. *Currentopinion in Biotechnology* (1995), vol. 6, p. 507–516.
30. Derman I, Prinz A, Belin D and Beckwith J. Mutations that allow Disulfide Bond Formation in the Cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* (1993), vol. 262, p. 1744–1747.

31. Proba K, GE M and Pluckthun A. Functional Antibody Singlechain Fragments from the Cytoplasm of Escherichia coli: Influence of Thioredoxin Reductase (trxb). *Gene* (1995), vol. 159, p. 203–207.
32. Bowden A and Georgiou G. Folding and Aggregation of Beta lactamasa in the Periplasmic Space of Escherichia coli. *Journal of biologicalchemistry* (1990), vol. 265, p. 16760–16766
33. Watson AA1, Christou CM, James JR, Fenton-May AE, Moncayo GE, Mistry AR, Davis SJ, Gilbert RJ, Chakera A, O'Callaghan CA (2009). The platelet receptor CLEC-2 is active as a dimer. *Biochemistry*. Nov 24;48(46):10988-96. doi: 10.1021/bi901427d
34. Verma A, Warner SL, Vankayalapati H, Bearss DJ, Sharma S (2011). Targeting Axl and Mer kinases in cancer. *Mol Cancer Ther*. Oct;10(10):1763-73
35. Korshunov VA. Axl-dependent signalling: a clinical update. *Clin Sci (Lond)*. 2012 Apr;122(8):361-8
36. Viralkumar Davra, Stanley G. Kimani, David Calianese and Raymond B. Birge 2016. Ligand Activation of TAM Family Receptors-Implications for Tumor Biology and Therapeutic Response.
37. Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle HH, Behrndt S, von Tengg-Kobligk H, Kiessling F, Eichelsbacher U, Essig M, Read TA, Erber R, Ullrich A (Apr 2006). "Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (15): 5799–804. doi:10.1073/pnas.0510923103. PMC 1458653. PMID 16585512.
38. Nowakowski TJ, Pollen AA, Di Lullo E, Sandoval-Espinosa C, Bershteyn M, Kriegstein AR (2016). "Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells". *Cell Stem Cell*. 18 (5): 591–596. doi:10.1016/j.stem.2016.03.012. ISSN 1934-5909. PMID 27038591
39. Weier HU, Fung J, Lersch RA (Jun 1999). "Assignment of protooncogene MERTK (a.k.a. c-mer) to human chromosome 2q14.1 by in situ hybridization". *Cytogenetics and Cell Genetics*. 84 (1-2): 91–2. doi:10.1159/000015223. PMID 10343112.
40. Lauren Shelby Page, Xiaodong Wang, H. Shelton Earp III, Stephen Frye, Craig T Jordan and Alisa B. Lee-Sherick (2016) MerTK Receptor Tyrosine Kinase Inhibition As a Potential Strategy to Augment Immune-Mediated Clearance of Acute Myeloid Leukemia *Blood* 2016 128:4044
41. Katherine A. Minson,¹ Catherine C. Smith,² Deborah DeRyckere, Clara Libbrecht, Alisa B. Lee-Sherick, Madeline G. Huey, Elisabeth A. Lasater, Gregory D. Kirkpatrick, Michael A. Stashko, Weihe Zhang, Craig T. Jordan, Dmitri Kireev, Xiaodong Wang, Stephen V. Frye, H. Shelton Earp,⁷ Neil P. Shah, and Douglas K. Graham¹. The MERTK/FLT3 inhibitor MRX-2843 overcomes resistance-conferring FLT3 mutations in acute myeloid leukemia
42. Veri MC, Gorlatov S, Li H, et al. (2007). "Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fcγ-receptor IIB (CD32B) from the activating Fcγ-receptor IIA (CD32A): biochemical, biological and functional

- characterization". *Immunology*. 121 (3): 392–404. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02588.x. PMC 2265948. PMID 17386079.
43. Fridman WH (Sep 1991). "Fc receptors and immunoglobulin binding factors". *FASEB Journal*. 5 (12): 2684–90. PMID 1916092.
 44. Indik ZK, Park JG, Hunter S, Schreiber AD (Dec 1995). "The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis". *Blood*. 86 (12): 4389–99. PMID 8541526.
 45. MacGlashan D Jr, Hamilton RG. Parameters determining the efficacy of CD32 to inhibit activation of FcεRI in human basophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Apr;137(4):1256-8.e1-11. doi: 10.1016/j.jaci.2015.10.043. Epub 2016 Jan 7.
 46. Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA (September 1996). "Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog". *The Journal of Membrane Biology*. 153 (1): 75–81. doi:10.1007/s002329900111. PMID 8694909.
 47. Greenwalt DE, Watt KW, So OY, Jiwani N (July 1990). "PAS IV, an integral membrane protein of mammary epithelial cells, is related to platelet and endothelial cell CD36 (GP IV)". *Biochemistry*. 29 (30): 7054–9. doi:10.1021/bi00482a015. PMID 1699598.
 48. Ge Y, Elghetany MT (2005). "CD36: a multiligand molecule". *Laboratory Hematology : Official Publication of the International Society for Laboratory Hematology*. 11 (1): 31–7. doi:10.1532/LH96.04056. PMID 15790550.
 49. Selwan EM, Finicle BT, Kim SM, Edinger AL (April 2016). "Attacking the supply wagons to starve cancer cells to death". *FEBS Letters*. 590 (7): 885–907. doi:10.1002/1873-3468.12121. PMC 4833639 . PMID 26938658.
 50. Kuda O, Pietka TA, Demianova Z, Kudova E, Cvacka J, Kopecky J, Abumrad NA (May 2013). "SulfoN-succinimidyl oleate (SSO) inhibits fatty acid uptake and signaling for intracellular calcium via binding CD36 lysine 164: SSO also inhibits oxidized low density lipoprotein uptake by macrophages". *The Journal of Biological Chemistry*. 288 (22): 15547–55. doi:10.1074/jbc.M113.473298. PMID 23603908.
 51. Wang, Y., Zhang, L., Zhang, W., Wu, H., Zhu, X. M., Xu, Y. J. Yu, J. Y. (2015). plasmid-based DNA vaccine construct (16 kb pSVK-HBVA) production in *Escherichia coli* XL10-Gold through optimization of media component. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 29(1), 164–174 <http://doi.org/10.1080/13102818.2014.989103>
 52. Adediran, J., Leatham-jensen, M. P., Mokszycki, M. E., Frimodt-møller, J., & Kroghfelt, K. A. (2014). An *Escherichia coli* Nissle 1917 Missense Mutant Colonizes the Streptomycin-Treated Mouse Intestine Better than the Wild Type but Is Not a Better Probiotic, 82(2), 670–682. <https://doi.org/10.1128/IAI.01149-13>
 53. Article, R., Parizad, E. G., Parizad, E. G., & Valizadeh, A. (2016). The Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis in Clinical Studies, 10(1), 1–4. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/15718.7043>
 54. Asher, W. B., & Bren, K. L. (2010). A heme fusion tag for protein affinity purification and quantification, 19(July), 1830–1839. <https://doi.org/10.1002/pro.460>
 55. Axelrod, H., & Pienta, K. J. (2014). Axl as a mediator of cellular growth and survival, 5(19).

56. Bansal, N., Mishra, P. J., Stein, M., Dipaola, R. S., & Joseph, R. (2015). Axl receptor tyrosine kinase is up-regulated in metformin resistant prostate cancer cells, 6(17).
57. Bayard, V., Chamorro, F., Motta, J., & Hollenberg, N. K. (2007). Does Flavanol Intake Influence Mortality from Nitric Oxide-Dependent Processes? Ischemic Heart Disease, Stroke, Diabetes Mellitus, and Cancer in Panama, 4(1), 53–58.
58. Busk, P. K. (2014). A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR. *BMC Bioinformatics*, 15(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-29>
59. Cackowski, F., Eber, M. R., Rhee, J., Decker, A., Yumoto, K., Berry, E., ... Taichman, R. S. (2017). *HHS Public Access*, 118(4), 891–902. <https://doi.org/10.1002/jcb.25768>
60. Chan, K., Wong, P., Yu, P., Hardick, J., Wong, K., Wilson, A., ... Wong, S. S. (2016). A Rapid and Low-Cost PCR Thermal Cycler for Infectious Disease Diagnostics, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149150>
61. Chen, L., Zhai, L., Li, Y., Li, N., Zhang, C., & Ping, L. (2015). Development of Gel-Filter Method for High Enrichment of Low-Molecular Weight Proteins from Serum, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115862>
62. Chen, S., Li, F., Hsu, T., Liang, S., Yeh, Y., Liao, W., ... Hsieh, S. (s/f). CLEC5A is a critical receptor in innate immunity against *Listeria* infection. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00356-3>
63. Cheng, Y., Johnson, M. D. L., Burillo-kirch, C., Mocny, J. C., Anderson, J. E., Garrett, C. K., ... Thomas, E. (2013). Mutation of the Conserved Calcium-Binding Motif in *Neisseria gonorrhoeae* PilC1 Impacts Adhesion but Not Piliation, 81(11), 4280–4289. <https://doi.org/10.1128/IAI.00493-13>
64. Costa, S., Almeida, A., Castro, A., & Domingues, L. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system, 5(February), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00063>
65. Cui, Y., Hu, T., Qu, X., Zhang, L., Ding, Z., & Dong, A. (2015). Plasmids from Food Lactic Acid Bacteria: Diversity, Similarity, and New Developments, 13172–13202. <https://doi.org/10.3390/ijms160613172>
66. Datey, A., Subbur, J., Gopalan, J., & Chakravorty, D. (2017). Mechanism of transformation in *Mycobacteria* using a novel shockwave assisted technique driven by in-situ generated oxyhydrogen. *Scientific Reports*, (July), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08542-5>
67. Delagoutte, E., & Baldacci, G. (2011). 5 CAG and 5 CTG Repeats Create Differential Impediment to the Progression of a Minimal Reconstituted T4 Replisome Depending on the Concentration of dNTPs, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/213824>
68. Devidas, P. C., Pandit, B. H., & Vitthalrao, P. S. (2014). Evaluation of Different Culture Media for Improvement in Bioinsecticides Production by Indigenous *Bacillus thuringiensis* and Their Application against Larvae of *Aedes aegypti*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/273030>
69. Dna, G. (2015). Label-free detection of kanamycin based on a G-quadruplex DNA aptamer-based fluorescent intercalator displacement assay, 14–16. <https://doi.org/10.1038/srep08125>
70. Durán, M. C., Willenbrock, S., Barchanski, A., Müller, J. V, Maiolini, A., Soller, J. T.,

- ... Escobar, H. M. (2011). Comparison of nanoparticle-mediated transfection methods for DNA expression plasmids: efficiency and cytotoxicity. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), 47. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-47>
71. Dvorak, P., Chrast, L., Nikel, P. I., Fedr, R., Soucek, K., Sedlackova, M., ... Damborsky, J. (2015). Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21 (DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microbial Cell Factories*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0393-3>
 72. England, C. G., Luo, H., & Cai, W. (2015). HaloTag Technology: A Versatile Platform for Biomedical Applications. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00191>
ERRATUM In the March issue of BACTERIOLOGICAL REVIEWS, reference 26 in the Review. (s/f), 26.
 73. Fey, M. F., Torbett, B. E., & Tschan, M. P. (2012). *NIH Public Access*, 48(4), 714–719. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.10.016.CLEC5A>
 74. Gabe, C. M., Brookes, S. J., & Kirkham, J. (2017). Preparative SDS PAGE as an Alternative to His-Tag Purification of Recombinant Amelogenin, 8(June). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00424>
 75. Gay, C. M., Balaji, K., & Byers, L. A. (2017). Giving AXL the axe : targeting AXL in human malignancy. *Nature Publishing Group*, 116(4), 415–423. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.428>
 76. Ghosh, R., Gilda, J. E., Gomes, A. V., & Biology, M. (2016). accuracy of western blots, 11(5), 549–560. <https://doi.org/10.1586/14789450.2014.939635.The>
 77. Gilda, J. E., Ghosh, R., Cheah, J. X., West, T. M., Bodine, S. C., & Gomes, A. V. (2015). Western blotting inaccuracies with unverified antibodies: Need for a Western Blotting Minimal Reporting Standard (WBMRS). *PLoS ONE*, 10(8), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135392>
 78. Gili, C., Bonsembiante, F., Bonanni, R., Giordano, A., Ledda, S., Beffagna, G., ... Gelain, M. E. (2016). Detection of hereditary bisalbuminemia in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus* , Montagu 1821): comparison between capillary zone and agarose gel electrophoresis. *BMC Veterinary Research*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0801-x>
 79. Gode-potratz, C. J., Chodur, D. M., & Mccarter, L. L. (2010). Calcium and Iron Regulate Swarming and Type III Secretion in, 192(22), 6025–6038. <https://doi.org/10.1128/JB.00654-10>
 80. Gomes-pereira, M., & Monckton, D. G. (2017). Ethidium Bromide Modifies The Agarose Electrophoretic Mobility of CAG • CTG Alternative DNA Structures Generated by PCR, 11(May), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00153>
 81. Guerrini, F., Paolicchi, M., Ghio, F., Ciabatti, E., Grassi, S., Salehzadeh, S., ... Galimberti, S. (2016). The Droplet Digital PCR: A New Valid Molecular Approach for the Assessment of B-RAF V600E Mutation in Hairy Cell Leukemia, 7(October), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00363>
 82. Hakansson, A. P., Roche-hakansson, H., Mossberg, A., & Svanborg, C. (2011). Apoptosis-Like Death in Bacteria Induced by HAMLET , a Human Milk Lipid-Protein Complex, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017717>
 83. Hensley, S. A., Moreira, E., & Holden, J. F. (2016). Hydrogen Production and Enzyme Activities in the Hyperthermophile *Thermococcus paralvinellae* Grown on Maltose , Tryptone , and Agricultural Waste, 7(February), 1–13.

- <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00167>
84. HHS Public Access. (2016). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0601s80>. Overview Hogervorst, J. G., Fortner, R. T., Mucci, L. A., Tworoger, S. S., Eliassen, H., Hankinson, S. E., & Wilson, K. M. (2014). hormone levels, 1–22. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-0509>. Associations
85. Huang, Y., Chen, S., Liu, R., Chen, Y., Lin, C., Huang, C., ... Liao, C. (2016). CLEC5A is critical for dengue virus-induced osteoclast activation and bone homeostasis. *Journal of Molecular Medicine*, 1025–1037. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1409-0>
86. Ibrahim-hashim, A., Abrahams, D., Enriquez-navas, P. M., Luddy, K., Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2017). progression and metastasis. <https://doi.org/10.1002/cam4.1032>
87. Iniesta, A. A. (2012). Two Systems for Conditional Gene Expression in *Myxococcus xanthus* Inducible by Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside or Vanillate, 194(21), 5875–5885. <https://doi.org/10.1128/JB.01110-12>
88. Jafari, A., Mm, A., & Bouzari, S. (2012). *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran, 4(3), 102–117.
89. Jakob, V., Brunner, L., Barnier-quer, C., Blust, M., Collin, N., Carter, L., ... Fox, C. B. (2017). Accounting for adjuvant-induced artifacts in the characterization of vaccine formulations by polyacrylamide gel electrophoresis, 31–38. <https://doi.org/10.1177/https>
90. Ji, X., Tang, C., Zhao, Q., Wang, W., & Xiong, Y. (2014). Structural basis of cellular dNTP regulation by SAMHD1, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412289111>
91. Johnsen, J., Miller, E. L., Ambur, O. H., Engelsta, J., & Rozen, D. E. (2016). Steady at the wheel : conservative sex and the benefits of bacterial transformation.
92. Kanlikilicer, P., Ozpolat, B., Aslan, B., Bayraktar, R., Gurbuz, N., Rodriguez-aguayo, C., ... Lopez-berestein, G. (2017). Therapeutic Targeting of AXL Receptor Tyrosine Kinase Inhibits Tumor Growth and Intraperitoneal Metastasis in Ovarian Cancer Models. *Molecular Therapy: Nucleic Acid*, 9(December), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.06.023>
93. Keschull, J. M., & Zador, A. M. (2015). Sources of PCR-induced distortions in high-throughput sequencing data sets, 43(21), 1–15. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv717>
94. Kim, H. J., & Tang, R. (2015). Peptide-enhanced mRNA transfection in cultured mouse cardiac fibroblasts and direct reprogramming towards cardiomyocyte-like cells, 1841–1854.
95. Kram, K. E., & Finkel, S. E. (2015). Rich Medium Composition Affects *Escherichia coli* Survival , Glycation , and Mutation Frequency during Long-Term Batch Culture, 81(13), 4442–4450. <https://doi.org/10.1128/AEM.00722-15>
96. Kru, S., Pinske, C., & Bo, M. (2011). Metabolic Deficiencies Revealed in the Biotechnologically Important Model Bacterium *Escherichia coli* BL21 (DE3), 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022830>
97. Kunkel, J., & Asuri, P. (2014). Function , Structure , and Stability of Enzymes Confined in Agarose Gels, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086785>
98. Lade, H., Kadam, A., Paul, D., & Govindwar, S. (2015). A Low-Cost Wheat Bran Medium for Biodegradation of the Benzidine-Based Carcinogenic Dye Trypan

- Blue Using a Microbial Consortium, 3480–3505.
<https://doi.org/10.3390/ijerph120403480>
99. Laremore, T. N., Ly, M., Solakyildirim, K., Zagorevski, D. V, & Linhardt, R. J. (2011). NIH Public Access, 401(2), 236–241.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.03.004.High-resolution>
100. Li, J., Yang, Y., Mao, Z., Huang, W., Qiu, T., & Wu, Q. (2016). Enhanced Resolution of DNA Separation Using Agarose Gel Electrophoresis Doped with Graphene Oxide. *Nanoscale Research Letters*. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1609-0>
101. Magdeldin, S., Enany, S., Yoshida, Y., Xu, B., Zhang, Y., Zureena, Z., & Lokamani, I.(2014). Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis, 1–10.
102. Medina, D., Walke, J. B., Gajewski, Z., Becker, M. H., Swartwout, M. C., & Belden, L. K. (2017). Culture Media and Individual Hosts Affect the Recovery of Culturable Bacterial Diversity from Amphibian Skin, 8(August), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01574>
103. Millar, D., Christova, Y., & Holliger, P. (2015). A polymerase engineered for bisulfite sequencing, 43(22), 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv798>
104. Moradigaravand, D., & Engelstädter, J. (2014). The impact of natural transformation on adaptation in spatially structured bacterial populations, 1–9.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-141>
105. Mun, X., & Olle, M. (2014). Persistence of Asthmatic Response after Ammonium Persulfate-Induced Occupational Asthma in Mice, 9(10), 1–7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109000>
106. Muraki, K., Han, L., Miller, D., & Murnane, J. P. (2013). The Role of ATM in the Deficiency in Nonhomologous End-Joining near Telomeres in a Human Cancer Cell Line, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003386>
107. Muraki, K., Han, L., Miller, D., & Murnane, J. P. (2015). Processing by MRE11 is involved in the sensitivity of subtelomeric regions to DNA double-strand breaks, 43(16), 7911–7930. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv714>
108. Nguyen, K. N., Tsou, W., Calarese, D. A., Kimani, S. G., Singh, S., Hsieh, S., ... Birge, R. B. (2014). Overexpression of MERTK Receptor Tyrosine Kinase in Epithelial Cancer Cells Drives Efferocytosis in a Gain-of-Function Capacity *, 289(37), 25737–25749. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.570838>
109. Nikzad, J., Shahhosseini, S., Tabarzad, M., Nafissi-varcheh, N., & Torshabi, M. (2017). Simultaneous detection of bovine and porcine DNA in pharmaceutical gelatin capsules by duplex PCR assay for Halal authentication, 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s40199-017-0171-3>
110. Paulo, J. A., Jong, A. De, Ova, H., Alpi, A. F., & Wade, J. (2017). HHS Public Access, 166(5), 1198–1214. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.027.Two>
111. Pieper, R., Zhang, Q., Clark, D. J., Huang, S., Suh, M., John, C., ... Tzipori, S. (2011). Characterizing the Escherichia coli O157: H7 Proteome Including Protein Associations with Higher Order Assemblies, 6(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026554>
112. Pronobis, M. I., Deutch, N., & Peifer, M. (2016). The Miraprep : A Protocol that Uses a Miniprep Kit and Provides Maxiprep Yields, (Table 1), 1–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160509>

113. Pujol-pina, R., Vilaprinyó-pascual, S., Mazzucato, R., & Arcella, A. (2015). SDS-PAGE analysis of A β oligomers is disserving research into Alzheimer ' s disease : appealing for ESI-IM-MS. *Nature Publishing Group*, (October), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep14809>
114. Sakoulas, G., Bayer, A. S., Pogliano, J., Tsuji, B. T., Yang, S., Mishra, N. N., ... Moise, P. A. (2012). Mediated Killing of Ampicillin- and Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*, 838–844. <https://doi.org/10.1128/AAC.05551-11>
115. Sanderson, B. A., Araki, N., Lilley, J. L., Guerrero, G., & Lewis, L. K. (2015). NIH Public Access, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.03.003.Modification>
116. Schneider, U. V., Mikkelsen, N. D., Lindqvist, A., Okkels, L. M., & Jøhnk, N. (2012). Improved Efficiency and Robustness in qPCR and Multiplex End-Point PCR by Twisted Intercalating Nucleic Acid Modified Primers, 7(6), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038451>
117. Shagin, D. A., Shagina, I. A., Zaretsky, A. R., & Barsova, E. V. (2017). OPEN A high-throughput assay for quantitative measurement of PCR errors, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02727-8>
118. Silva, J. M., & McMahon, M. (2014). The Fastest Western in Town : A Contemporary Twist on the Classic Western Blot Analysis, (February), 1–8. <https://doi.org/10.3791/51149>
119. Spangler, R., Goddard, N. L., & Thaler, D. S. (2009). Optimizing Taq Polymerase Concentration for Improved Signal-to-Noise in the Broad Range Detection of Low Abundance Bacteria, 4(9), 4–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007010>
120. Spath, K., Heintl, S., & Grabherr, R. (2012). “ Direct cloning in *Lactobacillus plantarum*: Electroporation with non-methylated plasmid DNA enhances transformation efficiency and makes shuttle vectors obsolete ”. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-141>
121. Stotz, H. U., Findling, S., Nukarinen, E., Weckwerth, W., Mueller, M. J., & Berger, S. (2014). A tandem af fi nity puri fi cation tag of TGA2 for isolation of interacting proteins in *Arabidopsis thaliana*, 1–10.
122. Süle, J., Kőrösi, T., Hucker, A., & Varga, L. (2014). Evaluation of culture media for selective enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria, 1030, 1023–1030.
123. Summary, C. (2015). The Biology of the *Escherichia coli* Extracellular Matrix, 3(3), 1–24. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0014-2014.The>
124. Sundararajan, M., Thomas, P. A., Teresa, P. A., & Anbukkarasi, M. (2016). Regulatory effect of chrysin on expression of lenticular calcium transporters , calpains , and apoptotic-cascade components in selenite-induced cataract, (April), 401–423.
125. Termini, J. M., Silver, Z. A., Connor, B., Antonopoulos, A., Haslam, M., Dell, A., & Desrosiers, R. C. (2017). HEK293T cell lines defective for O-linked glycosylation, 1–19.
126. Ton, T. G. N., Gladding, S. P., Zunt, J. R., John, C., Nerurkar, V. R., Moyer, C. A., ... Kolars, J. C. (2015). The Development and Implementation of a Competency-Based Curriculum for Training in Global Health Research, 92(1), 163–171. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0398>
127. Vogl, T., Ahmad, M., Krainer, F. W., Schwab, H., & Glieder, A. (2015). Restriction site free cloning (RSFC) plasmid family for seamless , sequence independent

- cloning in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0293-6>
128. Wang, C., Jin, H., Wang, N., Fan, S., Wang, Y., Zhang, Y., & Wei, L. (2016). The r a n o s t i c s Gas6 / Axl Axis Contributes to Chemoresistance and Metastasis in Breast Cancer through Akt / GSK-3 β / β - catenin Signaling, 6(8). <https://doi.org/10.7150/thno.15083>
 129. Wang, Y., Tian, R. M., Gao, Z. M., Bougouffa, S., & Qian, P. (2014). Optimal Eukaryotic 18S and Universal 16S / 18S Ribosomal RNA Primers and Their Application in a Study of Symbiosis, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090053>
 130. Wu, J., Luo, X., & Yan, L. (2015). Two dimensional blue native / SDS-PAGE to identify mitochondrial complex I subunits modified by 4-hydroxynonenal (HNE), 6(March), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00098>
 131. Wu, X., Liu, X., Koul, S., Lee, C. Y., & Zhang, Z. (s/f). AXL kinase as a novel target for cancer therapy, 5(20).
 132. Yamagami, T., Ishino, S., Kawarabayasi, Y., Ishino, Y., Li, Z., & Oceangrapic, S. (2014). Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering, 5(September), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00461>
 133. Yamashige, R., Kimoto, M., Takezawa, Y., Sato, A., Mitsui, T., Yokoyama, S., & Hirao, I. (2012). Highly specific unnatural base pair systems as a third base pair for PCR amplification, 40(6), 2793–2806. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1068>
 134. Yan, L., & Forster, M. J. (2010). NIH Public Access, 389(2), 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.03.043.Resolving>
 135. Yang, L., Wang, X., Deng, W., Mo, W., Gao, J., & Liu, Q. (2016). Using HEK293T Expression System to Study Photoactive Plant Cryptochromes, 7(June), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00940>
 136. Yost, A. D., & Joshi, S. G. (2015). Atmospheric Nonthermal Plasma-Treated PBS Inactivates *Escherichia coli* by Oxidative DNA Damage, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139903>
 137. Zhang, S., & Cahalan, M. D. (2007). Purifying Plasmid DNA from Bacterial Colonies Using the Qiagen Miniprep Kit, 2007. <https://doi.org/10.3791/247>
 138. Zhang, W., Yuan, Z., Huang, L., Kang, J., Jiang, R., & Zhong, H. (2016). Titanium Dioxide Photocatalytic Polymerization of Acrylamide for Gel Electrophoresis (TIP PAGE) of Proteins and Structural Identification by Mass Spectrometry. Nature Publishing Group, (January), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep20981>
 139. Grisanti, S., Szurman, P., Tatar, O., Gelisken, F., Aisenbrey, S., Oficjalska-Mlynczak, J., Bartz- Schmidt, K. U. (2004). Histopathological analysis in experimental macular surgery with trypan blue. *The British Journal of Ophthalmology*, 88(9), 1206–1208.
 140. Zúñiga-Soto, E., Mullins, E., & Dedicova, B. (2015). Ensifer-mediated transformation: an efficient non-Agrobacterium protocol for the genetic modification of rice. SpringerPlus, 4, 600.
 141. Grisanti, S., Szurman, P., Tatar, O., Gelisken, F., Aisenbrey, S., Oficjalska-Mlynczak, J., Bartz- Schmidt, K. U. (2004). Histopathological analysis in experimental

- macular surgery with trypan blue. *The British Journal of Ophthalmology*, 88(9), 1206–1208.
142. Huang, S.-B., Chou, D., Chang, Y.-H., Li, K.-C., Chiu, T.-K., Ventikos, Y., & Wu, M.-H. (2015). Development of a pneumatically driven active cover lid for multi-well microplates for use in perfusion three-dimensional cell culture. *Scientific Reports*, 5, 18352. <http://doi.org/10.1038/srep18352>
143. Henderson, K., Stella, S. L., Kobylewski, S., & Eckhart, C. D. (2009). Receptor Activated Ca^{2+} Release Is Inhibited by Boric Acid in Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE*, 4(6), e6009. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0006009>.
144. Martinez-Andrade, J. M., Avalos-Borja, M., Vilchis-Nestor, A. R., Sanchez-Vargas, L. O., & Castro-Longoria, E. (2018). Dual function of EDTA with silver nanoparticles for root canal treatment—A novel modification. *PLoS ONE*, 13(1), e0190866. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0190866>
145. Ata, S., Imran Din, M., Rasool, A., Qasim, I., & Ul Mohsin, I. (2012). Equilibrium, Thermodynamics, and Kinetic Sorption Studies for the Removal of Coomassie Brilliant Blue on Wheat Bran as a Low-Cost Adsorbent. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2012, 405980. <http://doi.org/10.1155/2012/405980>
146. Kang, C.-C., Yamauchi, K. A., Vlassakis, J., Sinkala, E., Duncombe, T. A., & Herr, A. E. (2016). Single cell-resolution western blotting. *Nature Protocols*, 11(8), 1508–1530. <http://doi.org/10.1038/nprot.2016.089>.
147. Lu, Y., Wan, J., Yang, Z., Lei, X., Niu, Q., Jiang, L., Wu, F. (2017). Regulated intramembrane proteolysis of the AXL receptor kinase generates an intracellular domain that localizes in the nucleus of cancer cells. *The FASEB Journal*, 31(4), 1382–1397. <http://doi.org/10.1096/fj.201600702R>.
148. Lee, E.-H., Kim, E.-M., Young, K.-J., Park, A.-R., Choi, H.-R., Lee, H.-Y., Kang, H.-S. (2017). Axl acts as a tumor suppressor by regulating LIGHT expression in T lymphoma. *Oncotarget*, 8(13), 20645–20655. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.15830>
149. Teng, O., Chen, S.-T., Hsu, T.-L., Sia, S. F., Cole, S., Valkenburg, S. A., Yen, H.-L. (2017). CLEC5A-Mediated Enhancement of the Inflammatory Response in Myeloid Cells Contributes to Influenza Virus Pathogenicity In Vivo. *Journal of Virology*, 91(1), e01813–16. <http://doi.org/10.1128/JVI.01813-16>
150. Batliner, J., Mancarelli, M. M., Jenal, M., Reddy, V. A., Fey, M. F., Torbett, B. E., & Tschann, M. P. (2011). CLEC5A (MDL-1) is a novel PU.1 transcriptional target during myeloid differentiation. *Molecular Immunology*, 48(4), 714–719. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.10.016>
151. Daley, D., Mani, V. R., Mohan, N., Akkad, N., Ochi, A., Heindel, D. W., Miller, G. (2017). Dectin-1 Activation on Macrophages by Galectin-9 Promotes Pancreatic Carcinoma and Peritumoral Immune-Tolerance. *Nature Medicine*, 23(5), 556–567. <http://doi.org/10.1038/nm.4314>
152. Yang, J., Liu, Z., Liu, H., He, J., Yang, J., Lin, P., Yi, Q. (2017). C-reactive protein promotes bone destruction in human myeloma through the CD32-p38MAPK-Twist axis. *Science Signaling*, 10(509), eaan6282. <http://doi.org/10.1126/scisignal.aan6282>
153. Badia, R., Ballana, E., Castellví, M., García-Vidal, E., Pujantell, M., Clotet, B., ... Esté, J. A. (2018). CD32 expression is associated to T-cell activation and is not a

- marker of the HIV-1 reservoir. *Nature Communications*, 9, 2739. <http://doi.org/10.1038/s41467-018-05157-w>
154. Vogl, T., Ahmad, M., Krainer, F. W., Schwab, H., & Glieder, A. (2015). Restriction site free cloning (RSFC) plasmid family for seamless, sequence independent cloning in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 14, 103. <http://doi.org/10.1186/s12934-015-0293-6>
155. Wang, Y., Zhang, L., Zhang, W., Wu, H., Zhu, X. M., Xu, Y. J., ... Yu, J. Y. (2015). Increasing plasmid-based DNA vaccine construct (16 kb pSVK-HBVA) production in *Escherichia coli* XL10-Gold through optimization of media component. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 29(1), 164–174. <http://doi.org/10.1080/13102818.2014.989103>
157. Kiaie, S., Abtahi, H., Mosayebi, G., Alikhani, M., & Pakzad, I. (2014). Recombinant toxin-coregulated pilus A (TcpA) as a candidate subunit cholera vaccine. *Iranian Journal of Microbiology*, 6(2), 68–73.
158. Yunta, C., Martinez-Ripoll, M., & Albert, A. (2011). SnRK2.6/OST1 from *Arabidopsis thaliana*: cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of K50N and D160A mutants. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 67(Pt 3), 364–368. <http://doi.org/10.1107/S1744309110053807>
159. Pinske, C., Bönn, M., Krüger, S., Lindenstrauß, U., & Sawers, R. G. (2011). Metabolic Deficiencies Revealed in the Biotechnologically Important Model Bacterium *Escherichia coli* BL21(DE3). *PLoS ONE*, 6(8), e22830. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0022830>
160. Nogales, A., Chauché, C., DeDiego, M. L., Topham, D. J., Parrish, C. R., Murcia, P. R., & Martínez-Sobrido, L. (2017). The K186E Amino Acid Substitution in the Canine Influenza Virus H3N8 NS1 Protein Restores Its Ability To Inhibit Host Gene Expression. *Journal of Virology*, 91(22), e00877–17. <http://doi.org/10.1128/JVI.00877-17>
161. Gao J., Zhang, C., Fu, X., Yi, Q., Tian, F., Ning, Q., & Luo, X. (2013). Effects of Targeted Suppression of Glutaryl-CoA Dehydrogenase by Lentivirus-Mediated shRNA and Excessive Intake of Lysine on Apoptosis in Rat Striatal Neurons. *PLoS ONE*, 8(5), e63084. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0063084>
162. Chaudhary, P., Khan, S. Z., Rawat, P., Augustine, T., Raynes, D. A., Guerriero, V., & Mitra, D. (2016). HSP70 binding protein 1 (HspBP1) suppresses HIV-1 replication by inhibiting NF- κ B mediated activation of viral gene expression. *Nucleic Acids Research*, 44(4), 1613–1629. <http://doi.org/10.1093/nar/gkv1151>
163. Bae, S. Y., Hong, J.-Y., Lee, H.-J., Park, H. J., & Lee, S. K. (2015). Targeting the degradation of AXL receptor tyrosine kinase to overcome resistance in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 6(12), 10146–10160.
164. Partanen, J., Mäkelä, T. P., Alitalo, R., Lehväslaiho, H., & Alitalo, K. (1990). Putative tyrosine kinases expressed in K-562 human leukemia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(22), 8913-7.
- Partanen, J., Mäkelä, T. P., Alitalo, R., Lehväslaiho, H., & Alitalo, K. (1990). Putative tyrosine kinases expressed in K-562 human leukemia cells. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87(22), 8913-7.
165. Marder, L. S., Lunardi, J., Renard, G., Rostirolla, D. C., Petersen, G. O., Nunes, J. E., de Souza, A. P., de O Dias, A. C., Chies, J. M., Basso, L. A., Santos, D. S., ... Bizarro, C. V. (2014). Production of recombinant human annexin V by fed-batch cultivation. *BMC biotechnology*, 14, 33. doi:10.1186/1472-6750-14-33
166. Nowakowski, A. B., Wobig, W. J., & Petering, D. H. (2014). Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics : integrated biometal science*, 6(5), 1068–1078. doi:10.1039/c4mt00033a
167. Kalia N, Kaur M, Sharma S, Singh J. A Comprehensive *in Silico* Analysis of Regulatory SNPs of Human CLEC7A Gene and Its Validation as Genotypic and Phenotypic Disease Marker in Recurrent Vulvovaginal Infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:65. Published 2018 Mar 20. doi:10.3389/fcimb.2018.00065
168. Chen ST, Li FJ, Hsu TY, et al. CLEC5A is a critical receptor in innate immunity against *Listeria* infection. *Nat Commun.* 2017;8(1):299. Published 2017 Aug 21. doi:10.1038/s41467-017-00356-3
169. Abdel-Mohsen M, Kuri-Cervantes L, Grau-Exposito J, et al. CD32 is expressed on cells with transcriptionally active HIV but does not enrich for HIV DNA in resting T cells. *Sci Transl Med.* 2018;10(437):eaar6759. doi:10.1126/scitranslmed.aar6759
170. Kayashima Y, Makhanova N, Maeda N. DBA/2J Haplotype on Distal Chromosome 2 Reduces Mertk Expression, Restricts Efferocytosis, and Increases Susceptibility to Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(7):e82–e91. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309522
171. Nguyen, K. Q., Tsou, W. I., Calarese, D. A., Kimani, S. G., Singh, S., Hsieh, S., ... Birge, R. B. (2014). Overexpression of MERTK receptor tyrosine kinase in epithelial cancer cells drives efferocytosis in a gain-of-function capacity. *The Journal of biological chemistry*, 289(37), 25737–25749. doi:10.1074/jbc.M114.570838
172. Happonen, K. E., Tran, S., Mörgelin, M., Prince, R., Calzavarini, S., Angelillo-Scherrer, A., & Dahlbäck, B. (2016). The Gas6-Axl Protein Interaction Mediates

Endothelial Uptake of Platelet Microparticles. *The Journal of biological chemistry*, 291(20), 10586–10601. doi:10.1074/jbc.M115.699058

Anexo

4. Secuencias de genes de los receptores inmunológicos.

1.1.MERTK

DNA:

```
1 actcaactgcc cgggccgccc ggacagggag ctctgctggc gcgcttgcc ggcgacagga
61 caggttcggg acgtccatct gtccatccgt ccggagagaa attacagatc cgcagccccc
121 ggatggggcc ggecccctg cegctgctgc tggcctctt cctccccg cctggtcgta
181 gagctatcac tgaggcaagg gaagaagcca agccttacc gctattccc ggacctttc
241 cagggagcct gcaactgac cacacaccgc tgtatccct tctcagcc agtgggtacc
301 agcctgcct gatgtttca ccaaccage ctggaagacc acatacagga aacgtagcca
361 tccccaggt gacctgtgc gaatcaaagc cctaccgccc tcttgcctc aaacacacag
421 ttggacacat aatacttct gaacataaag gtgtcaaat taattgtca atcagtgtac
481 ctaatatata ccaggacacc acaattctt ggtggaaga tgggaaggaa ttgcttgggg
541 cacatcatgc aattacacag tttatccag atgatgaagt tacagcaata atcgcttct
601 tcagcataac cagtgtgcag cgttcagaca atgggtcgt tatctgtaag atgaaaataa
661 acaatgaaga gatcgtgtct gateccatct acatcgaagt acaaggactt cctcaactta
721 ctaagcagcc tgagagcatg aatgtcacca gaaacacagc ctcaacctc acctgtcagg
781 ctgtgggccc gctgagccc gtcaacatt tctgggttca aacagtagc cgtgttaacg
841 aacagcctga aaaatcccc tccgtgctaa ctgttccagg cctgacggag atggcggtct
901 tcagtttga ggcccacaat gacaaagggc tgaccgtgc caagggagtg cagatcaaca
961 tcaagcaat tcctcccca ccaactgaag tcagcatccg taacagcact gcacacagca
1021 ttctgatctc ctgggttct gttttgatg gatactccc gttcaggaat tcagcattc
1081 aggtcaagga agctgatccg ctgagtaatg gctcagtc atgatttaac acctctgct
1141 taccatctgt taccaaatc aagcagctgc aagccctggc taattacagc attggtgtt
1201 cctgcatgaa tgaatagggc tggctgcag tgagccctg gattctagcc agcacgactg
1261 aaggagcccc atcagtagca ctttaaatg tctgtgtt tctgaatgaa tctagtata
1321 atgtggacat cagatggatg aagcctccga ctaagcagca ggatggagaa ctggtgggct
1381 accggatata ccacgtgtgg cagagtgcag ggattccaa agagctctg gaggaagtg
1441 gccagaatgg cageccagct cggatctctg tcaagtcca caatgctacg tgcacagtga
1501 ggattgcagc cgtcaccaga gggggagtg ggccttcag tgatccagtg aaaatatta
1561 tcctgcaca cggttgggta gattatgcc cctctcaac tccggcgcct ggcaacgcag
1621 atctgtgct cactcttct ggctcttt gtggattat ttgattggg ttgatttat
1681 acatctcctt ggccatcaga aaaagagtc aggagacaaa gtttgggaat gcattcacag
1741 aggaggattc tgaattagt gtgaattata tagcaaagaa atcctctgt cggcgagcca
1801 ttgaacttac ctacatagc ttgggagtca gtgaggaact acaaaataaa ctagaagatg
1861 ttgtgattga caggaatctt ctaattctg gaaaatctt ggggtgaagga gagtttgggt
1921 ctgtaatgga aggaaatctt aagcaggaag atgggacctc tctgaaagtg gcagtgaaga
1981 ccatgaagtg ggacaactct tcacagcggg agatcgagga gtttctcagt gaggcagcgt
2041 gcatgaaaga cttcagccac ccaaatgca ttcgactct aggtgtgtgt atagaatga
2101 gctctcaagg catcccaag cccatggtaa tttaccctt catgaaatac ggggacctgc
```


ADVIYVNTQLLESSEGLAQGSTLAPLDLNIDPDSIIASCTPRAAISVVTAEV
HDSKPHEGRYILNGGSEEWEDLTSAPSAAVTAEKNSVLPGERLVRNGVS
WSHS SMLPLGSSLPDELLFADDSSEGSEVLM

Dominio extracelular.

AITEAREEAK PYPLFPGPFP GSLQTDHTPL
LSLPHASGYQ PALMFSTQP GRPHTGNVAI PQVTSVESKP LPPLAFKHTV
GHIILSEHKG VKFNCSISVP NIYQDTTISW WKDGKELLGA HHAITQFYD
DEVTAIASF SITSVQRSDN GSYICKMKIN NEEIVSDPIY IEVQGLPHFT
KQPESMNVTR NTAFLNLCQA VGPPEPVNIF WVQNSSRVNE QPEKSPSVLT
VPGLTEMAVF SCEAHNDKGL TVSKGVQINI KAIPSPTEV SIRNSTAHSI
LISWVPGFDG YSPFRNCSIQ VKEADPLSNG SVMIFNTSAL PHLVQIKQLQ
ALANYSIGVS CMNEIGWSAV SPWILASTTE GAPSVAPLNV TVFLNESSDN
VDIRWMKPPT KQDQDGVY RISHVWQSAG ISKELLEEVG QNGSRARISV
QVHNATCTVR IAAVTRGGVG PFSDPVKIFI PAHGWDYAP SSTPAPGNAD

1.2.AXL

DNA:

1 agcacacgcg taaacaacac gcagaactgc agtcgcactt acaagacttg gtcccagggc
61 cgggcaccga gtggetctgc ctgcgatcca gcactttggg aggccgaggc gggaggatcg
121 cttggggcca gaagtttgag agcagcctgg gcaacgtggg ctgaacaaga catctcttt
181 ctctcgcaa gcccataacg ccaagggggt caccacatcc cgcacagcca ccatcacagt
241 gctccccag cagccccgta acctccaact ggtctcccgc caaccacgg agctggaggt
301 ggcttgact ccaggcctga gcggcatcta cccctgacc cactgcacc tgcaggctgt
361 gctgcagac gatgggatgg gcatccaggc gggagaacca gacccccag aggagccct
421 cacctgcaa gcatcctgc cccccatea gcttgggta ggcagcctcc atctcacac
481 ccttatcac atccgcgtgg catgcaccag cagccagggc cctcatct ggaccactg
541 gcttctgtg gagacgcegg agggagtgcc cctgggcccc cctgagaaca ttagtctac
601 gcggaatggg agccaggcct tctgtcattg gcaagagccc cgggcgcccc tgcagggtac
661 cctgttaggg taccggctgg cgtatcaagg ccaggacacc ccagaggtgc taatggacat
721 agggctaagg caagaggtga cctggagct gcagggggac ggtctgtgt ccaatctgac
781 agtgtgtgtg gcagcctaca ctgctgtgg ggatggacc tggagcctcc cagtaccct
841 ggaggcctgg cccccaggc aagcacagcc agtccaccag ctggtgaagg aacctcaac
901 tctgccttc tctggcctt ggtggtatgt actgctagga gcagctgtgg ccgtgcctg
961 tgcctcate ttgctctct tcttgcca cggcgaaag aaggagacc gttatggaga
1021 agtgtttgaa ccaacagtgg aaagaggtga actggtagtc aggtaccgcg tgcgcaagtc
1081 ctacagtct cggaccactg aagctacct gaacagcctg ggcatcagt aagagctgaa
1141 ggagaagctg cgggatgta tggaggacc gcacaaggtg gcctgggga agactctggg
1201 agagggagag tttggagctg tgatggaagg ccagctcaac caggacgact ccatcctcaa
1261 ggtgctgtg aagacgatga agattgcat ctgcacgagg tcagagctgg aggattcct
1321 gactgaagcg gctgcatga aggaattga ccatccaac gcatgagc tcactggtg
1381 ctgttccag gttctgac gagagactt cccagacct gtggtcatct taccttcat
1441 gaaacatgga gacctacaca gcttctct ctattcccgg ctggggacc agccagtga

1501 cctgcccact cagatgctag tgaagttcat ggcagacatc gccagtggca tggagtatct
1561 gagtaccaag agattcatac accgggacct ggcggccagg aactgcatgc tgaatgagaa
1621 catgtccgtg tgtgtggcgg acttcgggct ctccaagaag atctacaatg gggactacta
1681 ccgccaggga cgtatcgcca agatgccagt caagtggatt gccattgaga gtctagctga
1741 ccgtgtctac accagcaaga gcgatgtgtg gtccttcggg gtagacaatgt gggagattgc
1801 cacaagagge caaacccat atccgggctg ggagaacagc gagatttatg actatctgcg
1861 ccagggaaat gcctgaagc agcctgcgga ctgtctggat ggactgtatg ccttgatgc
1921 gcggtgctgg gagctaaac cccaggaccg gccaagttt acagagctgc gggagattt
1981 ggagaacaca ctgaaggcct tgcctctgc ccaggagcct gacgaaatcc tctatgtaa
2041 catggatgag ggtggagggt atcctgaacc ccctggagct gcaggaggag ctgaccccc
2101 aaccagcca gaccctaagg atctcttag ctgcctcact gcggtgagg tccatctgc
2161 tggacgctat gtctctgcc ctccacaac cctagcccc gctcagcctg ctgatagggg
2221 ctccccagca gccccagggc aggaggatgg tgctgagac aacctccac ctggtactcc
2281 ctctcaggat ccaagctaag cactgccact ggggaaaact ccacttccc acttcccac
2341 cccagcctt atcccactt gcagccctgt ctctcact atcccactc catcccagc
2401 aggtccctcc cctctctgt gcagtagcat cacttgaag gcagtagcat caccatctg
2461 aaaaggaagg ggttgattg caatatctga agccctccca ggtgtaaca tccaagact
2521 ctagagtcca aggtttaaag agtctagatt caaaggttct aggttcaaa gatgctgtga
2581 gtcttgggt ctaaggacct gaaattcaa agtctctaat tctattaaag tgctaagggt
2641 ctaaggccta cttttttt tttttttt tttttttt ttgcgataga gtctcactgt
2701 gtcaccagc ctggagtga gtggtgcaat ctgcctcac tgeaacctc acctaccgag
2761 tcaagtgat tttctgct tggcctccca agtagctggg attacaggtg tgtgccacca
2821 caccggcta attttatat ttttagtaga gacagggtt caccatgtg gccaggctgg
2881 tctaaaact ctgacctca gtgatctgc cacctcagcc tccaaagtg ctgagattac
2941 aggcattgag cactgcact aacctaaaga cctactgtt taaagctctg acattatgt
3001 gtttagatt tctggttct aacattttg ataaagcctc aaggttttag gttctaaagt
3061 tctaagattc tgatttagg agctaaggct ctatgagtct agatgtttat tctctagag
3121 ttcagagtc taaaatgta agattataga ttctaaagat tctatagttc tagacatgga
3181 ggttctaagg cctaggattc taaaatgta ttttctaagg ctctgagagt ctgattctc
3241 tggctgtaag gctctagatc ataaggctc aaaatgttat ctctcaagt tctaagattc
3301 taatgatgat caattatagt ttctgaggt ttatgataat agattctctt gtataagatc
3361 ctagatccta agggctgaaa gctctagaat ctgcaattca aaagtccaa gactctaaag
3421 atggagtctc taaggctcgg ttttctaaga tttgatattc taagacttac tctaagatct
3481 tagattctct gtgtctaaga ttctagatca gatgctccaa gattctagat gattaaata
3541 gattctaagc gtctgtctg ttcaaggca ctctagattc cattggtcca agattccgga
3601 tctaagcat ctaagtata agactctac actcagttgt gactaactag acaccaaagt
3661 tctaataatt tcaatgttg gacacctta ggttcttgc tgcattctgc ctcttagga
3721 ccatggttaa gactcaaga atccacatt ctaaaattt atagttctag gactgtagt
3781 tctaagactc aatgttcta agtttctaag attctaaagg tccacaggtc tagactatta
3841 ggtgcaatt caaggttcta acctatact gtagtattct ttgggtgccc cctctctc
3901 ttactataca ttgctctc ctcccact ggggggtgt gccccctca agcctgtgca
3961 atgcattagg gatgctctc tcccgcagg ggatggacga tctcccact ttgggcat
4021 gttgccccg tgagccaac cctaccctc tgagtacaga gtgtggactc ttgtgctcc
4081 agaggggctc aggtcacata aaactttgta tatcaacgag aaaaaaaa

Proteina:

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGNPGNITGARGLTGT
LRCQLQVQGEPPEVHWLRDQGILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQL
SDTGQYQCLVFLGHQTFVVSQPGYVGLEGLPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGP
PEPVDLLWLQDAVPLATAPGHGPQRSLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSTRATI
TVLPQQPRNLHLVSRQPTELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPD
PPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLHPHTPYHIRVACTSSQGSSWITHWLPVETPEGVPL
GPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPLQGTLLGYRLAYQGQDTPEVLMDIGLRQEV
TLELQGDGVSNTLVCVAAYTAAGDGPWVSLPVPLEAWRPVKEPSTPAFSWPWWY
VLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFEPTVERGELVVRVYRVRKSYSRR
TTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVMEGQLNQDSDIL
KVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSERESFPAPVVI
LPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVYLPTQMLVKFMADIASGMEYLSKRFIHRDLA
ARNCMLNENMSVCVADFLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVTYS
KSDVWSFGVTMWEIATRGTQTPYGVENSEIYDYLRQGNRLKQPADCLDGLYALM
SRCWELNPQDRPSFTELREDLENTLKAALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAG
GADPPTQDPKDCSCLTAAEVHPAGRYVLCPSSTPSAQPADRGSPAAPGQEDGA

Dominio extracelular:

APRGT QAEESPFVGN PGNITGARGL
TGTLRCQLQV QGEPPEVHWL RDGQILELAD STQTQVPLGE DEQDDWIVVS
QLRITSLQLS DTGQYQCLVF LGHQTFVVSQPGYVGLEGLPY FLEEPEDRTV
AANTPFNLSC QAQGPPEPVD LLWLQDAVPL ATAPGHGPQR SLHVPGLNKT
SSFSCEAHNA KGVTTSTRAT ITVLPQQPRN LHLVSRQPTE LEVAWTPGLS
GIYPLTHCTL QAVLSNDGMG IQAGEPDPE EPLTSQASVP PHQLRLGSLH
PHTPYHIRVA CTSSQGSSW THWLPVETPE GVPLGPPENI SATRNGSQAF
VHWQEPRAPL QGTLLGYRLA YQGQDTPEVL MDIGLRQEV TLELQGDGVS
NTLVCVAAYT AAGDGPWVSLP VPLEAWRPGQ AQPVHQLVKE PSTPAFSWPWW

1.3. CLEC5A

DNA:

1 cccttgcca agaaccac tgaacaggaa gaggtatttc tggggatgc taccaaggca
61 gagactgtga agaaggaaga acgttgcttg ggcaaaagga gcatattctc aggagacggg
121 gcccctgct gccacacaa gcattagcc accaggaaga ccccatctg caagcaagcc
181 tagcctcca gggagaaaga gcccctgca gctcctcat catgaactgg cacatgatca
241 tctctgggct tatttggtga gtgctaaag ttgttgaat gacctattt ctactttatt
301 tcccacagat ttttaacaaa agtaacgatg gttcaccac caccaggagc tatggaacag
361 tctgcccac agactgggaa tttatcaag caagatgtt ttttatcc acttctgaat
421 catcttgga tgaagcagg gactttgca aaggaaaagg atccacattg gcaattgtca
481 acagccaga gaaactgaag tttctcagg acataactga tctgagaag tattttattg
541 gcttaattta ccatcgtgaa gagaaaagg ggcgttgat caacaactct ggttcaatg
601 gcaatgttac caatcagaat cagaattca actgtgcgac cattggccta acaaagacat

661 ttgatgctgc atcatgtgac atcagctacc gcaggatctg tgagaagaat gccaaatgat
721 cacagttccc tgtgacaaga actatacttg caactctttt tgaatccata caggctctct
781 ggccaatgat tcttttactt acctatctgt ctaccagtag cggctcctgc ccatttggga
841 aactgagctt ctttctctg cactggggga ctggatgcta gccatctcca ggagacagga
901 tcagttttac ggaacaact cagttagtat agagatgagg tccgcttctg tagtactgag
961 catttctgac tgatcaaaaa ggcctagtct gttgacaggg tttgtttat tttagcctca
1021 gagtatacca tactactagg gagtaactgt agagtgagaa attataaaca ttatttaggg
1081 attaccatgg tggaagaggg ataaacatag gtctctgtgac ttctctctg ttctcaaggg
1141 aaccccatc acatgcccct cctaactcca caagcgaggg tagcagagge tctcctcagt
1201 ctgaactaag gcttggcctt ggggagggct cctagtctg agcttggagc agcacggaga
1261 gcagcattgt ttatgggaat ggagagaggt ctgggcagga taggaacctt ctggagacc
1321 cctttgaaga aaaccagga gccaaaggag ccaaacacac tagatttctg ttctcagca
1381 aagccctgaa gagacactta agctaaaaat tccctgtca tatttctgaa actccattat
1441 aacatagtta actccttgt aacaaaaatt taggtaagca ggcttcttt gctctgaagg
1501 ttttgagtac ctggctgtat ttgtgagta tttttaaatt tttggatagt ctcttaggca
1561 acaataatca caatatatc atccctcag ttctggagaa agcctgatac caggcacagc
1621 ctactgacce caaggagcct ggactgatt ggcatcacat tgatctagaa ctggtccagc
1681 cgacgaagag taggaaaaga gaagggtctc tcagggaac attggtctggg ggcacggaat
1741 aagcacatag taaaaggga acatcagggt caaatggaaa tcacctgaga caggaaacag
1801 ggagttcatt tggccacct ggaagaaagg caagaaagag gaagacaagt ctggagtac
1861 cctggtctt ctccacactc acaagacac agctatatac tctgcttgg gataagaaa
1921 gagaaaagag atgcctttt tgtttgagt aagaataatt aaaccataag gaagaccatg
1981 tataaaactg atggaaataa tagtcacaa agtacagcac ataccattt gtgtctaata
2041 acaatgtagc acagtaatga ctgtacatgt cattgtatgt ataccaaaca agattgtgt
2101 aatcatatt tttattaca aactaagtt ctgcttctgc atcttaggt ttcatcatt
2161 ttggctcctt agcatggcca cttaacatt ttaacatga gataacacat caggtgtcag
2221 aactgtctt aaggaatta ccagaagtaa tttgtttt agatggggtg gaaattggaa
2281 ttatattagt agccggtgga gatacaagtt ctctgactgt gttgggaaag gataagtct
2341 accgttgaga agggaagaaa ggctgagtt aggtggagaa aaatatcaac agaactctag
2401 ccaaaggcaa gccccagaac tcagacaaca gaaaggaaat cctaatcctt ctgttttgag
2461 aagagagaac ttagttgct tcaactccta ttcatgaca gaataactgc aaactttaa
2521 gatcaggaaa ttagacatc tagtgattc tttagtagac agtttaatt ccccaagat
2581 taggagacac ttctgtcag gttctaaaag gagcccaatg gcttggggtg ggagtgggga
2641 gtagatagg aatattggg atttggttta agttcatcat tggaagagtt cctggatcct
2701 tgcaagctta gataaatgt atctttata gatagcagt gcatgctta aaaaaaaaa
2761 aggcaatgaa aatttagca gccactgaat ttgagtttc acttgttctc taatgtctg
2821 tgtgaatcag tacagtttc ttacccttc ttggtctta ttcttact gataaatgg
2881 ggtagtaata cctatcaca aaaattatt cacatattaa ataacattc tctatgata
2941 tcaatggcat tagacattg gagaagcatt ttgtggagga ttgaagttg agatctcat
3001 ccaagaagta gctttcaat ttctagaag cttaatgtag gcaagccact tcaatttca
3061 gaactgttt actcattat aatattggaa taaaatttg tgcaagtcag agaagggtgc
3121 cttaaaaatg ttgtggcaa gccacatgag atcaagaca cactttcat gacctcaat
3181 gtgggcccag cctaggtcag ccaacccca tcaacctt agactcacga acaaatccac
3241 ctgagatcag cagagccac ctatgcagc tgaactceta agcacaataa taaaactta
3301 tcaactgata cactggagt ttctggta tctctctat agcaaatct aactgatga
3361 atctcatct ggccttcat ctctcctt tattgtctt tctgtattt ttatccagc

3421 aaccagatg atcttgtaa aacattaaac agattctgc actctt

Proteína:

MNWHMIISGLIVVVLKVVGMTLFLLYFPQIFNKSNLDGFTTTRSYGTVCPKDWEFY
QARCFLLSTSESSWNESRDFCKGKGSTLAIVNTPEKLLKFLQDITDAEKYFIGLIYHRE
EKRWRWINNSVFNGNVTNQNQNFNCATIGLTKTFDAASCDISYRRICEKNAK

Dominio extracelular.

PQI FNKSNLDGFTT TRSYGTVSQIFGSSSPSPNG FITTRSYGTV CPKDWEFYQA
RCFFLLSTSES SWNESRDFCKGKGSTLAIVN TPEKLLKFLQD ITDAEKYFIG
LIYHREEKRW NVTNQNQNFN CATIGLTKTF DAASCDISYR RICEKNAK

1.4. CLEC7A

DNA:

1 agcatagttt catttctgc tcttgaatat ctggtgaac tacttaagct taatttgta
61 aactcggta agtacctagc ccacatgatt tgactcagag attctcttt gtccacagac
121 agtcatctca ggagcagaaa gaaaagagct cccaaatgct atatctattc aggggctctc
181 aagaacaatg gaatatcctc ctgatttaga aaatttggat gaagatggat atactcaatt
241 acacttcgac tctcaaagca ataccaggat agctgttgtt tcagagaaag gatcgtgtgc
301 tgcattctct ccttggcgcc tcttggctgt aatttggga atctatgct tggtaatact
361 ggtgatagct gtggtctgg gtacctggc tatttggaga tccaattcag gaagcaaac
421 attggagaat ggctacttc tatcaagaaa taaagagaac cacagtcaac ccacacaac
481 atcttagaa gacagtgtga ctctaccaa agctgtcaaa accacagggg tcttccag
541 ccttctct cctaattgga ttatatga gaagagctgt tatctattca gcatgtcact
601 aaattcctgg gatggaagta aaagacaatg ctggcaactg ggctctaate tctaaagat
661 agacagctca aatgaattgg gatttatagt aaaacaagt tcttcccaac ctgataatc
721 attttgata ggcttctc ggccccagac tgaggtacca tggctctggg aggatggatc
781 aacattctct tctaactat ttcagatcag aaccacagct acccaagaaa acctatcct
841 aaattgtgta tggattcag tgcagtcct ttatgaccaa ctgtgtagt tgcctcata
901 tagtattgt gagaagaagt ttcaatgta agaggaaggg tggagaagga gagagaaata
961 tgtgagtag taaggaggac agaaaacaga acagaaaaga gtaacagctg aggtcaagat
1021 aatgcagaa aatgtttaga gagcttggcc aactgtaate ttaaccaaga aattgaaggg
1081 agaggctgtg attctgtat ttgtcagct acaggtaggc tagtattatt tttctagta
1141 gtatgccct agacatggaa tcagggcagc caagctgag ttttattt ttattatt
1201 atttttga gataggtct cactttgta cccaggtgg agtgcagtg cacaatctg
1261 actactgca gctatctc gcctcagccc ctcaagtagc tgggactaca ggtgcatgcc
1321 accatgccag gctaatttt ggtgtttt gtagagactg ggtttgcca tgtgaccaa
1381 gctggtctct aactcctggg cttaagtgt ctgccgct tggctccca aagtgtggg
1441 attacagat tgagccacca cacctggccc caagctgaa tttcattt gccattgact
1501 tggcattac ctgggtaag ccataagcga atcttaatt ctgctctat cagagtgtt
1561 tcatgctcaa caatgccat gaagtgcag gtgtgtgcc acgattgac cctcaactc

1621 tagcagtata tcagttatga actgagggtg aaatatatt ctgaatagct aaatgaagaa
 1681 atgggaaaaa atctcacca cagtcagagc aattttatta ttttcatcag tatgatcata
 1741 attatgatta tcattctagt aaaaagcagg aactcctact ttttctttat caaftaaata
 1801 gctcagagag tacatctgcc atatctctaa tagaatcttt tttttttt tttttttga
 1861 gacagagttt cgetcttgtt gccaggctg gaggcaacg gcacgatctc ggctcaccgc
 1921 aacctcggcc cctgggttc aagcaattct cctgcctcag cctccaagt agctgggatt
 1981 acagtcaggc accaccacac cgggctaatt ttgtatttt ttagtagaga cagggtttct
 2041 ccatgctggg cagggtagtc ccgaactcct gacctcaagt gatctgcctg cctcggcctc
 2101 ccaagtctg ggattacagg cgtgagccac tgcaccagc ctagaatctt gtataatag
 2161 taattgtagg gaaactgctc tcataggaaa gttttctgct ttttaatac aaaatacat
 2221 aaaatacat aaaactgat gatgaatata aaaaagtaac caacctcatt ggaacaagta
 2281 ttaacatttt ggaatatgtt ttattagttt tgtgatgac tgtttacaa ttttaccat
 2341 tttttcagt aattactgta aaatggtatt attggaatga aactatatt cctcatgtgc
 2401 tgattgtct tttttttc atactttcc actggtgcta tttttttc caatggatg
 2461 tctgtatta ctgggagggc atttacagc ctctaattgt gattaatag tgaagaagaa
 2521 ttgtaccaat ttactaaat tatgcagttt aaaatggatg atttatgtt atgtggatt
 2581 catttcaata aaaaaaaact cttatcaaaa aaaaaaaaaa aa

Proteína:

MEYHPDLENLDEDGYTQLHFDSQSNTRIAVVSEKGSACAASPPWRLIAVILGILCLVI
 LVIAVVLGTMAIWRSNSGSNTLENGYFLSRNKENHSQPTQSSLEDSVTPKAVKTT
 GVLSSPCPPNWIIYEKSCYLFSMSLNSWDGSKRQCWQLGSNLLKIDSSNELGFIVKQ
 VSSQPDNSFWIGLSRPQTEVPWLWEDGSTFSSNLFQIRTTATQENPSPNCVWIHVS
 IYDQLCSVPSYSICEKKFSM

Dominio extracelular:

TMAIW RNSGSNTLE NGYFLSRNKE NHSQPTQSSL EDSVTPKAV
 KTTGVLSSPC PPNWIIYEKS CYLFSMSLNS WDGSKRQCWQLGSNLLKIDS
 SNELGFIVKQ VSSQPDNSFW IGLSRPQTEV PWLWEDGSTFSSNLFQIRTT
 ATQENPSPNC VWIHVSVIYD QLCSVPSYSI CEKKFSM

1.5.CD32

DNA:

1 agaacatttc ttttcaact ccccttcag actcagaat ttgtttgcc tctagggtg
 61 aatccgcaa gtttgagag aaggctgtga ctgctgtgct ctggcgcca gctcgtcca
 121 gggagtgatg ggaactctgt cattctacc tgccttgc actgagagtg actgggctga
 181 ctgcaagtc cccagcctt ggggtcatat gcttctgtgg acagctgtc tattctggc
 241 tctgttctg gggacacctg cagctcccc aaaggctgtg ctgaaactg agccccagt
 301 gatcaactg ctccaggagg actctgtgac tctgacatgc cgggggactc acagccctga
 361 gagegactcc attcagtggt tccacaatgg gaatcatt cccaccaca cgcagcccag
 421 ctacaggttc aaggccaaca acaatgacag cggggagtac acgtgccaga ctggccagac
 481 cagcctcage gacctgtgc atctgactgt gctttctgag tggtgtgtgc tccagaccc
 541 tcacctggag tccaggagg gagaacat cgtgctgagg tgccacagct ggaaggacaa

601 gcctctggtc aaggteacat tcttcagaa tggaaaatcc aagaaatfff cccgttcgga
 661 tcccaacttc tccatccac aagcaaacca cagtcacagt ggtgattacc actgcacagg
 721 aaacatagge tacacgctgt actcatccaa gcctgtgacc atcactgtcc aagctcccag
 781 ctcttcaccg atggggatca ttgtggctgt ggtcactggg attgctgtag cggccattgt
 841 tgctgetgta gtggccttga tctactgcag gaaaaagcgg atttcagcca atcccactaa
 901 tctgatgag gctgacaaag ttggggctga gaacacaate acctattcac ttctcatgca
 961 cccggatgct ctggaagagc ctgatgacca gaaccgtatt tagtctccat tctcttgcac
 1021 tgggatttga gaagaaaate agagagggaa gatctgggat ttcttggcct aaattcccet
 1081 tggggaggac agggagatgc tgcagtcca aaagagaagg ttctccag agtcatctac
 1141 ctgagtctg aagctccctg tctgaaagc cacagacaat atggcccaa ataaccgact
 1201 gcacctctg tcttcagct cttctgaca tcaaggctct tccgtccac atccacacag
 1261 ccaatccaat taatcaaac actgttatta acagataata gcaactggg aaatgcttat
 1321 gttacaggtt acgtgagaac aatcatgtaa atctatatga ttcagaaat gttaaaatag
 1381 actaacctet accagacat taaaagtgat tgtttctggg tgataaaatt attgatgatt
 1441 tttatttct ttatttctc ataaagatca tatattactt ttataataa acattataa
 1501 aacaacatc tgtttacct tcaaggctg tattggttgg agttagact gaactgcctg
 1561 gggctctgtt ctcttcagtg atgagactct taggaaggca ggaatggata gtagggggg
 1621 agggaggag agatggggat ttagaatgta gaggtagtgc ccttttctt aaaactgaat
 1681 acagtcagc accacataat gatgttagt tcaacaacag actgcatata tgatggtgat
 1741 cccataaaa tataataca ttttctatt gtacctttc tattctatg ttagatata
 1801 tgagtactta ccattgtgtt acaattgct aaagtattca gtacagtgc atctgtaca
 1861 ggttttagc ctaggggcaa taggctatac gctacagcct aggtgtgtag taggccacac
 1921 catttaggtt tgtataagta cctgctatga tttcacaca acaaaattgc ctgattct
 1981 caaatgat cccatattt caacaatgca tgactgtact ctctgcaa tgacctgta
 2041 ttctgttc catgttct tcttctct cctatggcaa ataaaact gtttgcac
 2101 aaaaaaaaa aaaaaaa

Proteína completa:

MGILSFLPVLATESDWADCKSPQPWGHMLLWTA VLFLAPVAGTPAAPPKAVLKLE
 PQWINVLQEDSVTLTCRGTHSPESDSIQWFHNGNLIPHTHTQPSYRFKANNNDSGEY
 TCQTGQTSLSDPVHLTVLSEWLVLQTPHLEFQEGETIVLRCHSWKDKPLVKVTFQ
 NGKSKKFSRSDPNFSIPQANHSHSGDYHCTGNIGYTLYSSKPVTITVQAPSSSPMGII
 VAVVTGIAVA AIVAAVVALIYCRKKRISANPTNPDEADKVG AENTITYSLLMHPDA
 LEEPDDQNRI

Dominio extracelular:

TPAAPPKAVLKLEPQWIN VLQEDSVTLT CRGTHSPESD SIQWFHNGNL
 IPTHTQPSYRFKANNNDSGE YTCQTGQTSLS DPVHLTVLS EWLVLQTPHL
 EFQEGETIVL RCHSWKDKPL VKVTFQNGK SKKFSRSDPN FSIPQANHSH
 SGDYHCTGNI GYTLYSSKPV TITVQAP

2. Diseño de cebadores específicos para los dominios extracelulares de los receptores.

Cuadro 9. Diseños de los cebadores específicos de los dominios extracelulares de los receptores.

Proteína	Primer o Cebador
MERTKfull	Ov NotI K Met G P A P Fw tata ggggccc ATGGGGCCGGCCCCGCTGCC
	Ov EcoRI Stop His G S E V L M Rv atat gaattccg TTA GTGGTGATGGTGATGATG CATCAGGACTTCTGAGCC
MERTKextra	Ov NotI K Met A I T E A R Fw tat agc ggc cgc c ATG GCTATCACTGAGGCAAGG
	Ov EcoRI Stop His P A P G N A D Rv ata tga att c TTA GTGGTGATGGTGATGATG ATCTGCGTTGCCAGGCGCCGG
AXLfull	Ov notI K M A W R C P Fw ttat ggggccc c ATGGCGTGGCGGTGCCCCAGG
	Ov bamHI end His G Q E D G A Rv atat GAATTC TTA GTGGTGATGGTGATGATG GGCACCATCCTCCTGCCC
AXLextra	Ov notI k M A P R G T Q Fw ttat ggggccc c atg GCCCCAGGGGCACGCAG
	Ov bamHI end His A F S W P W W Rv aata GAATTC TTA GTGGTGATGGTGATGATG CCACCAGGGCCACGAGAAGGC
CLEC5Afull	Ov NotI K Met N W H M I Fw tata GCGGCCGC C ATGAACTGGCACATGATCATC
	Ov EcoRI Stop His C E K N A K Rv atat GAATTC TTA GTGGTGATGGTGATGATG TTTGGCATTCTTCTCACAG
CLEC5Aextra	Ov NotI K Met P Q I F N K Fw tata GCGGCCGC C ATG CCACAGATTTTAAACAAAAG

	Ov EcoRI Stop His C E K N A K Rv atat GAATTC TTA GTGGTGATGGTGATGATG TTGGCATTCTTCTCACAG
CLEC7Afull	Ov NotI K M E Y H P D L Fw tata GCGGCCGC C ATGGAATATCATCCTGATTTAG
	Ov BamHI Stop His E K K F S M Rv atat GGATCC TTA GTGGTGATGGTGATGATG CATTGAAAACCTTCTTCTCAC
CLEC7Aextra	Ov NotI K Met T M A I W R S Fw tata GCGGCCGC C ATG ACCATGGCTATTTGGAGATCC
	Ov BamH Stop His E K K F S M***** Rv atat GGATCC TTA GTGGTGATGGTGATGATG CATTGAAAACCTTCTTCTCAC
CD32full	Ov NotI K Met G I L S Fw tata GCGGCCGC C ATGGGAATCCTGTCATTC
	Ov EcoRI Stop His P D D Q N R I Rv atat GAATTC TTA GTGGTGATGGTGATGATG AATACGGTTCTGGTCATCAGG
CD32 extra	Ov NotI K Met T P A A P P K Fw tata GCGGCCGC C ATG ACACCTGCAGCTCCCCCAAAG
	Ov EcoRI Stop His T I T V Q A P Rv atat GAATTC TTA GTGGTGATGGTGATGATG GGGAGCTTGGACAGTGATGGT

3. Cálculos y preparaciones de las soluciones empleadas en las metodologías

3.1 cálculos de eficiencia de transformación.

UFC transformadas: $\frac{(79)(10000)(100)}{100}$

UFC transformadas = 7,9 X10⁶ UFC de XL-10 GOLD y 6,7 X 10⁶ UFC de BL21

En la ecuación anterior el 79 corresponde al número de colonias observadas en la placa después de incubarla toda la noche. Este valor corresponde al promedio de 3 repeticiones,

el volumen de células competentes previo a la transformación fue de 100 μL , al cual se le añadió 200 μL de medio SOC, por lo cual el coeficiente de dilución es 10000. El 100 μL corresponde al volumen de transformación empleado en la placa al momento del esparcido.

Para calcular la eficiencia de transformación se divide el valor obtenido de ufc transformadas entre la cantidad de plásmido pQCXIH utilizado.

$$\text{Eficiencia de transformación: } \frac{(7,9 \times 10^6 \text{ UFC})}{8.35 \times 10^{-3} \mu\text{g}} = 9.4 \times 10^9 \text{ UFC}/\mu\text{g de E.coli XL-10 GOLD}$$

$$\text{Eficiencia de transformación: } \frac{(6.7 \times 10^6 \text{ UFC})}{8.35 \times 10^{-3} \mu\text{g}} = 6.7 \times 10^9 \text{ UFC}/\mu\text{g de E.coli BL21}$$

$$\text{pQCXIH utilizado} = 2087 \frac{\text{ng}}{\text{ml}} \times \frac{1.0 \mu\text{g}}{1000 \text{ng}} \times \frac{1.0 \text{ml}}{100 \mu\text{l}} = 2.08 \times 10^{-3} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \cdot \{4 \mu\text{l}\} = 8.35 \times 10^{-3} \mu\text{g}$$

3.2 preparación de medios para transformación bacteriana.

Medio de cultivo SOC = en un erlenmeyer de 500ml añadí 2.5g de extracto de levadura, 10 g de Triptona, 0.3 g de NaCl, 0.1 g de KCl, 1.0 g de MgCl₂, 1.2 g de MgSO₄, 1.8 g de glucosa y aforé con agua destilada hasta completar 500 ml. Se le añadió PEG, DMSO y glicerol.

0.5% extracto de levadura

1 g ----- 100mL = 1 %
%

2.5 g de extracto de levadura/500 mL de agua= 0.5

0.5 g-----100mL = 0.5 %

2 % de Triptona

2 g-----100 mL = 2%

10 g de Triptona/500 mL de agua= 2%

10 mM NaCl

0.01M= g/ (58.44 g/mol) (500mL)

g= 0.3 g de NaCl

2.5 mM KCl

0.0025M= g/ (74.56 g/mol) (500 mL)

g= 0.1 g d KCl

10 mM MgCl₂

0.01M= g/ (203.30 g/mol) (500)

g= 1.0 g de MgCl₂

10 mM MgSO₄

$$0.01M = g / (246.68 \text{ g/mol}) (500)$$

$$g = 1.2 \text{ g de MgSO}_4$$

20 mM Glucosa

$$0.02M = g / (180.1559 \text{ g/mol}) (500\text{ml})$$

$$g = 1.8 \text{ g de glucosa}$$

C) CaCl₂ 0.1M + 10% de glicerol: en un Erlenmeyer con tapa preparé la solución madre a 1M para luego diluir.

Cálculos**Concentrado CaCl₂ 1M**

$$1M = g / (147.02 \text{ g/mol}) (0.1L)$$

$$g = 14.7 \text{ g de CaCl}_2 + 100 \text{ mL de agua destilada}$$

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

$$V_1 (1M) = (10 \text{ mL}) (0.1M)$$

$$V = 1 \text{ mL de CaCl}_2 + 1 \text{ ml de glicerol para que la solución quede a 10\%}$$

3.3 Preparación de placas de LB con antibióticos**Cálculos**

Medio LB: en un Erlenmeyer de 1000mL añadí 10g de Triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl.

Platos Petri: preparé medio LB para 30 platos de 15mL, 15 platos con Kanamicina [100 µg/mL] y 15 platos con LB y ampicilina [100 µg/mL]

A) (30 platos) (15 mL) = 450 mL de LB

$$1.0L \text{ ----- } 10 \text{ g Triptona} \quad X = (10g) (0.45L) / (1.0L)$$

$$0.45L \text{ ----- } X \quad X = 4.5g \text{ de Triptona}$$

$$1.0L \text{ ----- } 5 \text{ de extracto de levadura} \quad X = (5g) (0.45L) / (1.0L)$$

$$0.45L \text{ ----- } X \quad X = 2.25g \text{ de Triptona}$$

$$1.0L \text{ ----- } 10g \text{ NaCl} \quad X = (10g) (0.45L) / (1.0L)$$

$$0.45L \text{ ----- } X \quad X = 4.5g \text{ de NaCl}$$

Kanamicina [100 µg/mL]

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

$(10 \text{ mg/mL}) (X) = (100 \mu\text{g/mL}) (250 \text{ mL})$
 $X = 250 \text{ mL} \cdot 100 \mu\text{g/mL} / 10000 = 2.5 \text{ mL del stock}$

Ampicilina [100 mg/mL]

$(100 \text{ mg/mL}) (X) = (100 \mu\text{g/mL}) (250 \text{ mL})$
 $[100 \text{ mg/mL}] X = [100 \mu\text{g/mL}] [250 \text{ mL}]$
 $X = 250 \mu\text{L de ampicilina en } 250 \text{ mL de LB.}$

Cloranfenicol [20 mg/ml]

$(20 \text{ mg/mL}) (X) = (20 \mu\text{g/mL}) (100 \text{ mL})$
 $X = 0.1 \text{ mL o } 100 \mu\text{L del stock.}$

3.4 Preparación de solución stock de Ampicilina [100 mg/mL], Kanamicina [100 mg/mL] y Cloranfenicol [20 mg/mL]

La solución de Kanamicina vino a 100X (10 mg/mL) y se prepararon alícuotas de 5 mL en tubos eppendorf de 5 mL para guardarlas a 4°C y el frasco de Kanamicina a 100X guardarlo a -20°C.

Se pesó 0.25-0.5g de cloranfenicol y se le añadió 10 mL de etanol al 70%.

Cálculos

Ampicilina [100 mg/mL]

$1 \text{ g} = 1000 \text{ mg}$
 $20 \text{ g} = 20000 \text{ mg}$
 $X = 100 \text{ mg}$
 $X = 2 \text{ g de ampicilina en polvo en } 20 \text{ L de agua [100 mg/mL]}$

3.5 Preparación de soluciones para western blot

3.5.1. Solución de corrida de proteínas. (pH: 8.3): en una botella de 500ml añadí 1.51 g de tris base [25 mM], 7.13 g de glicina [190 mM], 5 mL de SDS 0.1% y aforé con agua destilada hasta los 500 mL.

Cálculos.

A) tris base 25 mM = 0.0025 M
 $M = g / (P.M) (L)$
 $0.0025 \text{ M} = g / (121.14 \text{ g/mol}) (0.5 \text{ L})$
 $g = 1.51 \text{ g de tris base}$

B) glicina 190 mM = 0.19 M
 $M = g / (P.M) (L)$
 $0.19 \text{ M} = g / (75.07 \text{ g/mol}) (0.5 \text{ L})$
 $g = 7.13 \text{ g de glicina}$

C) SDS 0.1%

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

$$V_1 = (0.5 \text{ L})(0.1\%)/(10\%)$$

$$V_1 = 5 \text{ mL de SDS}$$

3.5.2. solución de transferencia de proteínas: en una botella de 500 mL añadí 1.51 g de tris base [25 mM], 7.13 de glicina [190 mM], 100 mL de metanol [20%] y aforé con agua destilada hasta los 500 mL.

Cálculos.

A) **tris base** 25 mM = 0.025 M

$$M = g / (P.M) (L)$$

$$0.025 \text{ M} = g / (121.14 \text{ g/mol}) (0.5 \text{ L})$$

$$g = 1.51 \text{ g de tris base}$$

B) **Glicina** 190 mM = 0.19 M

$$M = g / (P.M) (L)$$

$$0.19 \text{ M} = g / (75.07 \text{ g/mol}) (0.5 \text{ L})$$

$$g = 7.13 \text{ g de glicina}$$

C) metanol 20%

$$(100 \text{ mL} / 500 \text{ mL}) (100) = 20\% \text{ de metanol.}$$

3.6 Preparación de SDS

$$100 \text{ g} \text{ ----- } 100\%$$

$$X \text{ ----- } 10\%$$

Se añadió 10 g de SDS y se aforó a 100 mL para la preparación del SDS a 10%.

3.7 Preparación de TBST 10X

Cálculos.

A) **tris base** 200 mM = 0.2 M

$$M = g / (P.M) (L)$$

$$0.2 \text{ M} = g / (121.14 \text{ g/mol}) (1.0 \text{ L})$$

$$g = 24.23 \text{ g de tris base}$$

B) **NaCl 1.5M**

$$M = g / (P.M) (L)$$

$$1.5 \text{ M} = g / (58.44 \text{ g/mol}) (1.0 \text{ L})$$

$$g = 87.7 \text{ g de NaCl}$$

Se añadió en un erlenmeyer los gramos de tris y NaCl, se le añadió 10ml de tween, se añadió 700.0 mL de agua, luego se le ajustó el pH a 7.5 con HCl 2N y se aforó a 1000.0 mL.

3.8 Preparación de azul de comassie.

Se añadió en una botella con rosca, 50 mL de metanol, 10 mL de ácido acético y 1 g de comassie.

3.9 Preparación del decolorante de geles.

40% metanol y 10% de ácido acético en un erlenmeyer de 100 mL, se aforó con agua.

3.10 Preparación de geles de acrilamida.

3.10.1 Gel separador

10 mL de gel al 10%.

- 1) 2.2 mL de H₂O dd
- 2) 5.0 mL de acrilamida a 30%
- 3) 2.6 mL de 1.5M tris (pH: 8.8)
- 4) 0.1 mL de SDS 10%
- 5) 100 µL de APS
- 6) 10 µL de TEMED.

3.10.2 Gel concentrador

5 mL de gel separador

- 1) 2.975 mL de H₂O dd
- 2) 0.67 mL de acrilamida a 30%
- 3) 1.25 mL de 0.5M tris (pH: 6.8)
- 4) 0.05 mL de SDS 10%
- 5) 0.05 mL de APS
- 6) 0.005 mL de TEMED.

3.11 Electroforesis

3.11.1 Cálculos del gel de agarosa

Se preparó una solución de 1000.0 mL de TBE10x. Se procedió a pesar en una botella de 500 mL 108.0 g de tris, se le añadió 55 g de ácido bórico, 40.0 mL de EDTA 0.5M (pH: 8.0) y se aforó a 1000.0 mL.

$$V1.C1 = V2.C2$$

$$V1 = (1000.0 \text{ mL}) (1X) / (10 X)$$

V1 = 100.0 ml de TBE 10x más 900.0 mL de agua destilada y desionizada, para preparar 1.0 L de TBE1X.

3.12 Preparación de la PCR

Master mix.

Agua libre de nucleasa 38.7 μL para cada tubo, 5.0 μL de accubuffer, 1.2 μL de MgCl_2 , 1.0 μL de dNTPs.

- **38.7 μL H₂O (10 tubos de PCR) = 387 μl de H₂O.**
- **5.0 μL de accubuffer (10 tubos de PCR) = 50 μL de accubuffer**
- **1.2 μL de MgCl_2 (10 tubos de PCR) = 12.0 μL de MgCl_2**
- **1.0 μl de dNTPs (10 tubos de PCR) = 10 μl de dNTPs 100 μM**

Se añadió en un tubo de 1.5 mL el volumen para 10 tubos de cada reactivo lo cual dio a un volumen total de 459 μL y se le añadió 45.9 μL a cada tubo de PCR. Finalmente, el volumen de cada tubo fue completado con 1.2 μL de PFU polimerasa, 1.2 μL de ADN y 1.0 μL de cada cebador.

3.13 Cálculos para los tiempos de elongación de cada fragmento de ADN.

La enzima polimerasa PFU amplifica 500 pb/min. Por una simple regla de tres se calculó el tiempo de elongación.

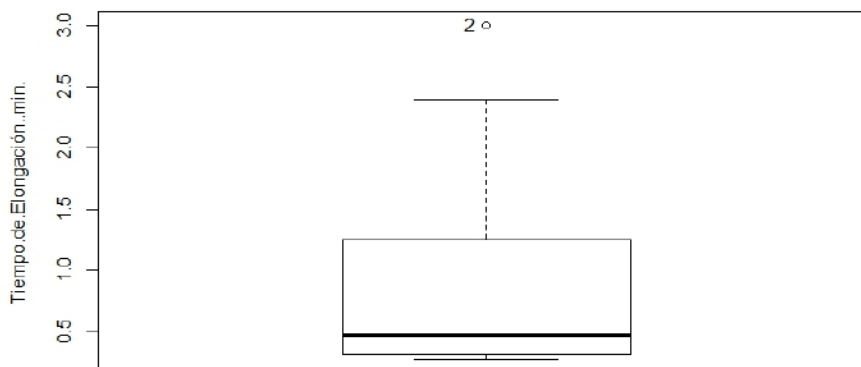


Figura 28. Tiempo de elongación de los dominios extracelulares, donde la media estuvo en el rango del minuto, solo con el dominio extracelular de AXL el cual tuvo mayor tiempo de elongación.

Tabla No.10. Cálculos de los tiempos de elongación de los dominios extracelulares de los receptores.

Segmento de ADN	Pares de Bases	Tiempo de elongación (min)
CLEC5A full	495	1.0
CLEC5A extra	453	1.0
CLEC7A full	2581	6.0
CLEC7A extra	546	1.0
AXL full	2655	6.0
AXL extra	1251	3.0
MERTK full	2997	6.0
MERTK extra	1440	4.0
CD32 full	873	1.0
CD32 extra	525	1.0

3.14 Cálculos para la PCR de colonias

Se obtuvo 26 tubos con colonias transformadas, a estas colonias se le ejecutó una PCR para confirmar que el vector más el inserto de cada PCR estaba incorporado en las colonias. Para evitar pipetear demasiadas veces en la PCR por la cantidad de los tubos se procedió a realizar los cálculos pertinentes, para una elaboración de un mix. También en se tomaron colonias y fueron resuspendidas en cada 5.0 μL de agua libre de nucleasa.

Se preparó una PCR con un volumen total de 10.0 μL en cada tubo.

Ingredientes para cada tubo

1.0 μL de UFC resuspendida.

0.5 μL de cada cebador (en este caso se utilizaron cebadores del vector y del inserto).

2.0 μL de master mix (26 tubos de PCR)= 52 μL

6.0 μL de H_2O (26 tubos de PCR)= 156 μL

En un tubo de 1.5 mL se añadió 156 μL de H_2O y 52 μL de master mix = 208 μL / 26 tubos = 8.0 μL de mix.

3.15 Expresión y Purificación de proteínas recombinantes

3.15.1. Preparación de IPTG a 100 mM

Se pesó 0.238g de IPTG y se le añadió 10ml de agua estéril y la filtramos para guardarla en alícuotas de 1 mL a -20°C .

$M = G / (P.M) (L)$
 $G = 100 \text{ mM} (238.3 \text{ g/mol}) (10 \text{ mL})$
 $= 0.238 \text{ g de IPTG.}$

3.15.2. Preparación de la solución STE.

Se añadieron los reactivos: Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM