



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D. Alejandro Pita Bea

**Desenvolvemento de novas tecnoloxías para o
illamento de exosomas mediante o uso de sistemas
biolóxicos vivos**

**Desarrollo de nuevas tecnologías para el aislamiento
de exosomas mediante el uso de sistemas biológicos
vivos**

**Development of new technologies for the isolation
of exosomes using living biological systems**

Traballo Fin de Grao
Xuño de 2025

ÍNDICE

ÍNDICE	2
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TÁBOAS	4
ABREVIATURAS	5
RESUMO GRÁFICO	7
Resumo	8
Resumen	9
Abstract	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Vesículas extracelulares	11
1.1.1 Características xerais	11
1.1.2 Exosomas.....	13
1.2 Tecnoloxía de presentación en superficie de lévedos/ <i>Yeast surface display</i> (YSD)	14
1.2.1 Fundamento da técnica	14
1.2.2 Vantaxes e limitacións	15
1.2.3 Perspectivas de futuro	16
1.3 Glicoproteínas Tim	16
1.4 Tim4	17
1.4.1 Descubrimento e estrutura.....	17
1.4.2 Funcións.....	18
1.4.3 Detección de <i>TIM4</i>	19
2. OBXECTIVOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Material biolóxico	21
3.1.1 Cepas de lévedos.....	21
3.1.2 Cepas bacterianas.....	21
3.1.3 Vectores plasmídicos.....	21
3.2 Medios de cultivo de microorganismos	21
3.2.1 Medio LB	21
3.2.2 Medio YPD	22
3.2.3 Medio CM-TRP	22
3.2.4 Variante do medio CM-TRP	22
3.2.5 Medio CM-URA	22
3.2.6 Medio SDCAA	22
3.2.7 Medio SGCAA	22
3.3 Técnicas de manipulación e de análise de ácidos nucleicos	23

3.3.1	Illamento de ADN	23
3.3.2	Cuantificación e avaliación da pureza.....	23
3.3.3	Secuenciación	23
3.3.4	Obtención das construcións.....	24
3.3.5	PCR.....	25
3.3.6	Electroforese	25
3.3.7	Purificación do plásmido pYD5-Tim4D.....	26
3.4	Transformacións.....	26
3.4.1	Transformación en lévedos polo método de Acetato de Litio	26
3.4.2	Transformación en lévedos competentes	27
3.4.3	Transformación en bacterias por choque térmico	27
3.5	Avaliación da expresión xénica.....	28
3.5.1	Indución da expresión de Tim4D	28
3.5.2	Lise celular	28
3.5.3	<i>Dot Blot</i>	28
3.5.4	Inmunotransferencia (<i>Western Blot</i>)	28
3.5.5	Citometría de fluxo.....	30
3.6	Ferramentas bioinformáticas.....	30
4.	RESULTADOS E DISCUSIÓN	31
4.1	Extracción de ADN plasmídico	31
4.2	Obtención do ADN recombinante pYD5-Tim4D.....	31
4.2.1	Amplificación da secuencia con Tim4D.....	31
4.2.2	Extracción de pYD5.....	33
4.2.3	Dixestión, purificación e ligamento de pYD5 e Tim4D.....	33
4.3	Análise das transformacións.....	35
4.3.1	Obtención de colonias recombinantes pYD5-Tim4D.....	35
4.3.2	Transformacións en EBY100	36
4.4	Análise da expresión de proteínas.....	37
4.4.1	<i>Dot Blot</i>	37
4.4.2	Resultados do <i>Western Blot</i>	41
4.4.3	Resultados da citometría de fluxo.....	42
4.5	Perspectivas futuras	44
5.	CONCLUSIÓNS	45
6.	BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	11
Figura 2	12
Figura 3	13
Figura 4	13
Figura 5	14
Figura 6	15
Figura 7	16
Figura 8	17
Figura 9	19
Figura 10	24
Figura 11	25
Figura 12	32
Figura 13	33
Figura 14	34
Figura 15	36
Figura 16	39
Figura 17	40
Figura 18	41
Figura 19	42
Figura 20	43

ÍNDICE DE TÁBOAS

Táboa 1	18
Táboa 2	25
Táboa 3	27
Táboa 4	29
Táboa 5	31
Táboa 6	32
Táboa 7	32
Táboa 8	33
Táboa 9	34
Táboa 10	35
Táboa 11	35
Táboa 12	36
Táboa 13	37
Táboa 14	38
Táboa 15	38
Táboa 16	39
Táboa 17	40

ABREVIATURAS

µg: Microgramo	H ₂ O ₂ : Peróxido de hidróxeno
µL: Microlitro	His: Histidina
µM: Micromolar	Ig: Inmunoglobulina
µm: Micrómetro	kDa: Quilodalton
°C: Grao <i>Celsius</i>	L: Litro
aa: Aminoácidos	LB: <i>Luria-Bertani</i>
Ac: Anticorpo	LBA: Medio <i>Luria-Bertani</i> co antibiótico ampicilina
ADN: Ácido desoxirribonucleico	MET: Microscopía electrónica de transmisión
ARN: Ácido ribonucleico	miARN: MicroARN
CD: <i>Cluster of differentiation</i>	min: Minuto
Cf: Concentración final	mL: Mililitro
Ci: Concentración inicial	mM: Milimolar
CM: Medio sintético completo	mm: Milímetro
CMH: Complexo maior de histocompatibilidade	NaCl: Cloruro de sodio
CM-TRP: Medio sintético completo sen triptófano	ng: Nanogramo
CM-URA: Medio sintético completo sen uracilo	NaH ₂ PO ₄ : Fosfato monosódico anhídrido
CPA: Células presentadoras de antígenos	Na ₂ HPO ₄ : Fosfato disódico anhídrido
DAB: Diaminobenzidina	(NH ₄) ₂ SO ₄ : Sulfato de amonio
DMSO: Dimetilsulfóxido	NiCl ₂ : Cloruro de níquel
dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato	NK: <i>Natural Killer</i>
DTT: Ditiotreitolo	nm: Nanómetro
<i>E.Coli: Escherichia Coli</i>	OD ₆₀₀ : Densidade óptica a 600 nm
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	O/N: <i>Overnight</i>
EMV: Endosomas multivesiculares	ORF: <i>open reading frame</i>
ESCRT: <i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>	p/v: Relación entre peso do soluto e o volume da solución
g: Gramo	PBS: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
h: Horas	PBS-T: <i>Phosphate Buffer Saline + Tween</i> [®]
HCl: Ácido clorhídrico	PCR: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
H ₂ O: Auga destilada	PEG: Polietilenglicol

pH: Potencial de hidróxeno

rpm: Revolucións por minuto

s: Segundo

S.cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*

SDS: Docedilsulfato sódico

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TIM: *T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing*

TIM4: *T-cell/transmembrane immunoglobulin and mucin domain-containing 4*

Tim4D: Dominio extracelular de Tim4

UV: Ultravioleta

V: Voltios

v/v: Relación entre o volume do soluto e o volume da disolución

VEs: Vesículas extracelulares

Vf: Volume final

Vi: Volume inicial

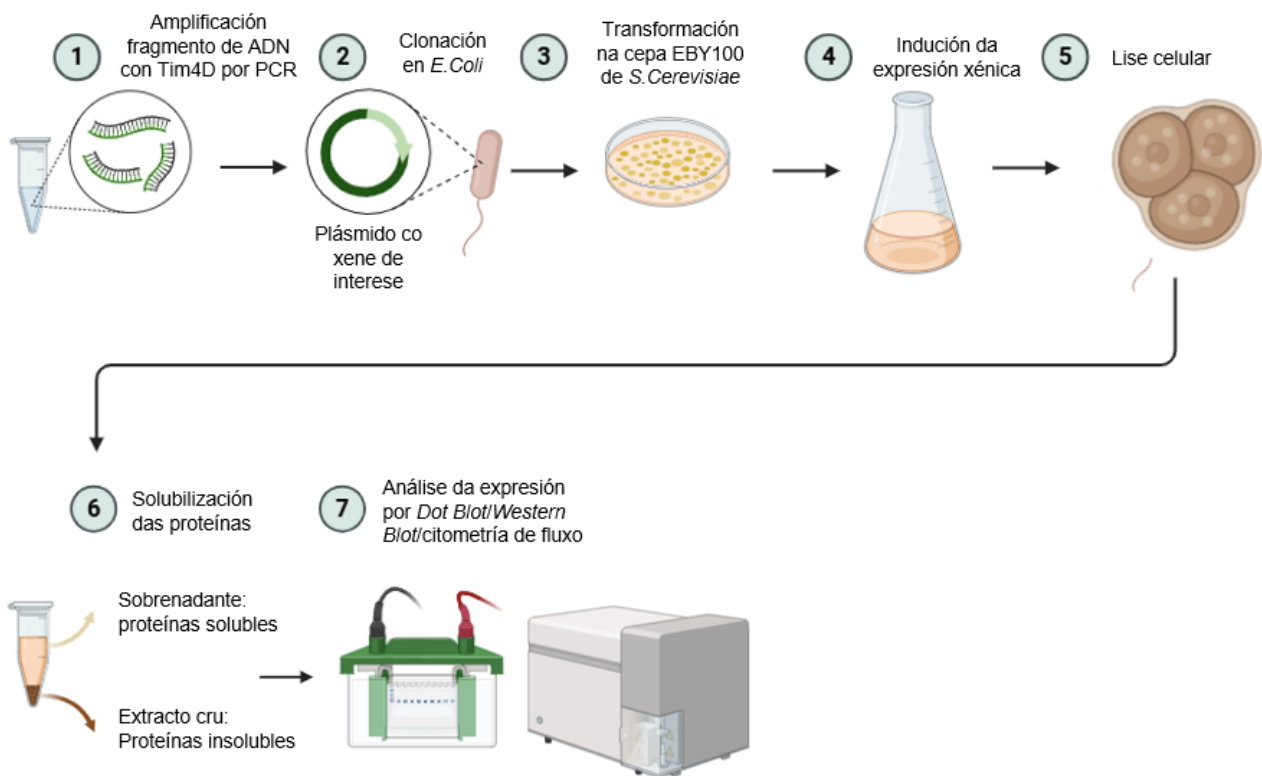
VIL: Vesículas intraluminais

YNB: *Yeast Nitrogen Base*

YPD: *Yeast extract Peptone-Dextrose*

YSD: *Yeast Surface Display*

RESUMO GRÁFICO



Representación das etapas de clonación *in vitro* dos plásmidos pYD1, pYD5 e pCTcon2 con Tim4D. Imaxe xerada con Biorender. <https://app.biorender.com>

Resumo

Os exosomas son un tipo de vesículas extracelulares cuxa bióxese ocorre na vía endosómica da célula. A súa secreción é un proceso evolutivamente conservado e sábese que desenvolven un papel crucial na comunicación intercelular. Estas vesículas, transportan proteínas transmembrana ou compoñentes citoplasmáticos, o que amosa o seu potencial como biomarcadores non invasivos para o diagnóstico de diversas patoloxías como o cancro. Non obstante, na actualidade os protocolos son moi complexos e custosos, polo que se require desenvolver novas técnicas.

Neste estudo, búscase crear un novo protocolo que permita illar exosomas humanos mediante o emprego da tecnoloxía de presentación en superficie de lévedos, que permite a expresión de proteínas recombinantes na parede celular. Neste caso, o dominio extracelular de Tim4 (Tim4D), que ten a capacidade de recoñecer residuos de fosfatidilserina presentes na membrana dos exosomas. Tim4D foi clonado nos plásmidos pYD1, pYD5 e pCTcon2 e expresado na cepa EBY100 de *S.cerevisiae*, co obxectivo de validar o seu uso como sistema de captura de exosomas.

Os procedementos incluíron clonación por recombinación homóloga, transformación bacteriana e en lévedos, e análise da expresión mediante técnicas como *Western Blot*, *Dot Blot* e citometría de fluxo. A expresión de Tim4D na superficie dos lévedos suxire que esta metodoloxía podería ser unha alternativa viable, barata e eficiente aos métodos tradicionais de illamento de exosomas.

Con todo, o emprego de técnicas máis complexas e a análise dos reactivos que compoñen os medios de cultivo mellorarían a detección da expresión da proteína de fusión para a aplicación dos exosomas en investigación biomédica e terapias baseadas en vesículas extracelulares.

Palabras chave: Exosomas, Lévedo, Tim4, Illamento, Vesículas extracelulares.

Resumen

Los exosomas son un tipo de vesículas extracelulares cuya biogénesis ocurre en la vía endosómica de la célula. Su secreción es un proceso evolutivamente conservado y se sabe que desarrollan un papel crucial en la comunicación intercelular. Estas vesículas, transportan proteínas transmembrana o componentes citoplasmáticos, lo que demuestra su potencial como biomarcadores no invasivos para el diagnóstico de diversas patologías como el cáncer. No obstante, en la actualidad los protocolos son muy complejos y costosos, por lo que se requiere desarrollar nuevas técnicas.

En este estudio, se busca desarrollar un nuevo protocolo que permita aislar exosomas humanos mediante el uso de la tecnología de presentación en superficie de levaduras, que permite la expresión de proteínas recombinantes en la pared celular. En este caso, el dominio extracelular de Tim4 (Tim4D), que tiene la capacidad de reconocer residuos de fosfatidilserina presentes en la membrana de los exosomas. Tim4D fue clonado en los plásmidos pYD1, pYD5 y pCTcon2 y expresado en la cepa EBY100 de *S.cerevisiae*, con el objetivo de validar su uso como sistema de captura de exosomas.

Los procedimientos incluyeron clonación por recombinación homóloga, transformación bacteriana y en levaduras, y análisis de la expresión génica mediante técnicas como *Western Blot*, *Dot Blot* y citometría de flujo. La expresión de Tim4D en la superficie de las levaduras sugiere que esta metodología podría ser una alternativa viable, barata y eficiente a los medios tradicionales de aislamiento de exosomas.

Con todo, el empleo de técnicas más complejas y el análisis de los reactivos que componen los medios de cultivo, mejorarían la detección de la expresión de la proteína de fusión para la aplicación de los exosomas en investigación biomédica y terapias basadas en vesículas extracelulares.

Palabras clave: Exosomas, Levadura, Tim4, Aislamiento, Vesículas extracelulares.

Abstract

Exosomes are a type of extracellular vesicle whose biogenesis occurs in the cell's endosomal pathway. Their secretion is an evolutionarily conserved process, and they are known to play a crucial role in intercellular communication. The vesicles transport transmembrane proteins or cytoplasmic components, demonstrating their potential as non-invasive biomarkers for the diagnosis of various pathologies such as cancer. However, current protocols are very complex and expensive, necessitating the development of new techniques.

This study seeks to create a new protocol for isolating human exosomes using yeast surface display technology, which allows for the expression of recombinant proteins in the cell wall. In this case, the extracellular domain of Tim4 (Tim4D), that has the ability to recognize phosphatidylserine residues present in the exosome membrane. Tim4D was cloned into plasmids pYD1, pYD5 and pCTcon2 and expressed in the *S.cerevisiae* strain EBY100, with the aim of validating its use as an exosome capture system.

This work included cloning by homologous recombination, bacterial and yeast transformation, and gene expression analysis using techniques such as Western Blot, Dot Blot and flow cytometry. The expression of Tim4D on the surface of yeast suggests that this methodology could be a viable, inexpensive and efficient alternative to traditional methods of exosome isolation.

However, the use of more complex techniques and the analysis of the reagents in the culture media would improve the detection of fusion protein expression for the application of exosomes in biomedical research and extracellular vesicle-based therapies.

Keywords: Exosomes, Yeast, Tim4, Isolation, Extracellular vesicles.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Vesículas extracelulares

1.1.1 Características xerais

As células comunícanse entre si mediante a secreción de diferentes tipos de biomoléculas, entre as que se atopan as proteínas, os lípidos ou os ácidos nucleicos (incluídos os miARN). Estas moléculas sinal poden ser empacetasadas en vesículas extracelulares (VEs), as cales van evitar que se degraden rápido e escapen da vixilancia inmunolóxica, o que resulta na comunicación intercelular e a longa distancia. Estas partículas, descritas por primeira vez en 1967, están compostas por unha bicapa lipídica que se liberan por practicamente tódolos tipos celulares estudados ata a actualidade, tanto en condicións fisiolóxicas como patolóxicas, e son detectadas en tódolos fluídos e tecidos corporais (Merchant et al., 2017). Recentemente, grazas aos avances na tecnoloxía analítica, son moitos os tipos de VEs identificados, con tendencia a seguir aumentando nos vindeiros anos.

A gran maioría das células eucariotas animais presentan un diámetro de entre 10 e 100 μm e as vesículas que liberan ao espazo extracelular poden ter un tamaño dende 5 nm ata máis de 5 μm (Figura 1).

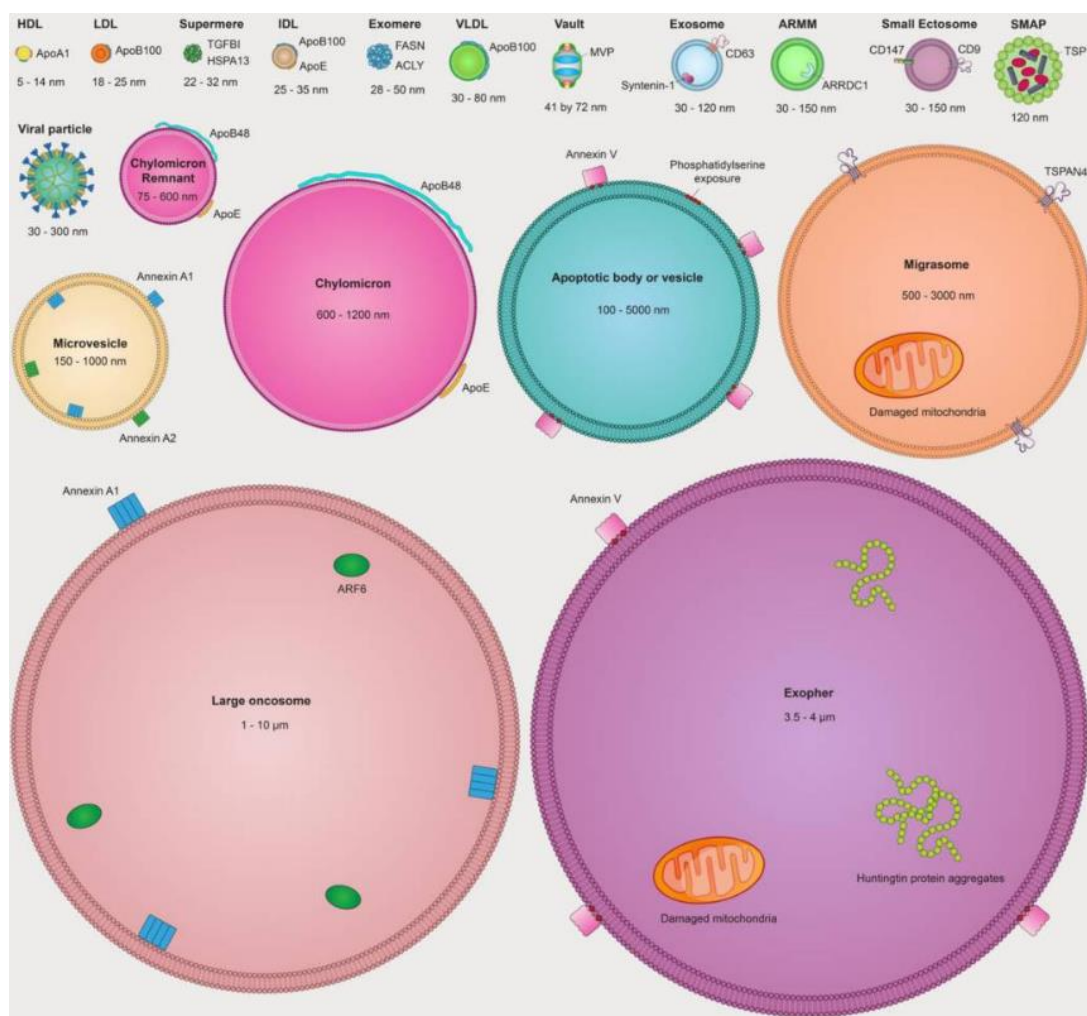


Figura 1. Tipos de VEs liberadas polas células animais. Fonte: (Jeppesen et al., 2023).

Cando se descubriu a súa vía de formación por Pan et al. en 1983, pensábase que as VEs eran o medio axeitado para que as células normais acumularan substancias de refugallo, co obxectivo de manter a homeostase normal dos tecidos ou para que as células cancerosas induciran o avance do tumor e da metástase. En cambio, na actualidade está establecido que estas partículas están implicadas en distintos procesos de sinalización intercelular, facilitado pola transferencia da carga das VEs ás células receptoras tras a absorción, ou pola interacción de proteínas de superficie das vesículas cos receptores celulares situados na membrana plasmática. Este tipo de comunicación célula a célula é esencial para manter unha función fisiolóxica normal, xa que as alteracións nel vinculáronse con enfermidades vasculares, cancro, trastornos neurolóxicos e inmunolóxicos, etc. Ademais, biomoléculas como as proteínas ou os lípidos, son biomarcadores potenciais e dianas terapéuticas, polo que as VEs poden ser unha vía potencialmente atractiva para a administración de fármacos (Herrmann et al., 2021).

As VEs clasifícanse en 3 grupos en función da súa formación (**Figura 2**). As apoptomas xéranse pola fragmentación de células sometidas á morte celular programada, os ectosomas fórmanse por xemación directa cara fóra da membrana celular e os exosomas (explicados con máis detalle máis adiante), xéranse por xemación cara dentro de distintos compartimentos endosomais que logo se fusionan coa membrana plasmática (Jeppesen et al., 2023).

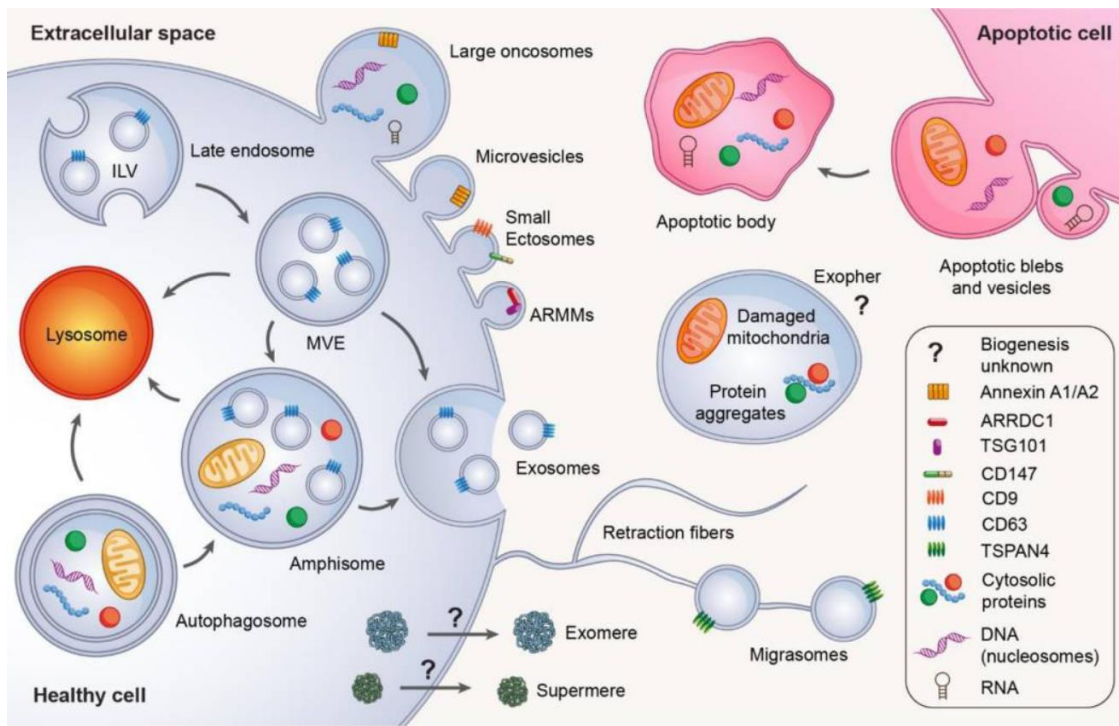


Figura 2. Clasificación actual das vías de síntese das VEs e nanopartículas seleccionadas. Fonte: (Jeppesen et al., 2023).

1.1.2 Exosomas

O exosoma é o tipo de VEs de pequeno tamaño máis estudado na actualidade, especialmente nos últimos 7 anos (**Figura 3**). Observáronse por primeira vez como pequenas vesículas intracelulares en reticulocitos que estaban no proceso de maduración (Pan et al., 1985) e teñen a capacidade de flotar nun gradiente de sacarosa nunha densidade de entre 1,13-1,19 g/mL (Tlaposo et al., 1995). A súa formación, comeza cando as proteínas da membrana endocitan por xemación cara dentro da membrana celular e se transfíren a endosomas temperáns (**Figura 4A**), que logo se reciclan na membrana plasmática ou forman os endosomas tardíos, cuxa membrana forma vesículas intraluminais (VIL) nun endosoma multivesicular (EMV) (**Figura 4B**). A xemación ten como resultado a reorientación das proteínas transmembrana endocitosadas, de tal xeito que o ectodominio vai estar exposto cara fóra, mentres que a cola citoplasmática queda orientada cara a parte interna da VIL. A continuación, a fusión dos EMV coa membrana plasmática, induce a liberación das VIL cara o espazo extracelular en forma de exosomas cun tamaño de entre 30 e 150 nm cunha morfoloxía de copa (**Figura 5**) (Jeppesen et al., 2019).



Figura 3. Publicacións relacionadas con exosomas. Fonte: Pubmed.

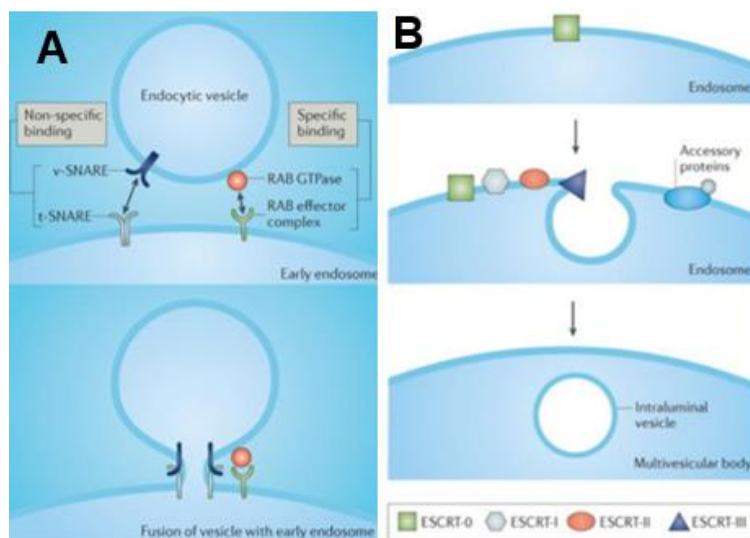


Figura 4. **A:** Fusión da vesícula endocítica cun endosoma temperán. **B:** Formación de VIL. Fonte: (Merchant et al., 2017).

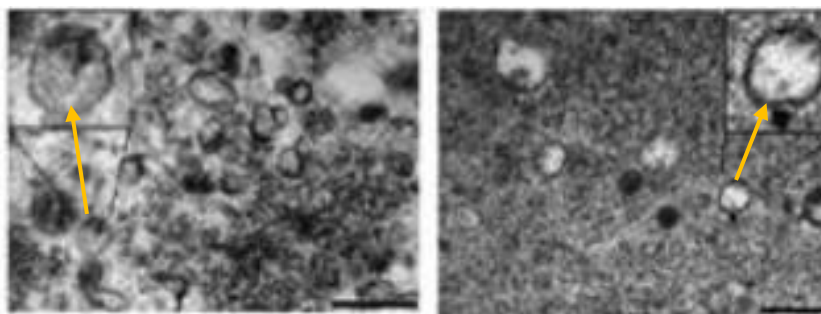


Figura 5. Os exosomas (frechas amarelas) presentan unha forma de copa cando se examinan por microscopía electrónica de transmisión (MET). Fonte: (Ostenfeld et al., 2014).

O complexo de clasificación endosomal requerido para a maquinaria de transporte (ESCRT), é importante para a clasificación de proteínas a VIL no EMV e, polo tanto, para a formación de exosomas. Este tipo de VEs parece desenvolver un papel de mantemento da homeostase da célula mediante a eliminación do ADN citoplasmático prexudicial, polo que a inhibición da súa liberación, levaría a unha acumulación de ADN xenómico na célula que remataría coa iniciación do proceso de morte celular programada ou apoptose (Merchant et al., 2017).

Por outra banda, a familia de proteínas G pequenas RAB, é coñecida por colaborar no tráfico de vesículas en xeral e no de exosomas en particular (**Figura 4A**). A secreción de exosomas está regulada por RAB7, RAB11 e RAB35, mentres que RAB27A e RAB27B encárganse de regular o tráfico de VIL dependente de EMV cara a superficie celular para a súa liberación como exosomas (Jaé et al., 2015). Foi demostrado que a inhibición de tódalas proteínas RAB mencionadas, diminúe dunha forma importante a secreción de exosomas (Ostenfeld et al., 2014). Con todo, aínda queda moito por saber sobre o rol das proteínas RAB tanto na formación dos exosomas como no de outros tipos de VEs.

1.2 Tecnoloxía de presentación en superficie de lévedos/*Yeast surface display* (YSD)

1.2.1 Fundamento da técnica

Para levar a cabo a tecnoloxía de presentación en superficie de lévedos (YSD), hai que fusionar o xene que codifica unha proteína de interese con outro que codifica unha proteína da parede celular da especie de lévedo empregada no estudo. Este xene de fusión, exprésase nas células de lévedo, dando lugar á presentación da proteína na superficie celular. Aínda que se empregaron diferentes cepas de lévedo e varios ancorados de parede celular, o sistema de presentación máis habitual é o das α -aglutininas Aga1-Aga2 en *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*) (Linciano et al., 2019).

O sistema Aga1-Aga2 implica varias etapas. Primeiro, o xene que codifica a proteína ou péptido de interese fúndese con outro que adoita codificar a proteína Aga2, que está unida á subunidade α -aglutinina da proteína Aga1 mediante dous enlaces disulfuro. O xene *AGA2*, presente no xenoma de *S.cerevisiae*, está baixo control dun promotor inducible por galactosa (*GAL1*), de xeito que se se transforma cun plásmido cuxa proteína de fusión tamén está baixo control dun promotor inducible por galactosa, pódese inducir a súa expresión de forma simultánea para conseguir unha maior eficiencia na presentación en superficie.

As proteínas e os péptidos de interese, pódense amosar na superficie do lévedo como fusiões C ou N-terminais á proteína Aga2 (Linciano et al., 2019) (**Figura 6**). A continuación, o xene de fusión, transfórmase en células de lévedo. Para isto hai varios mecanismos: a electroporación ou a transformación en acetato de litio, sendo esta última máis empregada debido a que é máis sinxela, a pesar de que requira máis tempo. Despois, as células transformadas vanse cultivar en condicións selectivas para inducir a expresión da proteína de fusión (Tanaka et al., 2012). Finalmente, se esa proteína se amosa na superficie do lévedo, pódese seleccionar mediante técnicas que requiren de fluorescencia (FACS) ou de electromagnetismo (MACS) (Gera et al., 2013).

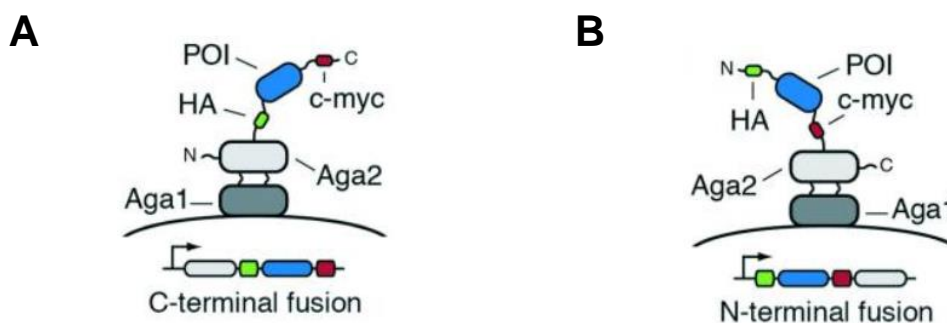


Figura 6. A proteína de interese (POI) sitúase entre dúas etiquetas de epítopo (neste exemplo, antíxeno HA e c-myc, varían segundo o caso), en posición C (**A**) e N-terminal (**B**) a Aga2. A continuación, Aga2 únese a Aga1 a través de dous enlaces disulfuro, entrementes se traduce a proteína de fusión, que logo é secretada ao espazo extracelular. Fonte: (Linciano et al., 2019).

1.2.2 Vantaxes e limitacións

Nos últimos anos, o descubrimento e o desenvolvemento de novos anticorpos (Ac) eficaces con finalidades terapéuticas, revolucionou tanto a investigación como o tratamento. Neste contexto, o YSD, dende a súa invención en 1997, adquiriu unha atención significativa como plataforma robusta e versátil para a selección de Ac, debido a que permite a presentación de proteínas ou péptidos na superficie de células de lévedo, facilitando así a selección e o illamento das variantes desexadas mediante o emprego de distintas técnicas.

Un dos principais beneficios do YSD é a súa capacidade de imitar o proceso natural de selección de Ac producidos no sistema inmune humano (Tanaka et al., 2012). Outro aspecto positivo a destacar é a compatibilidade coa maquinaria de expresión de proteínas eucariotas. A diferenza con respecto ao sistema de presentación de fagos en superficie, cuxas células presentan organización procariota, os lévedos poden pregar e ensamblar tanto proteínas complexas como Ac (Mustafa et al., 2024). Ademais, esta técnica permite producir poboacións de Ac policlonais con diversos modos de unión nun so experimento, a diferenza dos hibridomas que xeran fundamentalmente Ac monoclonais dirixidos a un único epítopo, aspecto moi importante para o estudo de sistemas biolóxicos complexos (Linciano et al., 2019).

Pola contra, o YSD non permite ensinar proteínas de elevado peso molecular debido a que a parede celular do lévedo non é capaz de acomodala nela, polo que esta é unha verdadeira limitación cando se quere traballar con proteínas de alto peso molecular (Mustafa et al., 2024). Tampouco se descarta a posibilidade de que o pregamento da proteína de interese na superficie celular non sexa o correcto, debido a que os lévedos contan con chaperonas propias (que son as encargadas de regular a disposición das proteínas nas células e están presentes na maioría das células animais) que non son as mesmas que as dos mamíferos (Linciano et al., 2019), polo que o pregamento pode verse alterado. Outro problema, é que as células de lévedo non posúen unha maquinaria

tan complexa como nos mamíferos para levar a cabo tódalas modificacións postraducionais da proteína que é obxecto de estudo (Mustafa et al., 2024).

1.2.3 Perspectivas de futuro

Nos últimos anos, a técnica do YSD está sendo empregada para o deseño de novas vacinas orais para o tratamento de enfermidades víricas ou do Alzheimer, mediante o emprego de agregados de péptidos β -amiloide oligoméricos (S. wei Wang et al., 2017). Con todo, o YSD debe mellorar en varios aspectos para que o seu uso poida ser estendido a máis ámbitos. Neste sentido, é importante mellorar a calidade dos Ac empregados incorporando técnicas de mutaxénese, tamén mellorar o proceso de selección con métodos máis eficientes e de alto rendemento (como o emprego da microfluídica), comprender mellor os factores que varían a expresión dos Ac na superficie celular e intentar aplicar esta tecnoloxía na enxeñaría de proteínas ou no desenvolvemento de novos fármacos (Mustafa et al., 2024).

1.3 Glicoproteínas Tim

A familia de receptores de superficie celular Tim (*T-cell immunoglobulin and mucin domain* ou *transmembrane immunoglobulin and mucin domain*) son glicoproteínas de membrana de tipo I descubertas en roedores no ano 2001 por McIntire, et al.. Tempo despois, Kuchroo et al. describiron 8 xenes en ratos na rexión cromosómica 11B1.1 e 3 en humanos na rexión 5q33.2. A día de hoxe, sábese que estes xenes codifican polo menos 4 receptores celulares en ratos (Tim1, Tim2, Tim3 e Tim4) e 3 en humanos (Tim1 Tim3 e Tim4) sendo Tim2 o único receptor murino sen ortólogo humano. (Santiago et al., 2007).

As proteínas Tim humanas comparten unha estrutura semellante composta por un dominio de inmunoglobulina IgV rico no aminoácido cisteína cara o extremo N-terminal, un dominio parecido ao da mucina, unha rexión transmembrana e un dominio citoplasmático que contén residuos fosforilados de tirosina (agás en Tim4) (**Figura 7**) (Z. Wang et al., 2023). A pesar das múltiples semellanzas existentes entre elas, a súa estrutura molecular e o seu patrón de expresión son diferentes, o que suxire que teñen diferentes funcións. O presente estudo estivo centrado fundamentalmente en Tim4, cuxas características serán explicadas en detalle no apartado 1.4.

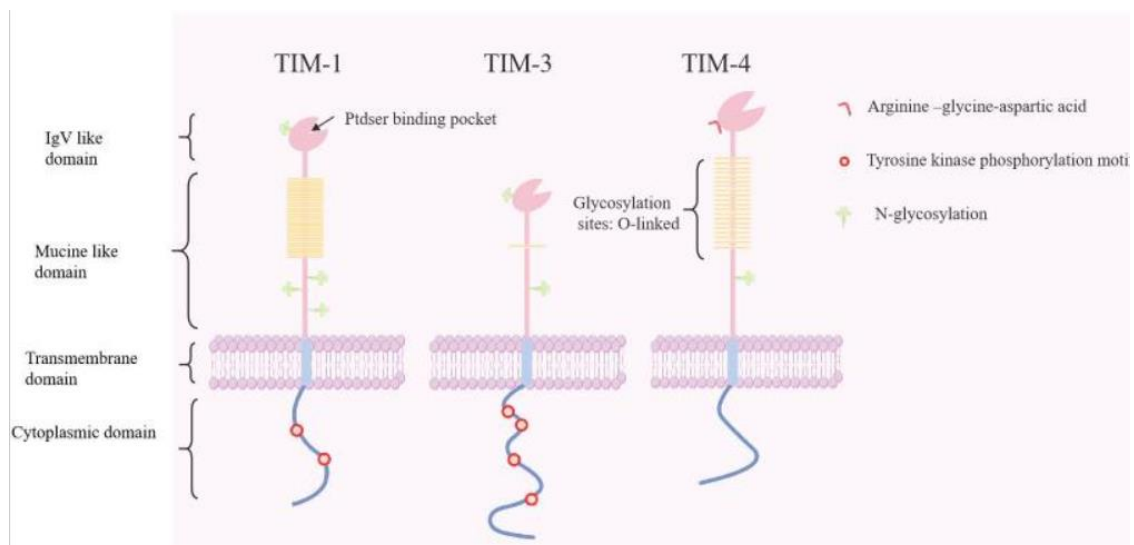


Figura 7. Representación dos dominios das glicoproteínas Tim humanas. Fonte: (Tao et al., 2024).

En xeral, a familia de xenes *TIM* humanos está implicada na regulación da resposta inmunolóxica. *TIM1* exprésase en linfocitos B, mastocitos ou células asasinadas naturais (células NK) e axuda na activación e proliferación dos linfocitos T. As funcións biolóxicas coñecidas de *TIM1* ata o de agora, fan pensar que a proteína codificante vai ter un papel moi importante na elaboración de novos tratamentos contra enfermidades autoinmunes, infeccións virais e tumores (Tao et al., 2024). Pola súa parte, *TIM3* induce a supresión da expresión dos linfocitos T, e en conxunto, da resposta inmunolóxica. Posteriormente, descubriuse que o propio *TIM3* tamén aceleraba a progresión tumoral e apoiaba a tolerancia materno-fetal. Neste contexto, a proteína codificada por este xene, interactúa con varios ligandos como Gal-9 ou HMGB1 e intervén en numerosas respostas inmunes, converténdose nunha diana importante en inmunoterapia (Zhao et al., 2021).

Por outra banda, no traballo elaborado por McIntire, et al., no que se describiron por primeira vez estes xenes, xa advertiron de que os polimorfismos en *TIM1* e *TIM3* podían propiciar o desenvolvemento de enfermidades como a asma ou tamén hipersensibilidade.

1.4 Tim4

1.4.1 Descubrimento e estrutura

TIM4 (*T-cell/transmembrane immunoglobulin and mucin domain 4*) é un xene que codifica un receptor de fosfatidilserina de 60 kDa illado por primeira vez en diferentes tecidos linfoides (como as células estromais da zona marxinal do bazo, os ganglios linfáticos e as placas de Peyer (Shakhov et al., 2004)), que participa no recoñecemento e na eliminación de células apoptóticas. Tradicionalmente, sabíase que se expresaban en células presentadoras de antíxenos (CPA), como os macrófagos, as células dendríticas maduras, os linfocitos B de tipo 1 ou as células NK, do mesmo xeito que os outros membros da familia *TIM*. Pero, estudos recentes identificaron a expresión deste xene tamén en fibroblastos e mesmo en mastocitos en condicións non fisiolóxicas (Liu et al., 2020).

A súa estrutura (**Figuras 7 e 8**) contén unha secuencia conservada de arxinina-glicina-ácido aspártico (semellante a un dominio de rexión variable de Ig e posible secuencia de unión a integrinas), un dominio mucina rico nos aminoácidos treonina, serina e prolina (dominio máis longo) e un dominio intracelular de entre 42 e 77 aminoácidos sen residuos activadores de tirosina fosforilados, cos que si contan as outras dúas proteínas humanas desta familia (*Tim1* e *Tim3*), polo que *Tim4*, en principio, non ten a capacidade de transmitir sinais ao citoplasma (Liu et al., 2020).

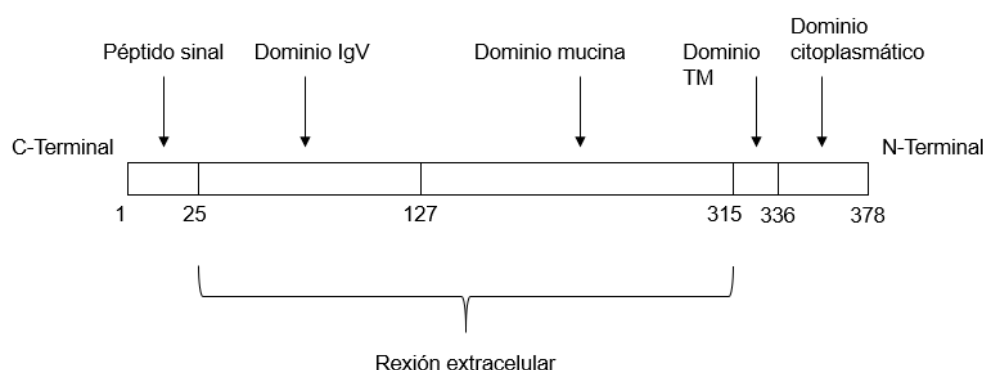


Figura 8. Representación esquemática dos dominios de *TIM4* humano. Adaptado de (Miyanishi et al., 2007).

1.4.2 Funcións

A expresión de *TIM4*, que varía segundo o tipo e contexto celular, propicia que estea involucrado nunha cantidade inxente de funcións diferentes. Considérase que os 2 procesos máis importantes nos que está implicada a proteína son o de regular a actividade dos linfocitos T e exercer de receptor de fosfatidilserina no contexto do recoñecemento das células apoptóticas (Z. Wang et al., 2023).

TIM4 exerce un efecto de regulador bimodal, segundo o estado de activación dos linfocitos T e pode regular a súa función reticulando diferentes receptores. O lipopolisacárido, a toxina colérica, as citoquinas, a concanavalina A ou o patrón de certos probióticos iniben a expresión de *TIM4* debido a que iniben o factor de transcripción *STAT6* nas células dendríticas (Z. Wang et al., 2023).

O recoñecemento de células apoptóticas, é un proceso complicado que inclúe a varias moléculas superficiais, moléculas ponte e receptores de fagocitos. A diferenza de *TIM1* e *TIM3*, *TIM4* é o suficientemente sensible á densidade de fosfatidilserina como para que os fagocitos saiban distinguir entre células apoptóticas das que non o son. Neste sentido, *TIM4* transmite o sinal de “eat me” ás células fagocíticas e logo inicia o proceso de esferecitose. Mais como se comentou anteriormente, o dominio intracelular non contén residuos de tirosina fosforilados, co cal, non se sabe de que forma pode transmitir ese sinal de “eat me” ás células fagocíticas (Z. Wang et al., 2023).

Táboa 1. Ligandos de *TIM4*, lugar de expresión e funcións que exercen. Adaptado de (Tao et al., 2024).

Ligando	Expresión	Funcións
<i>TIM1</i>	PMBC Linfocitos B	Posible implicación na patoxenicidade do lupus erimatoso sistémico Promover o rexeitamento de tumores. Promover a proliferación de linfocitos Th2.
<i>Ptdser</i>	Macrófagos	Facilitar a entrada dos virus nas células diana. Eliminar as células apoptóticas para evitar a autoinmunidade.

TIM4 está involucrado na regulación da actividade das células que forman parte do sistema inmunolóxico tanto en estado fisiolóxico, como en condicións de enfermidade como poden ser as alerxias, enfermidades autoinmunes, infeccións por patóxenos, enfermidades metabólicas crónicas ou cancro (Liu et al., 2020). Os exosomas (**Figura 9**), serven como punto de unión entre Tim4 e Tim1, sendo recoñecidos polos residuos de fosfatidilserina presentes no dominio extracelular de ambos receptores.

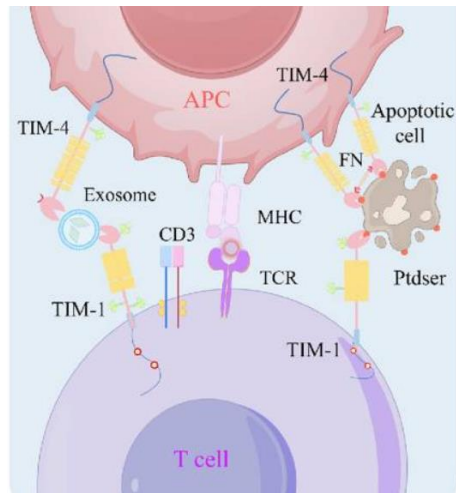


Figura 9. Interaccións de *TIM4* cos seus ligandos. Fonte: (Tao et al., 2024).

1.4.3 Detección de *TIM4*

O YSD, é a técnica que se emprega para estudar a expresión de proteínas de superficie celular, tal e como é a codificada polo xene *TIM4* (Andreu et al., 2021.). Esta, preséntase en forma de proteína de fusión, e a súa expresión pode estar regulada por diferentes sistemas. A elección dunha especie de lévedo ou de outra, vai depender do nivel de expresión requirido e do tamaño da proteína que se vai colocar na superficie celular. O sistema máis empregado é o da α -aglutinina (**ver 1.2.1**), que consta de 2 subunidades, que son Aga1 e Aga2, sendo Aga2 a que inmoviliza Tim4 (Cappellaro et al., 1994). Os vectores utilizados para levar a cabo esta técnica con este sistema adoitan ser pYD1 e pYD5, nos que as fusións xénicas exprésanse baixo o control do promotor *GAL1* e, polo tanto, como se detallará no bloque de materiais e métodos, é a galactosa quen induce a expresión (Z. Wang et al., 2005a).

2. OBXECTIVOS

Este Traballo de Fin de Grao, desenrolado no grupo EXPRELA (Regulación da expresión xénica e aplicacións) do departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular da Universidade da Coruña, pretende avaliar o funcionamento dunha nova metodoloxía para o illamento de vesículas extracelulares, particularmente exosomas, mediante o uso de sistemas biolóxicos vivos, neste caso coa cepa EBY100 do lévedo *S.cerevisiae*. Para iso, establecéronse os seguintes obxectivos:

- Obter a construción pYD5-Tim4D por recombinación homóloga.
- Transformar a cepa EBY100 do lévedo *S.cerevisiae* coas construcións pCTcon2-Tim4D, pYD1-Tim4D e pYD5-Tim4D.
- Determinar a expresión dos plásmidos recombinantes mediante a tecnoloxía de presentación en superficie de lévedos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo desenvolveuse un procedemento de clonación *in vitro*, que consistiu en introducir unha secuencia de ADN coa proteína de interese Tim4D en diferentes plásmidos (empregados como vectores) para xerar un ADN recombinante, o cal foi amplificado en bacterias, purificado mediante miniprep, secuenciado e introducido en lévedos mediante transformación, antes de analizar a expresión da proteína mediante diferentes técnicas (**ver resumo gráfico**). Neste apartado, explicárase en detalle todo o material e a metodoloxía empregados para levar a cabo todos os procedementos.

3.1 Material biolóxico

3.1.1 Cepas de lévedos

Para inducir a expresión da proteína Tim4D, empregouse a cepa EBY100 do lévedo *S.cerevisiae* que ten como xenotipo *MATa AGA1::GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2-delta200 his3-delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL*. Desta cepa convén destacar a auxotrofia ao triptófano (*trp1*) e a inserción no seu xenoma do xene *AGA1*, o cal está baixo o control do promotor *GAL*, que é inducible por galactosa, cun marcador seleccionable que é *URA3*.

Utilízase este fungo dado o seu tempo de crecemento curto, baixo custo de mantemento, facilidade de transformación, pola súa capacidade para promover o pregamento adecuado de proteínas complexas e porque a súa estrutura interna é semellante á das células eucariotas animais (Cherf & Cochran, 2015).

3.1.2 Cepas bacterianas

Para a propagación dos plásmidos citados no apartado 3.1.3 mediante transformación bacteriana, utilizouse a cepa *ECOSTM Blue* [XL1-Blue1] de *E.coli* con xenotipo *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proABlacIqZDM15 Tn10 (TetR)]* (Yeastern Biotech). Empregouse esta especie pola facilidade e rapidez no seu crecemento.

3.1.3 Vectores plasmídicos

Para a clonación das diferentes secuencias de ADN empregáronse os plásmidos pYD1 (Addgene plasmid # 73447; <http://n2t.net/addgene:73447> ; RRID:Addgene_73447), pYD5, que é unha modificación do plásmido pYD1 mediante a adición dun sitio *EcoRI* augas abaixo do sitio *NheI* (Z. Wang et al., 2005b) e pCTCon2 Aga2P-HRP (Addgene plasmid # 73152; <http://n2t.net/addgene:73152> ; RRID:Addgene_73152).

3.2 Medios de cultivo de microorganismos

Os reactivos necesarios para a preparación dos distintos medios, foron pesados na báscula convencional *PS600/c/2* (RADWAG), agás aqueles nos que as cantidades eran moi pequenas, para os que se empregou a báscula de precisión *AS220.R2* (RADWAG). Para completar o volume final a preparar de cada medio, engadiuse H₂O e esterilizouse no autoclave a 121°C.

3.2.1 Medio LB

As cepas recombinantes de *E.Coli* cultiváronse nun medio *Luria-Bertani* (LB), o cal presenta unha composición de *Tryptone* (Condalab) (1%), *BactoTM Yeast Extract* (Gibco) e *Sodium Chloride* (NZYTech) (0,5%). A bactotriptona e o extracto de lévedo proporcionan ao medio os nutrientes necesarios para o óptimo desenvolvemento da maioría dos microorganismos e o NaCl mantén o seu equilibrio osmótico (Ausubel, 2007).

3.2.2 Medio YPD

Os lévedos mantivéronse e propagáronse nun medio *Yeast extract Peptone Dextrose* (YPD) que presenta unha composición de 1% de *Tryptone* (Condalab), 0,5% de *BactoTM Yeast Extract* (Gibco) e 0,5% de *D(+)* *Glucose Anhydrous* (NZYTech). Aínda que os lévedos crecen con facilidade nun medio composto unicamente por glicosa, a suma de hidrolizados de proteínas e de extractos celulares de lévedos permitiron que ese crecemento se levara a cabo cunha maior velocidade.

3.2.3 Medio CM-TRP

S.cerevisiae cultivouse nun medio CM-TRP, no que a especificidade no crecemento é o que diferencia este medio con respecto ao YPD, no que en teoría pode crecer calquera tipo de lévedos.

Para a preparación de medio sólido para posteriormente elaborar placas de cultivo, foi necesario un 2% de *D(+)* *Glucose Anhydrous* (NZYTech), 1,5% de *Agarose Ultrapure grad* (NZYTech), 0,004% de *L-Histidine monohydrochlorid monohydrate* (SIGMA life science), 0,004% de *Adenine, minimum 99%* (SIGMA life science), 0,004% de *L-Leucine* (SIGMA-ALDRICH), 0,004% de *Uracile minimum 99%* (SIGMA life science) e 0,004% de *L-Tyrosine* (SIGMA-ALDRICH). A maiores, engadiuse un 0,5% de mestura de aminoácidos (preparada no laboratorio) e un 6,68% de medio YNB (fonte de nitróxeno, vitaminas e elementos traza elaborado tamén no laboratorio), que se preparou noutro matraz diferente e tras o seu autoclavado, foi introducido no principal.

3.2.4 Variante do medio CM-TRP

A cepa EBY100 de *S.cerevisiae* creceuse tamén nun medio CM-TRP pero cunha composición distinta ao habitual coa finalidade de optimizar a súa propagación.

Para a preparación de medio sólido para posteriormente elaborar placas de cultivo, engadiuse un 2% de *D(+)* *Glucose Anhydrous* (NZYTech), 1,5 % de *Agarose Ultrapure grad* (NZYTech), 0,004% *L-Leucine* (SIGMA-ALDRICH) e 0,004% de *L-Methionine* (SIGMA-ALDRICH). A maiores, engadiuse un 0,5% de mestura de aminoácidos (preparada no laboratorio) e un 6,68% de medio YNB (elaborado tamén no laboratorio).

3.2.5 Medio CM-URA

Para a preparación deste medio selectivo sen o nucleótido uracilo engadiuse un 2% de *D(+)* *Glucose Anhydrous* (NZYTech), 0,004% de *L-Histidine monohydrochlorid monohydrate* (SIGMA life science), 0,004% de *Adenine, minimum 99%* (SIGMA life science), 0,004% de *L-Leucine* (SIGMA-ALDRICH), 0,004% de *L-Tryptofan* (SIGMA life science) e 0,004% de *L-Tyrosine* (SIGMA-ALDRICH). A maiores, engadiuse un 0,5% de mestura de aminoácidos (preparada no laboratorio) e un 6,68% de medio YNB (elaborado tamén no laboratorio) preparados noutro matraz diferente e se engadiron ao principal tras o autoclavado.

3.2.6 Medio SDCAA

O medio *Synthetic Dextrose medium with CasAmino Acids* (SDCAA) contén glicosa e é un medio que permite seleccionar o lévedo transformado. Para a súa preparación, necesitouse un 2% de *D(+)* *Glucose Anhydrous* (NZYTech), 0,17% de *DifcoTM YNB* (BD), 0,5% de *CasAmino Acids* DifcoTM, 0,5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,856% de NaH_2PO_4 (Probus S.A), 0,54% de Na_2HPO_4 anhídrido (Scharlabs S.L), 0,004% de *L-Leucine* (SIGMA-ALDRICH) e 0,004% de *L-Methionine* (SIGMA-ALDRICH).

3.2.7 Medio SGCAA

O medio *Synthetic Galactose medium with CasAmino Acids* (SGCAA) está composto por galactosa e é un medio indutor da expresión xénica, que neste caso, pretende activar a expresión da proteína clonada no plásmido (Tim4D), que, como se comentou con anterioridade, está baixo o control do promotor *GAL 1*, que é activado pola galactosa.

Para a preparación de dito medio, necesitouse un 2% de *D(+)* Galactose Anhydrous (SIGMA-ALDRICH), 0,2% de *D(+)* Glucose Anhydrous (NZYTech), 0,67% de Difco™ YNB (BD), 0,5% de CasAmino Acids Difco™, 0,5% de (NH₄)₂SO₄, 0,856% de NaH₂PO₄ (Probus S.A), 0,54% de Na₂HPO₄ anhídrido (Scharlabs S.L), 0,004% de *L-Leucine* (SIGMA-ALDRICH) e 0,004% de *L-Methionine* (SIGMA-ALDRICH).

3.3 Técnicas de manipulación e de análise de ácidos nucleicos

3.3.1 Illamento de ADN

No presente estudo, realizouse unha extracción de ADN en cada mostra individual seguindo o protocolo proporcionado polo kit comercial *NZYMiniprep* (NZYTech), no que se romperon as células dun cultivo mediante choque alcalino, de xeito que se illou o seu ADN plasmídico.

En primeiro lugar, púxose un cultivo das bacterias *ECOS™ Blue* en axitación a 37°C *overnight* (O/N). Para realizar a extracción do plásmido empregáronse 10 mL, que foron centrifugados na centrífuga *Biofuge pico* (Heraeus) (todas as centrifugacións desta técnica realizáronse nesta centrífuga) a 5000 rpm durante 10 min e descartouse o sobrenadante. A continuación, engadíronse 250 µL de *Buffer A1* e púxose o tubo en axitación ata que se resuspendeu completamente o precipitado, antes de pasar o contido a un Eppendorf de 1,5 mL. Nel, engadíronse 250 µL de *Buffer A2* e volteouse 7-8 veces para mesturar correctamente. Despois, engadíronse 300 µL de *Buffer A3*, volveuse voltear 7-8 veces para mesturar e, nese instante, apreciouse unha solución viscosa.

A continuación, centrifugouse a 5000 rpm durante 10 min. Logo, tomáronse columnas do kit, verteuse o contido dos tubos nelas e centrifugouse 1 min a 5000 rpm. Descartouse o sobrenadante. Acto seguido, engadíronse 500 µL de *Buffer AY* en cada columna e, tras esta adición, volveuse centrifugar 1 min a 5000 rpm. O sobrenadante volveuse descartar. Engadíronse 600 µL do *Buffer A4* en cada columna e trala adición, volveuse centrifugar 1 min a 5000 rpm. O sobrenadante descartouse. Nese momento, centrifugouse durante 2 min a 5000 rpm co obxectivo de retirar posibles restos de humidade.

Por último, introduciuse a columna nun Eppendorf de 1,5 mL e engadíronse 35 µL de H₂O MQ. Deixouse incubar 1 min a T^a ambiente e centrifugouse a 5000 rpm durante 1 min. Neste instante, engadiuse un paso a maiores que no kit mencionado non se indica, que consistiu en engadir á columna os 35 µL de H₂O MQ da primeira elución. Acto seguido, incubouse 1 min e volveuse centrifugar nas mesmas condicións para incrementar a eficacia do proceso.

3.3.2 Cuantificación e avaliación da pureza

A cuantificación das mostras de ADN foi realizada mediante a medida da absorbancia a 260 nm empregando o espectrofotómetro *BioSpectrometer Kinetic* (Eppendorf).

A maiores, para avaliar a pureza utilizouse o parámetro A_{260}/A_{280} , sendo o valor de 1,8 o ideal. A H₂O usouse como branco e para levar a cabo cada medida empregáronse 2 µL de mostra.

3.3.3 Secuenciación

Neste estudo, esta técnica non foi realizada no propio laboratorio porque non se dispoñía dun equipo axeitado, polo que as mostras foron enviadas aos servizos de apoio á investigación (SAI) da UDC.

Para a preparación das mostras, seguíronse as indicacións do formulario descargado na seguinte dirección web: [SAI - Bioloxía Molecular](#). Co obxectivo de obter uns resultados fiables, o ADN debía estar libre de ARN, fenol, sales, etanol, EDTA, proteínas, deterxentes, etc. Tiña que haber en cada mostra un volume máximo de 10 μL (diluída ou sen diluír), unha concentración mínima de 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ e o ADN molde podía estar liofilizado ou en auga.

3.3.4 Obtención das construcións

Neste traballo clonouse unha parte da rexión extracelular da glicoproteína Tim4 (en diante, Tim4D), que inclúe o dominio *IgV like*, que ten a capacidade de recoñecer os residuos de fosfatidilserina situados na membrana dos exosomas. Dita clonación realizouse mediante recombinación homóloga entre as secuencias homólogas aos vectores.

Como foi mencionado anteriormente, os plásmidos empregados neste estudo foron pCTcon2, pYD1 e pYD5. pCTcon2 é un plásmido que conta coa ORF do xene *AGA2* que está baixo o control do promotor inducible por galactosa *GAL 1*, do mesmo xeito que *AGA1* en EBY100. A proteína Tim4D está franqueada polas etiquetas *HA* e *MYC* (**Figura 10A**), que facilitan a súa detección mediante anticorpos específicos *anti-HA* e *anti-MYC* (Venkatramani et al., 2023). Pola súa parte, pYD1 é un plásmido que conta co marcador de resistencia a ampicilina en bacterias e en lévedos, e permite o crecemento a cepas auxótrofas en medios sen triptófano, de aí o motivo a empregar o medio CM-TRP. Ao igual que en pCTcon2, o xene *AGA2* está baixo o control do promotor inducible por galactosa *GAL 1*. Na construción (**Figura 10B**), Tim4D sitúase entre o xene *AGA2* e a etiqueta *V5*. A maiores, a etiqueta *6xHis* permite a detección da proteína de fusión no seu extremo C-terminal co *Ac anti-6xHis* (Z. Wang et al., 2005b). O pYD5 (**ver 3.1.3**), é unha modificación de pYD1 (**Figura 10C**), pero na configuración inversa. O propósito destas modificacións, é estudar posibles efectos da orientación da inserción na expresión ou localización da proteína (Z. Wang et al., 2005b).

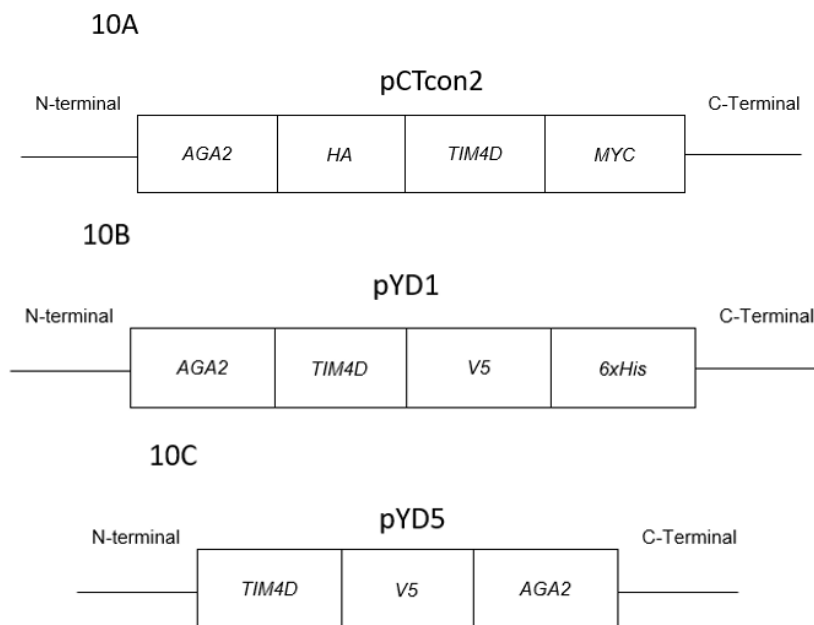


Figura 10. Construcións dos plásmidos. pCTcon2 (**10A**), pYD1 (**10B**) e pYD5 (**10C**).

3.3.5 PCR

A amplificación do inserto que contiña o xene *TIM4*, fíxose mediante PCR convencional. A ADN polimerasa utilizada foi a *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific) a cal presenta, ademais da actividade 5' polimerasa, unha actividade correctora 3' exonucleasa coa que se pode obter unha maior fidelidade. Por outro lado, as secuencias dos cebadores empregados (**Táboa 2**) foron subministrados polo fabricante Eurofins, e preparouse unha dilución dos mesmos para ter un stock cunha concentración de 10 μM .

Táboa 2. Oligonucleótidos empregados para as PCR realizadas. As bases destacadas correspóndense aos sitios de restrición introducidos na secuencia de cada oligonucleótido.

Nome	Secuencia dos cebadores (5'-3')
AJVV448f	GCTCTAGAGTCACTTCAGAGACTGTTGTGACGGAGG
AJVV449r	CCGGAATTCTAGATTCAGGCGCACGTTTATCTTTACATCG

As PCR foron realizadas no termociclador *T100™ Thermal Cycler* (Bio-Rad) co seguinte programa: (1) desnaturalización inicial a 98°C 3 minutos, (2) 30 ciclos de amplificación formado por unha desnaturalización a 98°C 15 segundos, un aliñamento a 56°C 30 segundos e unha extensión a 72°C 1 minuto (**Figura 11**); e (3) extensión final a 72°C 5 minutos. A duración aproximada da PCR foi de 1,5 horas.

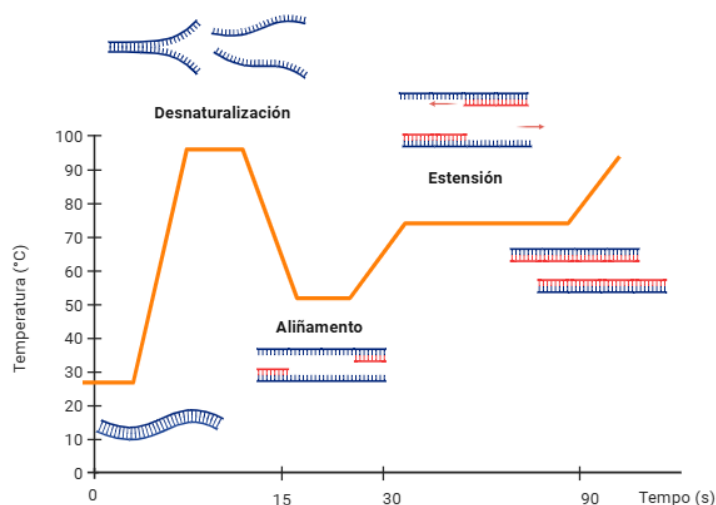


Figura 11. Representación das etapas de amplificación (x30). Imaxe xerada con Biorender.
<https://app.biorender.com>

3.3.6 Electroforese

A avaliación dos produtos das PCR efectuouse migrando os fragmentos amplificados nunha electroforese en xel de agarosa ao 0,7%, empregando *Agarose Ultrapure grad* (NZYTech) e tampón *TAE 1X* (Tris 40 mM, Acido acético 20 mM, EDTA 1mM). Acto seguido, quentouse a mestura ata que se comprobou que toda a agarosa estaba completamente disolta. Despois, deixouse arrefriar durante 5-10 minutos, engadiuse o xel ao soporte e agardouse entre 15 e 20 minutos a que polimerizara. A continuación, engadíronse o marcador de pesos moleculares *DNA Ladder Generuler™ 1kb 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 50 μg* (Thermo Fisher Scientific) e as mostras de PCR, estas últimas xunto co fluoróforo

intercalante *Gelgreen*TM (Biotium) para a visualización do ADN. As condicións do proceso foron de 65 V durante 1 h no equipo *PowerPac Basic 300 V/400 mA/75 W* (Bio-Rad).

Transcorrido o tempo, os resultados visualizáronse empregando luz UV co fotodocumentador *Molecular Imager Gel Doc XR+* (Bio-Rad) xunto co programa *Image Lab 5.2* (Bio-Rad).

3.3.7 Purificación do plásmido pYD5-Tim4D

Realizouse unha purificación do plásmido recombinante pYD5-Tim4D co kit *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Scientific) antes de facer o ligamento. O procedemento seguido foi semellante ao de extracción de ADN (**ver 3.3.1**).

En primeiro lugar, engadiuse o *Binding Buffer* en proporción 1:1 nun tubo Eppendorf de 1,5 mL. A continuación, engadiuse isopropanol en proporción 1:2. Logo, transferiuse a unha columna do kit, centrifugouse na centrífuga *Biofuge pico* (Heraeus) (todas as centrifugacións desta técnica realizáronse nesta centrífuga) 1 min a 13000 rpm e descartouse o sobrenadante. Despois, engadíronse 700 μ L do *Wash Buffer*, volveuse centrifugar 1 min a 13000 rpm e descartouse tamén o sobrenadante. Novamente centrifugouse 1 min a 13000 rpm para retirar posibles restos de humidade, transferiuse a columna a un Eppendorf de 1,5 mL, engadíronse 35 μ L de H₂O MQ e centrifugouse durante 1 min a 13000 rpm. Engadiuse un paso a maiores que no kit non se indica, que consistiu en engadir á columna os 35 μ L de H₂O MQ eluídos. Acto seguido, incubouse 1 min e volveuse centrifugar nas mesmas condicións, porque deste xeito incrementábase a eficacia do proceso. Finalmente, cuantificouse o ADN purificado mediante a medida da absorbancia empregando o espectrofotómetro *BioSpectrometer Kinetic* (Eppendorf).

3.4 Transformacións

Neste estudo, realizáronse varios tipos de transformacións coa finalidade de introducir nos microorganismos finais o ADN recombinante xerado.

3.4.1 Transformación en lévedos polo método de Acetato de Litio

Para este proceso, empregouse o protocolo optimizado por D. Ángel Pereira Rodríguez no ano 2004.

Primeiramente, preparouse un preinóculo da cepa EBY100 da especie *S.cerevisiae* en medio YPD e deixouse en axitación no incubador a 30°C O/N. A continuación, fíxose unha dilución do mesmo, xa que a concentración celular era moi elevada para efectuar a medida da densidade óptica a 600 nm (OD₆₀₀). Despois, para coñecer o volume da alícuota do cultivo (Vi), aplicouse a **Fórmula 1**:

$$(OD_{600} \cdot FD) \cdot V_i = 0,2 \cdot V_f \longrightarrow V_i = \frac{0,2 \cdot V_f}{OD_{600} \cdot FD}$$

Fórmula 1. Para coñecer o volume da alícuota do cultivo (Vi), o Vf multiplicouse por 0,2 (valor da OD₆₀₀ requirido) e dividiuse este produto entre o produto do valor medido da OD₆₀₀ e o factor de dilución (FD) empregado.

Seguidamente, púxose o matraz en axitación a 30°C durante 2 h ata que a OD₆₀₀ acadou un valor de entre 0,6 e 0,8. Logo, centrifugouse todo o medio na centrífuga *Biofuge pico* (Heraeus) (todas as centrifugacións desta técnica realizáronse nesta centrífuga) durante 3 min a 5000 rpm. Acto seguido, preparouse o *Buffer LiAc-1XTE*, composto por 1XTE ao 10% (EDTA 1 mM; Tris-HCl 10mM, pH 8) e LiAc 0,9 M. Engadiuse ao tubo co precipitado obtido da centrifugación, resuspendeuse no *buffer* e centrifugouse 5 min a 5000 rpm. Logo, deixouse un volume de entre 300 e 400 μ L e nese volume resuspendeuse o precipitado. Despois, realizouse a mestura de transformación en tubos

Eppendorf de 1,5 mL (**Táboa 3**) e, a maiores dos candidatos, fíxose un control negativo que non contiña ADN pero si os demais reactivos.

Táboa 3. Reactivos da mestura de transformación.

Compoñente	Ci
PEG 4000 ao 50%	36,14%
Lévedos resuspendidos en <i>Te-LiAc</i>	-
ADN candidatos	depende
ADN salmón	0,12 mg/mL

Notas: PEG (polietilenglicol). "Depende", quere dicir que cada candidato de cada plásmido, presentaba unha concentración de ADN diferente (**Táboa 5**).

Unha vez feitas as mesturas, leváronse a axitación durante 30 min. Tras ese tempo, engadíronse en cada tubo 88 μ L de DMSO. Logo, leváronse ao termobloque *ThermoMixer* (Eppendorf) a 42°C durante 7 min, centrifugáronse 5 min a 5000 rpm, engadíuselles 1 mL de medio YPD, resuspendeuse o precipitado e introducíronse no incubador a 30°C durante 2 h para a recuperación celular. Ao mesmo tempo, metéronse tamén no mesmo incubador as placas de cultivo con medio CM-TRP para que atemperaran. Transcorrido o tempo, efectuouse outra centrifugación a 5000 rpm durante 5 min para precipitar as células. Despois, resuspendeuse o agregado celular nun volume de entre 50-100 μ L, que foi o que posteriormente se sementou nas placas coa axuda de bolas de vidro. Finalmente, deixáronse incubar a 30°C entre 48 e 72 h.

3.4.2 Transformación en lévedos competentes

Para os lévedos da cepa BJ3505 de *S.cerevisiae*, aos que xa se someteron ao proceso de competencia, realizouse unha transformación seguindo o protocolo dado polo kit *Frozen-Ez Yeast TransformationTM* (Zymo-RESEARCH).

Inicialmente, desconxeláronse 2 alícuotas de 50 μ L de lévedos da cepa mencionada. Unha vez atemperadas, se lles engadiron 5 μ L de ADN extraído. A continuación, engadíronse 500 μ L da *Solución 3* e incubouse a 30°C durante 45 min. Despois, centrifugouse na centrífuga *Biofuge pico* (Heraeus) a 5000 rpm durante 5 min, retiráronse 300-350 μ L de sobrenadante, resuspendeuse o precipitado nese volume e sementouse en placas CM-URA. Finalmente, deixáronse as placas entre 48 e 72 h no incubador.

3.4.3 Transformación en bacterias por choque térmico

Para a realización deste proceso, primeiro desconxeláronse en xeo durante 5 minutos varias alícuotas de 50 μ L de *ECOSTM Blue* de *E.coli*. A continuación, engadiuse o 10% do volume celular de ADN. Para o control negativo, engadiuse o mesmo volume pero de H₂O. Logo, resuspendeuse 4-5 veces para mesturar todo correctamente. A continuación, as células sufriron sucesivos quentamentos e arrefriamentos coa finalidade de desestabilizar a membrana plasmática para inducir a entrada do ADN plasmídico na bacteria. Neste sentido, sometéronse a unha incubación en xeo de 20 min, tras os cales se levaron ao termobloque *ThermoMixer* (Eppendorf) onde permaneceron 45 s a 42°C antes de ser trasladadas de novo ao xeo, neste caso so 2 min. Despois, engadiuse en cada tubo 1 mL de medio LB, as células recuperáronse durante 1 h a 37°C e despois, centrifugáronse na centrífuga *Biofuge pico* (Heraeus) 5 min a 4500 rpm. De seguido, descartáronse 800-850 μ L de sobrenadante e cos 200-250 μ L restantes resuspendeuse o precipitado, sendo este volume o que se sementou en placas LBA. Por último, deixáronse ditas placas O/N no incubador a 37°C.

3.5 Avaliación da expresión xénica

3.5.1 Indución da expresión de Tim4D

Unha vez introducidos os plásmidos nos lévedos, seleccionáronse varias colonias de cada un deles, puxéronse seus respectivos cultivos en 15 mL de medio SDCAA e deixáronse en axitación no incubador a 30°C ata que a OD₆₀₀ dos mesmos estaba nun rango de entre 6 e 8. Cando se cumpriu esta condición, centrifugouse o contido a 2000 rpm durante 3 min na centrífuga *Biofuge pico* (Heraeus) (todas as centrifugacións realizáronse nesta centrífuga). Descartouse o sobrenadante, engadiuse suficiente medio fresco SDCAA para ter unha OD₆₀₀ de 1, resuspendeuse nel o precipitado celular e os cultivos foron postos en axitación no incubador ata que a OD₆₀₀ acadase un valor no intervalo de 2 a 5 unidades. Logo, centrifugouse a 2000 rpm 3 min, descartouse o sobrenadante, engadiuse SGCAA e resuspendeuse o agregado celular en suficiente volume deste medio para obter unha OD₆₀₀ de 1. Seguidamente, colocáronse os cultivos en axitación permanente.

A continuación, a partir dos cultivos anteriores, extraéronse alícuotas de 1 mL a diferentes tempos, para que en estudos posteriores se puidera comprobar cal era o momento de maior expresión da proteína. Ditas alícuotas centrifugáronse a 5000 rpm durante 5 min e despois, os precipitados celulares foron almacenados a -80°C.

3.5.2 Lise celular

Para levar a cabo a lise celular, empregouse un *Lysis Buffer* composto por SDS ao 0,5%, TrisHCl pH 8 50 mM e NaCl 0,5 M. Cada precipitado celular foi sometido a un choque térmico a 95°C no termobloque *ThermoMixer* (Eppendorf) onde permaneceron 5 min. Despois, resuspendéronse en 100 µL do mencionado *Buffer* e logo, sonicáronse no sonicador *Sonics* (*Vibra cell*TM) cunha amplitude do 100% durante 5 ciclos de 2 min, nos que se alternou a sonicación (1 min) coa ausencia da mesma (1 min), tendo unha estancia total de 10 min no aparello cada mostra. Despois, centrifugáronse na centrífuga *Biofuge pico* (Heraeus) a 13000 rpm 15 min e o extracto cru gardouse a -20°C.

3.5.3 Dot Blot

A primeira estimación da expresión da proteína Tim4D, foi mediante a realización dun *Dot Blot*. Para iso, precisouse unha membrana de nitrocelulosa *Amersham*TM *Protran*TM 0,2 µm NC (GE Healthcare Life Sciences) na que se engadiron 5 µL de varios dos candidatos.

Para levar a cabo esta técnica, preparouse unha solución de bloqueo composta por *Milk, Dry Powder* (NZYTech) ao 5% e PBS-T 1X (PBS 0,1% + *Tween 20* (SIGMA-ALDRICH)). Posteriormente, nunhas bolsas plásticas, introducíronse as membranas coas mostras, engadíronselles 5 mL da solución e deixáronse incubar durante 1 h en axitación a T^a ambiente.

A continuación, retirouse a solución e preparouse unha dilución do Ac a utilizar en soro de leite ao 5% con PBS-T 1X, foi engadida na bolsa coa membrana e esta deixouse incubando O/N. Ao día seguinte, efectuáronse 3 lavados de 10 min cada un con PBS-T 1X, e finalmente realizouse o revelado.

3.5.4 Inmunotransferencia (*Western Blot*)

A separación das proteínas segundo o seu peso molecular realizouse mediante electroforese SDS-PAGE empregando xeles de 1 mm. Para a preparación dos mesmos, empregouse un xel separador ao 10% de acrilamida (**Táboa 4A**) e un xel concentrador ao 4% de acrilamida (**Táboa 4B**).

Táboa 4A. Reactivos para o xel separador.

Compoñente	Ci	Cf
H ₂ O MQ	-	-
Tris HCl 1 M (pH 8,8)	1 M	0,375 M
Acrilamida	40%	10%
SDS 20%	20%	5%
APS 10 %	10%	2,5%
TEMED	100 mM	25 mM

Táboa 4B. Reactivos para o xel concentrador.

Compoñente	Ci	Cf
H ₂ O MQ	-	-
Tris HCl 1 M (pH 6,8)	1 M	0,375 M
Acrilamida	40%	10%
SDS 20%	20%	5%
APS 10 %	10%	2,5%
TEMED	100 mM	25 mM

A continuación, deixouse polimerizar durante 10 min, mentres tanto, preparáronse as mostras a analizar en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Os precipitados celulares resuspendéronse en *Loading Buffer* 2,5X e os extractos crús en *Loading Buffer* 1X, preparado a partir de *Loading Buffer* 5X. Logo, sometéronse a un choque térmico a 95°C, deixáronse arrefriar e sometéronse a un breve *spin*.

Para iniciar a electroforese, encheuse o interior do soporte dos xeles e a cubeta con *Running Buffer* 1X e conectáronse os electrodos. Despois, cargáronse os carrís, sendo o primeiro para o marcador de pesos moleculares *NZY Colour Protein Marker II* (NZYTech) e os seguintes para cada unha das mostras a analizar. As condicións da electroforese no equipo *Mini-Protean* (Tetra System) foron 100-120 V durante 20-30 min ata que as mostras acadaron o xel separador e 120-150 V durante 45 min ata que a fronte das mostras acadou o final dos xeles. Uns minutos antes de que rematara, preparouse o material necesario para efectuar a transferencia, neste caso húmida. A solución da mesma estaba composta por un 20% de metanol e un 10% de *Transfer buffer*, o cal foi preparado con 0,3% de *Trisbase* (NZYTech) e 14,4% de *glicine* (NZYTech). A continuación, encheuse a cubeta con dita solución, colocóuselle un adaptador frío e aplicouse unha intensidade de corrente de 200 mA durante 1 h no equipo *Mini-Protean* (Tetra System).

Unha vez finalizada a transferencia, preparouse unha solución de bloqueo composta por *Milk, Dry Powder* (NZYTech) ao 10% e PBS-T (PBS 0,1% + *Tween 20* (SIGMA-ALDRICH)). Dito bloqueo levouse a cabo en axitación a T^a ambiente durante 10 min. Despois, retirouse a solución e preparáronse dilucións dos Ac en soro de leite ao 5% con PBS-T 1X. Estas, foron engadidas en tubos de 50 mL xunto coa membrana e deixáronse en rotación O/N a 4°C. Ao día seguinte, recuperáronse os Ac e realizáronse 3 lavados de 10 min cada un con 10 mL de PBS-T 1X en axitación a T^a ambiente. O Ac secundario, diluíuse en soro de leite ao 5% con PBS-T 1X e engadiuse tamén proteína G nunha dilución 1:5000. Esta mestura, foi engadida noutro tubo xunto coa membrana e deixouse en axitación a T^a ambiente durante 1 h. De seguido, realizáronse 3 novos lavados de 10 min cada un con 10 mL de PBS-T 1X, en axitación a T^a ambiente. Finalmente, para a realización do revelado, empregouse o kit *Pierce™ Ecl Western* (Thermo Fisher Scientific), o cal conta con dúas solucións, que se mesturan en proporción 1:1 e dita mestura se engade por toda a superficie da membrana de nitrocelulosa, para que posteriormente sexa eficaz a aplicación do programa de

visualización de imaxe *Image Lab 5.2* (Bio-Rad) no fotodocumentador *ChemiDoc™ MP* (Bio-Rad).

3.5.5 Citometría de fluxo

Para a análise mediante citometría de fluxo, os cultivos dos candidatos dos diferentes plásmidos fixéronse en medio SGCAA (**ver 3.2.7**), ao cal se lle engadiu un 0,2% de rafinosa en lugar de 0,2% de glicosa. A continuación, extraéronse alícuotas de 1 mL a diferentes tempos, non se centrifugaron, engadíuselles DMSO para criopreservalas e introducíronse no conxelador a -80°C.

A partir das OD₆₀₀ correspondentes a cada alícuota, calculouse o volume de cultivo necesario para chegar a un total de 200000 células por tipo de cultivo. O factor de conversión empregado foi: 1 unidade de OD = $1 \cdot 10^6$ células.

O volume de cultivo resultante para cada caso, centrifugouse a 1200 rpm durante 5 min. Tras eliminar o sobrenadante, o precipitado celular lavouse con PBS. As células volvéronse centrifugar a 1200 rpm 5 min, tras o cal eliminouse o sobrenadante, e o precipitado celular resuspendeuse en 100 µL de PBS 0,5% BSA. Esta suspensión celular incubouse con 1 µL do anticorpo correspondente durante 30 min en escuridade a T^a ambiente. Para detectar as construcións marcadas con histidinas, empregouse o *Ac Alexa Fluor® 488 anti-His Tag* (Biolegend) e para as marcadas con HA, empregouse o *Ac PerCP/Cyanine5.5 anti-HA.11 Epitope Tag* (Biolegend). A cepa EBY100 sen transformar empregouse como control negativo sen marcar.

Para a análise por citometría de fluxo, empregouse un citómetro *CytoFLEX* (Beckman Coulter) cos seguintes parámetros: adquisición de 10000 eventos, velocidade de fluxo rápido e seleccionando un 0,10% de eventos como falso positivo na poboación control (EBY100 sen transformar). Empregáronse os láseres *Blue690* para detectar *Cyanine5.5*, e *Blue525* para detectar o *Alexa Fluor 488*. As gráficas xeráronse co software *CytExpert*.

3.6 Ferramentas bioinformáticas

Para o deseño dos oligonucleótidos empregados nas PCR, empregouse o programa *OligoCalc* (Biotools). Para o revelado das membranas de nitrocelulosa do *Dot Blot* e do *Western Blot*, empregouse o programa de visualización de imaxe *Image Lab 5.2* (Bio-Rad). Para a xeración das gráficas resultantes da citometría de fluxo, empregouse o software *CytExpert*.

4. RESULTADOS E DISCUSIÓN

Partiuse dos plásmidos pYD1, pYD5 e pCTCon2 co obxectivo de introducir mediante recombinación homóloga a secuencia que contiña o xene *TIM4D*, xerando así un ADN recombinante. Estes plásmidos teñen a capacidade de expresarse nas cepas *ECOSTM Blue* de *E. Coli* e EBY100 de *S. cerevisiae* onde posteriormente foron transformados.

4.1 Extracción de ADN plasmídico

As mostrás de ADN purificado dos distintos candidatos dos plásmidos pCTcon2 e pYD1, así como o plásmido que albergaba a proteína completa, foron cuantificadas trala súa extracción mediante Miniprep no espectrofotómetro *BioSpectrometer Kinetic* (Eppendorf), que deixou os resultados expostos na **Táboa 5**:

Táboa 5. Concentracións e relacións A_{260}/A_{280} das mostrás dos candidatos empregados.

Candidato	Concentración (ng/ μ L)	Relación A_{260}/A_{280}
C3 pCTCon2-Tim4D	604,0	1,87
C6 pCTCon2-Tim4D	667,0	1,85
C9 pCTCon2-Tim4D	600,4	1,85
C11 pCTCon2-Tim4D	365,9	1,83
pYD1-Tim4D	445,8	1,81
pEx-A55-Tim4full	258,7	1,84

Estas cifras reflicten que a concentración de ADN nas mostrás de partida é elevada, polo que as extraccións foron levadas a cabo con éxito. Ademais, o ADN é puro, posto que os valores da relación A_{260}/A_{280} están bastante próximos a 1,8 (valor ideal) en practicamente tódolos casos. Estas afirmacións indican que o protocolo seguido permite extraer un ADN de calidade, puro e en cantidade para ser empregado nos procesos sucesivos.

4.2 Obtención do ADN recombinante pYD5-Tim4D

A proteína de interese, xa fora introducida nos plásmidos pCTcon2 e pYD1 antes de iniciar o traballo, polo que só houbo que clonala en pYD5. Para iso, primeiro amplificouse a secuencia de ADN coa proteína de interese mediante PCR convencional, logo dixeríronse tanto o produto da PCR como o plásmido pYD5 baleiro e por último, purificáronse e ligáronse.

4.2.1 Amplificación da secuencia con Tim4D

Para xerar o ADN recombinante pYD5-Tim4D, primeiro realizouse unha PCR convencional na que foi amplificado o fragmento de ADN que contiña a secuencia completa da proteína Tim4D (pEx-A55-Tim4full) (**Táboa 6**). Para esta proba, foi necesario a diluír a mostra de ácido nucleico 10 veces dada a súa elevada concentración.

Táboa 6. Reactivos da mestura da PCR de pEx-A55-Tim4full.

Compoñente	Ci	Cf
pEx-A55-Tim4full	258,7 ng/μL	25 ng/μL
AJVV448f	100 μM	10 μM
AJVV449r	100 μM	10 μM
dNTP's	2,5 μM	2,5 μM
Buffer	10X	1X
Phussion™	0,02 U/μL	0,02 U/μL
H ₂ O	-	-



Figura 12. Xel de agarosa ao 0,7% en tampón TAE 1X co marcador de peso molecular DNA Ladder Generuler (Thermo Fisher Scientific) e coa Phussion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific). No primeiro carril comezando pola esquerda pódese observar o marcador de pesos moleculares e no segundo, o produto da PCR correspondente ao fragmento de ADN que debería conter o xene TIM4.

Como esta PCR non dou resultados satisfactorios (**Figura 12**), debido á difícil interpretación do número de pares de bases (pb) que contiña a proteína, fíxose outra variando os reactivos da mesma (**Táboa 7**). A adición dos dNTP's, da Phussion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) e do Buffer foi substituída pola NZYtaq II 2X Colourless Master Mix (NZYTech). As condicións do programa de PCR foron as detalladas en 3.3.5.

Táboa 7. Reactivos da mestura da nova PCR para os fragmentos con TIM4D.

Compoñente	Ci	Cf
pEx-A55-Tim4full	258,7 ng/μL	25 ng/μL
AJVV448f	100 μM	10 μM
AJVV449r	100 μM	10 μM
MasterMix (NZYTech)	2X	1X
H ₂ O	-	-

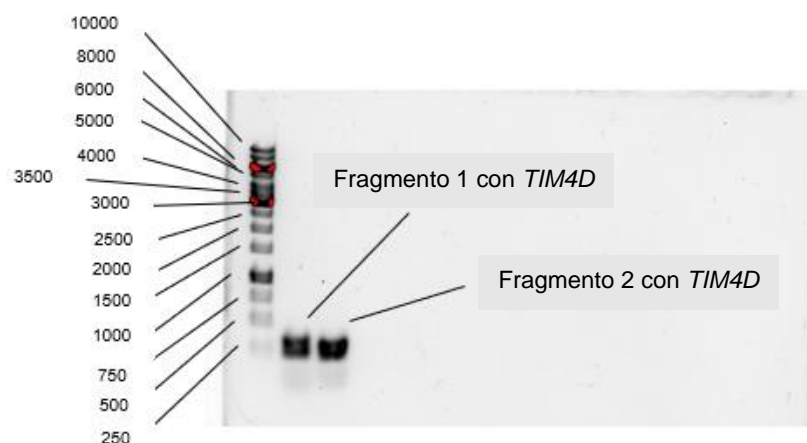


Figura 13. Xel de agarosa ao 0,7% en tampón *TAE 1X* co marcador de peso molecular *Generuler 1kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific) e coa *NZYTaq II 2X Colourless Master Mix* (NZYTech). No primeiro carril comezando pola esquerda pódese observar o marcador de pesos moleculares e nos seguintes, os produtos da PCR correspondentes aos fragmentos de ADN que conteñen *TIM4D*.

A adición de dúas mostras en dous carrís distintos do xel, tiña como obxectivo verificar o número de pares de bases da proteína. O revelado do xel (**Figura 13**), amosa que a proteína de interese conta cuns 250 pb, sendo este valor aceptado debido a que a apreciación das bandas foi boa.

4.2.2 Extracción de pYD5

Para a introdución da proteína de interese Tim4D no plásmido pYD5, realizouse unha Miniprep do plásmido baleiro, seguindo o protocolo explicado no bloque de materiais e métodos, resultando unha concentración de ADN de 110,8 ng/ μ L e unha relación A_{260}/A_{280} de 1,83.

4.2.3 Dixestión, purificación e ligamento de pYD5 e Tim4D

Para eliminar o exceso de ADN molde, o produto de PCR foi tratado con 1 μ L da enzima *DpnI* (NZYTech). Unha vez engadida, as secuencias incubáronse a 37°C durante 3 h. A continuación, a dixestión (**Figura 14**) da amplificación de Tim4D foi realizada coas enzimas *EcoRI* (NZYTech) e *XbaI* (TaKaRa) (**Táboa 8A**) e a do vector pYD5 con *EcoRI* (NZYTech) e *NheI* (Roche Diagnostics) (**Táboa 8B**). Ademais, para a dixestión do plásmido engadiuse a enzima *FastAP Thermosensitive AP* (Thermo Fisher Scientific), que é unha fosfatasa alcalina termosensible que cataliza a liberación dos grupos fosfato situados nos extremos 5' e 3' coa finalidade de evitar recircularizacións que causasen falsos positivos que alterasen os resultados finais. Seguidamente, efectuouse a purificación dos fragmentos (protocolo, **ver 3.3.7**) antes de ligar (**Táboa 9**).

Como foi comentado anteriormente, a dixestión, a purificación e o ligamento dos demais candidatos dos plásmidos pCTcon2 e pYD1 xa estaban feitos cando se iniciou este traballo, por este motivo eses procedementos non se detallaron no presente informe.

Táboa 8A. Reactivos da mestura da dixestión da amplificación de Tim4D.

Compoñente	Ci	Cf
Tim4D amplificado	25 ng/ μ L	17,22 ng/ μ L
<i>EcoRI</i> (NZYTech)	10 U/ μ L	0,56 U/ μ L
<i>XbaI</i> (TaKaRa)	15 U/ μ L	0,83 U/ μ L
Buffer NEB 2.1 (New England Labs)	1X	0,1X
BSA (NZYTech)	0,1%	0,01%

Táboa 8B. Reactivos da mestura da dixestión do plásmido pYD5.

Compoñente	Ci	Cf
pYD5	110,8 ng/μL	60,94 ng/μL
<i>EcoRI</i> (NZYTech)	10 U/μL	0,5 U/μL
<i>NheI</i> (Roche Diagnostics)	10 U/μL	0,5 U/μL
Buffer NEB 2.1 (New England Labs)	1X	0,1X
BSA ao 0,1% (NZYTech)	0,1%	0,01%
<i>FastAP Thermosensitive AP</i> (Thermo Fisher Scientific)	1 U/μL	0,1U/μL
H ₂ O MQ	-	-

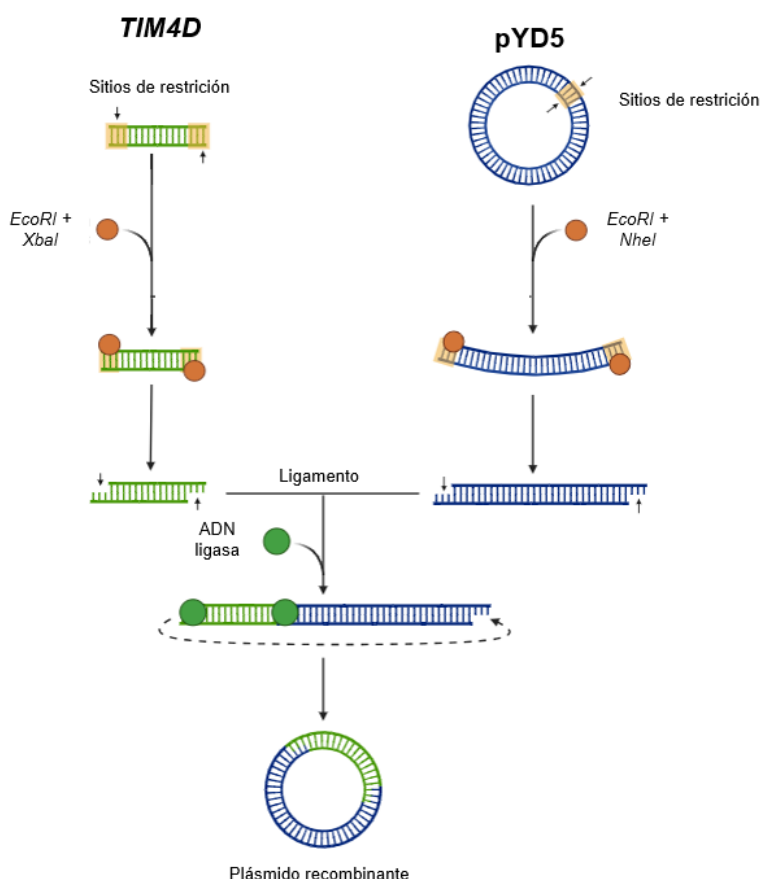


Figura 14. Dixestión de *TIM4D* por *EcoRI* e *XbaI* e de pYD5 por *EcoRI* e *NheI* e ligamento posterior. Imaxe xerada con Biorender. <https://app.biorender.com>

Táboa 9. Concentracións e relacións A_{260}/A_{280} do Tim4D amplificado e do plásmido pYD5 purificados.

Mostra	Concentración (ng/μL)	Relación A_{260}/A_{280}
Tim4D amplificado	28,7	1,83
pYD5 dixerido	8,3	1,67

O ligamento consistiu en unir o inserto que contén o xene *TIM4D*, co plásmido pYD5. Como a distancia entre os puntos de corte das enzimas de restrición era moi pequena (situadas no sitio múltiple de clonación), non se levou a cabo o rescate do xel.

Nas **táboas 10A e 10B**, amósanse os reactivos necesarios para realizar as mesturas do ligamento e do control negativo respectivamente. A ligasa empregada foi a *T4 DNA Ligase* (Thermo Fisher Scientific) e o *buffer* foi o *10X T4 DNA Ligase Buffer* (Thermo

Fisher Scientific). A reacción levouse a cabo a 4°C O/N e ao día seguinte, incubáronse no termobloque *ThermoMixer* (Eppendorf) durante 2 h a 22°C para finalizar.

Táboa 10A. Reactivos da mestura do ligamento.

Compoñente	Ci	Cf
Tim4D amplificado e purificado	28,7 ng/μL	5,74 ng/μL
pYD5 dixerido e purificado	8,3 ng/μL	4,98 ng/μL
T4 DNA Ligase Buffer (Thermo Fisher Scientific)	10X	1X
T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific)	5 U/μL	0,5 U/μL

Táboa 10B. Reactivos da mestura do control negativo.

Compoñente	Ci	Cf
pYD5 dixerido e purificado	8,3 ng/μL	4,98 ng/μL
H₂O	-	-
T4 DNA Ligase Buffer (Thermo Fisher Scientific)	10X	1X
T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific)	5 U/μL	0,5 U/μL

4.3 Análise das transformacións

4.3.1 Obtención de colonias recombinantes pYD5-Tim4D

Para introducir o vector recombinante pYD5-Tim4D na cepa *ECOSTM Blue* de *E.Coli*, levouse a cabo unha transformación por choque térmico e sementado en medio de selección LBA para obter colonias que expresasen Tim4D. A maiores, fíxose unha placa control negativo na que, en lugar de engadir ADN, agregouse H₂O. Tras un tempo de incubación maior do necesario, como non se apreciaron colonias nin na placa control nin na da transformación, houbo que repetir o proceso. Esta ausencia puido deberse a un erro no pipeteo.

Na nova, xa se obtiveron bastantes colonias na placa da transformación, polo que se procedeu á selección de varias nas que, en principio, podería expresarse a proteína de interese. Na placa control negativo, non apareceu nada, así que, validouse o resultado. Seleccionáronse un total de 6 colonias, ás que se lles mediu a concentración de ADN e a relación A_{260}/A_{280} mediante espectrofotometría tras a extracción por Miniprep (**Táboa 11**).

Táboa 11. Concentracións e relacións A_{260}/A_{280} das colonias do ligamento.

Colonia	Concentración (ng/μL)	Relación A_{260}/A_{280}
1	296,9	1,82
2	16,7	1,67
3	185,5	1,83
4	141,5	1,85
5	266,8	1,83
6	18,2	1,84

Ante estes valores, considerouse que nas colonias 1, 3 e 5 podería haber máis expresión que nas outras, porque contaban cunha concentración de ADN elevada e tamén de alta pureza, debido a que o valor da relación A_{260}/A_{280} estaba próximo a 1,8. Para comprobar esta hipótese, realizouse unha amplificación por PCR convencional de tódalas colonias, para validar a presenza de *TIM4* no plásmido pYD5, seguindo o protocolo establecido no apartado 3.3.5. Tódalas colonias foron diluídas 10 veces agás a 2 e a 6 (**Táboa 12**), debido a que presentaban unha baixa concentración de ADN (**Táboa 11**). Para a súa avaliación, fíxose unha electroforese en xel de agarosa ao 0,7% (**Figura 15**).

Táboa 12. Reactivos da mestura da PCR das colonias do ligamento.

Colonia	Ci ADN	Cf ADN	Cf Forward	Cf Reverse	Cf <i>MasterMix</i> [®]
1	296,9 ng/ μ L	29,7 ng/ μ L	10 μ M	10 μ M	1X
2	16,7 ng/ μ L	16,7 ng/ μ L	10 μ M	10 μ M	1X
3	185,5 ng/ μ L	18,6 ng/ μ L	10 μ M	10 μ M	1X
4	141,5 ng/ μ L	14,2 ng/ μ L	10 μ M	10 μ M	1X
5	266,8 ng/ μ L	26,7 ng/ μ L	10 μ M	10 μ M	1X
6	18,2 ng/ μ L	18,2 ng/ μ L	10 μ M	10 μ M	1X

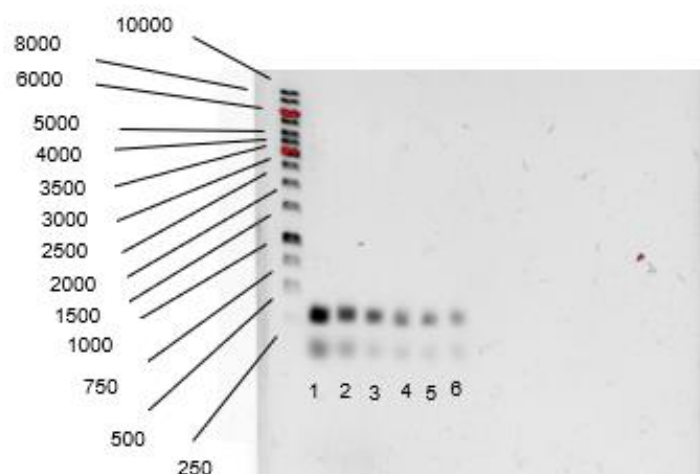


Figura 15. Electroforese en xel de agarosa ao 0,7% en tampón TAE co marcador de peso molecular *Generuler 1kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific). No primeiro carril comezando pola esquerda pódese observar o marcador de pesos moleculares. Nos seguintes, aprécianse tódalas colonias do ligamento, dende a 1 á 6.

Como se pode ver na **Figura 15**, en tódalas mostras analizadas observouse a amplificación do fragmento de *TIM4*, pois obsérvase unha banda á altura dos 250 pb, que era peso molecular agardado (**ver 4.2.1**). A continuación, seleccionáronse as colonias 1 e 3 debido a que a concentración medida por espectrofotometría (**Táboa 11**) foi elevada e a súa visualización no xel era aceptable. Non se escolleu a 2, porque aínda que a súa apreciación no xel era boa, a concentración foi baixa. A colonia 5 tampouco se escolleu pola escasa visibilidade da súa banda no xel, pese a que había moito ADN e puro. A 4 e a 6 non foron escollidas porque apenas se distinguían e a concentración non era alta.

4.3.2 Transformacións en EBY100

Realizáronse varias transformacións das colonias seleccionadas (1 e 3) na cepa EBY100 do lévedo *S.cerevisiae*, seguindo o protocolo exposto no apartado 3.4.1. A

primeira non tivo un resultado satisfactorio debido a que tanto a placa do control negativo como a da transformación estaban contaminadas. Esa contaminación puido deberse a que o medio empregado (variante de CM-TRP) estaba contaminado, ou debido a que os matracos estiveron 30 min máis no incubador a 30°C do que marca o protocolo (estiveron 30 sen axitación e logo os 30 con axitación que se indican), ou que se producira contaminación cruzada.

Descartada a segunda hipótese, repetiuse a transformación, cambiando o medio de cultivo para as placas. En lugar da variante de CM-TRP, utilizouse CM-TRP normal. Tras o período de incubación necesario, comprobouse que na placa control negativo non había crecemento e na da transformación apareceron varias colonias. Entón, o resultado foi válido, escolleuse unha colonia e volveuse sementar para ter stock.

Por outra banda, tamén se efectuaron ao mesmo tempo as transformacións en EBY100 en medio CM-TRP dos candidatos dos plásmidos pCTcon2 e pYD1 que xa estaban preparadas e cuxo ADN purificado xa fora extraído (**Táboa 5**). Ditas transformacións, foron levadas a cabo con éxito.

4.4 Análise da expresión de proteínas

Para estudar a expresión da proteína de fusión Aga2-Tim4D, preparáronse os medios SDCAA e SGCAA (**ver 3.5.1**) e fixéronse extraccións de alícuotas de 1 mL a diferentes tempos (16, 40 e 64 h) de todos os candidatos de pCTcon2, pYD1 e pYD5, que se centrifugaron, se lles retirou o sobrenadante e gardouse o precipitado celular resultante a -80°C. Como foi comentado en varias ocasións, Tim4D é unha proteína de membrana, e, neste contexto, lisáronse os lévedos transformados nun *buffer* (**ver 3.5.2**) mediante sonicación.

4.4.1 Dot Blot

Unha vez lisadas as células, para efectuar unha primeira estimación de se a proteína de interese se expresaba ou non, realizáronse varios *Dot Blot* mediante o emprego de varios Ac.

Na primeira análise, empregouse unha dilución 1:500 dun Ac *anti-HA* en soro de leite ao 5% e engadíronse na membrana os candidatos indicados na **Táboa 13**. Dita membrana deixouse en axitación a T^a ambiente O/N. O obxectivo era detectar a presenza da proteína de fusión en pCTcon2.

Táboa 13. Candidatos e función de cada un deles na membrana de nitrocelulosa.

Candidatos	Función
95	Control +
125	Control +
C3 pCTcon2 ás 24 h	Candidato a analizar
pYD1 ás 48 h	Control -
pYD5 ás 24 h	Control -

Ao día seguinte, efectuáronse 3 lavados de 10 min cada un con PBS-T e finalmente, revelouse cunha disolución de DAB (composta por 4,5% Tris HCl, 0,12% DAB, 0,07% NiCl₂ e 0,1% de H₂O₂) e non se apreciou ningún tipo de resultado. Concluíuse que o Ac, non estaba en condicións de ser usado, debido a que levaba preparado dende había moito tempo e fora utilizado en múltiples ocasións.

Por este motivo, realizouse un novo *Dot Blot*, no cal se prepararon 2 membranas: unha na que se engadiu un Ac *anti-His* en dilución 1:5000 (**Táboa 14A**, membrana A), que detectase Aga2-Tim4D en pYD1, xa que a etiqueta δx -His está presente na construción

de dito plásmido (**Figura 10B**) e outra cun novo *anti-HA* en dilución 1:500 (**Táboa 14B**, membrana B), que detectase Aga2-Tim4D en pCTcon2, pola presenza da etiqueta *HA* no plásmido pCTcon2 (**Figura 10A**). As dilucións dos Ac fixéronse segundo o recomendado por varios autores en diversas publicacións bibliográficas. Ambas foron engadidas nas respectivas bolsas coas membranas e incubáronse en axitación a T^a ambiente O/N.

Táboa 14A. Candidatos e función de cada un deles na membrana A (*anti-His*).

Candidatos	Función
95	Control -
125	Control -
C3 pCTcon2 ás 24 h	Control -
pYD1 ás 48 h	Candidato a analizar

Táboa 14B. Candidatos e función de cada un deles na membrana B (*anti-HA*).

Candidatos	Función
95	Control +
125	Control +
C3 pCTcon2 ás 24 h	Candidato a analizar
pYD1 ás 48 h	Control -

Ao día seguinte, efectuáronse os 3 lavados de 10 mL cada un con PBS-T a cada membrana, engadiuse unha disolución 1:5000 de proteína G en soro de leite ao 5% á membrana B e esta deixouse incubar durante 1 h. Despois, efectuáronse outros 3 lavados con PBS-T á membrana B e finalmente, tralo revelado das 2 membranas coa disolución de DAB tampouco se detectou ningún sinal positivo. A raíz deste resultado xurdiron dúas hipóteses: ou ben os Ac empregados non estaban en condicións de ser utilizados, ou que o revelado con DAB non era o suficientemente eficaz como para apreciar a reacción entre a proteína e o Ac.

Neste contexto, decidiuse facer outro *Dot Blot* empregando o Ac *AntiHis 6x-His Tag Polyclonal Antibody HRP PA1-23024* (Invitrogen) (que estaba sen estrear), nunha dilución 1:3000, segundo o indicado en varias fontes bibliográficas. Engadiuse un candidato de pYD5 para avaliar se o Ac empregado reaccionaba (**Táboa 15**).

Táboa 15. Candidatos e función de cada un deles na membrana *AntiHis 6x-His Tag Polyclonal Antibody HRP PA1-23024* (Invitrogen).

Candidatos	Función
95	Control -
125	Control -
C3 pCTcon2 ás 72 h	Control -
pYD5 ás 48 h	Candidato a analizar

Tras os lavados con PBS-T, o revelado fíxose co fotodocumentador *ChemiDocTM MP* (Bio-Rad) baseado en quimioluminiscencia xunto co programa informático *Image Lab 5.2* (en lugar de con DAB) para o cal, se preparou unha disolución en proporción 1:1 dos 2 reactivos que contiña o kit *PierceTM Ecl Western* (Thermo Fisher Scientific) (**Figura 16**).

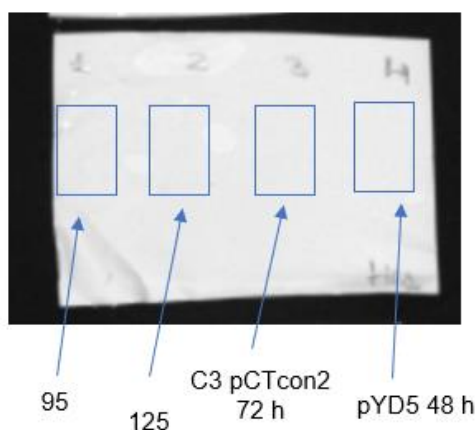


Figura 16. Revelado co fotodocumentador *ChemiDoc™ MP* (Bio-Rad) baseado en quimioluminiscencia xunto co programa informático *Image Lab 5.2* da membrana co anticorpo *AntiHis 6x-His Tag Polyclonal Antibody HRP PA1-23024* (Invitrogen).

O resultado foi que tampouco se visualizou nada. Entón, xurdiron varias hipóteses: ou que o novo Ac non se unía á proteína, que houbo un erro de protocolo ou que a solución de revelado non era apta para ser usada. Esta última foi a hipótese correcta, xa que foi comprobado na detección de outras proteínas por parte de outros compañeiros de laboratorio, que os reactivos non estaban funcionando. Ao cambialos, confirmouse que o *anti-His* funcionaba.

Unha vez máis, preparáronse 2 novas membranas de nitrocelulosa: unha para o Ac *AntiHis 6x-His Tag Polyclonal Antibody HRP PA1-23024* (Invitrogen) (Membrana A, **Táboa 16A**) e outra para o Ac *anti-HA* (Membrana B, **Táboa 16B**). Para a membrana A, ademais dos controis 95 e 125, engadiuse unha proteína xa purificada, que presenta na súa estrutura unha etiqueta de histidinas (Bir A) que servise como control positivo que confirmase o funcionamento do Ac. Dita proteína atópase marcada cunha cola de His.

Táboa 16A. Candidatos e función de cada un deles na membrana A (*AntiHis 6x-His Tag Polyclonal Antibody HRP PA1-23024* (Invitrogen)).

Candidatos	Función
Bir A	Control +
95	Control -
125	Control -
C3 pCTcon2 ás 72 h	Control -
pYD5 ás 48 h	Candidato a analizar

Táboa 16B. Candidatos e función de cada un deles na membrana B (*anti-HA*).

Candidatos	Función
95	Control +
125	Control +
C3 pCTcon2 ás 72 h	Candidato a analizar
pYD5 ás 48 h	Control -

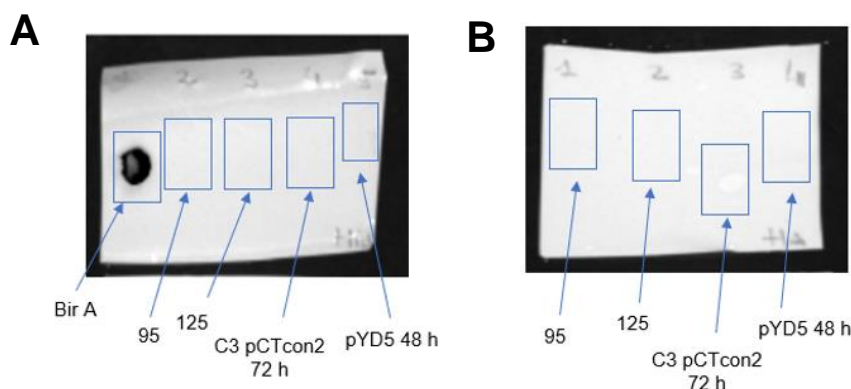


Figura 17. Na membrana A, revelouse co *AntiHis 6x-His Tag Polyclonal Antibody HRP PA1-23024* (Invitrogen) e na membrana B, revelouse co anti-HA. Resultados obtidos tralo revelado co fotodocumentador *ChemiDoc™ MP* (Bio-Rad) baseado en quimioluminiscencia xunto co programa informático *Image Lab 5.2*.

Con estes resultados, sacáronse varias conclusións. Primeiro, que o Ac *anti-His* funcionaba correctamente, debido a que aparece o sinal de Bir A, aínda que non se comproba se a proteína de fusión Aga2-Tim4D se expresa nas mostras dos candidatos utilizados. Segundo, que o pYD5 ao non conter na súa construción a etiqueta *6x-His* (**Figura 10C**) é practicamente imposible que o Ac empregado detecte unha mostra con este plásmido; e terceiro, que os controis positivos para o *anti-HA* 95 e 125 non compren coa súa función tras varias análises. Neste punto valorouse se xa se realizaba un *Western Blot*, solubilizando e engadindo todo o precipitado celular dispoñible, ou se se realizaba unha nova lise máis intensa que rompería mellor as células, deixando máis libre a proteína e cambiando os controis positivos. Na lise anterior, omitiuse o choque térmico a 95°C, paso esencial para que a técnica resulte eficaz. Polo tanto, a solución foi a de repetir todo o procedemento, empregando como controis positivos, os plásmidos pCTCon2, pYD1 e pYD5 baleiros xa que, en principio permiten unha mellor expresión das etiquetas *HA* e *6x-His*, que son as que recoñecen os anticorpos empregados nas análises de expresión. Para a súa preparación, transformáronse en EBY100 de *S.cerevisiae*, seleccionáronse os lévedos, induciuse a súa expresión xénica tras os cultivos nos medios SDCAA e SGCAA (nesta ocasión, as alícuotas de 1 mL foron extraídas ás 6, ás 24 e ás 48 h) e lisáronse as células. Non houbo constancia de omisión de ningún paso.

Para efectuar a nova lise, engadiuse DTT 10 mM ao *buffer* de lise, que é un axente redutor que serve para romper enlaces disulfuro, coa finalidade de liberar a Aga2-Tim4D da membrana plasmática. Antes de efectuar a sonicación, as células resuspendidas no *buffer* de lise foron sometidas a un choque térmico a 95°C no termobloque. Ao finalizar a lise, realizouse un novo *Dot Blot*, seguindo os pasos especificados anteriormente (**ver 3.5.3**), empregando o Ac *AntiHis 6x-His Tag Polyclonal Antibody HRP PA1-23024* (Invitrogen) (**Figura 18**). As funcións de cada compoñente detállanse na **Táboa 17**.

Táboa 17. Candidatos e función de cada un deles na membrana (*AntiHis 6x-His Tag Polyclonal Antibody HRP PA1-23024* (Invitrogen)).

Candidatos	Función
Bir A	Control +
pYD1 baleiro 24 h	Control +
pYD1-Tim4D 24 h	Candidato a analizar
pYD1-Tim4D 48 h	Candidato a analizar
pYD5-Tim4D 24 h	Control -

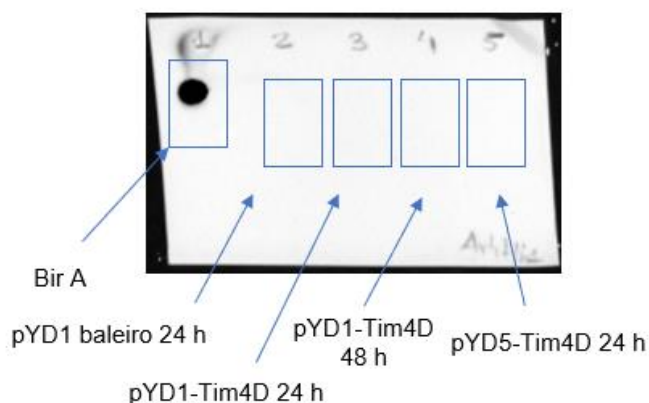


Figura 18. Resultados do *Dot Blot* tralo revelado co fotodocumentador *ChemiDoc™ MP* (Bio-Rad) baseado en quimioluminiscencia xunto co programa informático *Image Lab 5.2*.

O revelado da membrana amosa que a proteína de fusión non se expresa, nin tampouco se aprecia a expresión da etiqueta de histidinas no plásmido empregado como control positivo (pYD1 baleiro 24 h). So se confirma o funcionamento do Ac coa expresión de Bir A. Nesta ocasión puido acontecer que Aga2-Tim4D non se solubilizara o suficiente como para que se detectara. En consecuencia, solubilizáronse tódolos precipitados celulares de tódolos candidatos de tódolos plásmidos baleiros e coa proteína fusionada, coa finalidade de comprobar se Tim4D quedou ancorada ou non na membrana, empregando como técnica o *Western Blot*.

4.4.2 Resultados do *Western Blot*

Para asegurar que Tim4D non se quedou na membrana plasmática sen solubilizar, os pellets correspondentes ás extraccións a diferentes tempos resuspendéronse en *Loading Buffer 2,5X*, mentres que aos extractos crús engadíuselles *Loading Buffer 5X*, de tal xeito que acadasen unha concentración final de 1X. O revelado das membranas de nitrocelulosa trala incubación cos Ac *anti-His* e *anti-HA*, amosou o exposto na **Figura 19**. A correspondente ao *anti-His* (**Figura 19A**), non se aprecia ningún sinal. Vese a proteína purificada empregada como control positivo ao Ac, neste caso HMGB1, que está marcada con histidinas e que ten un peso molecular duns 25 kDa, mais non hai ningunha banda significativa en torno aos 25 kDa nos carrís correspondentes ás mostras de interese.

Tampouco, na membrana na que se engadiu o *anti-HA* (**Figura 19B**), se aprecian bandas que indiquen a presenza de Aga2-Tim4D. É certo que hai outras moitas que indican a existencia de outras proteínas, pero ningunha se corresponde coa de interese.

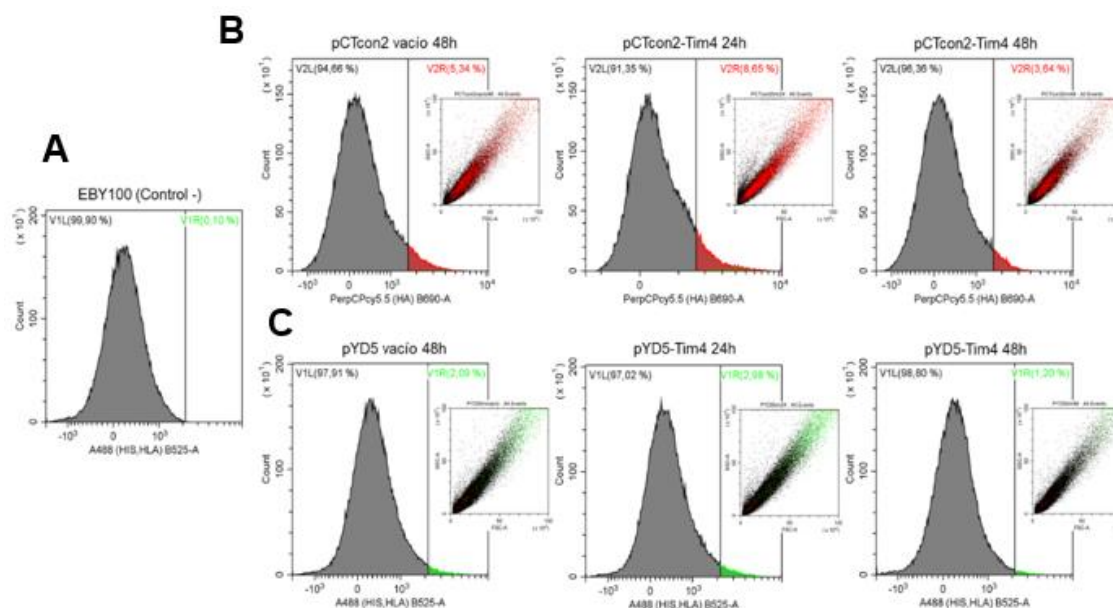


Figura 20. Histogramas (eixo de abscisas, intensidade de fluorescencia en escala logarítmica / eixo de ordenadas, número de eventos) e Dot-plots (eixo de abscisas, FSC / eixo de ordenadas, SSC) de citometría de fluxo. **(A)** Control negativo EBY100 sen marcar. En verde indícase a porcentaxe de falsos positivos. **(B)** De esquerda a dereita: EBY100 con pCTcon2 baleiro ás 48 h; EBY100 con pCTcon2-Tim4D ás 24h e EBY100 con pCTcon2 ás 48 h. En vermello márcase a poboación que se considera positiva indicando a porcentaxe do total. **(C)** De esquerda a dereita: EBY100 con pYD5 baleiro ás 48 h, EBY100 con pYD5-Tim4D ás 24 h e EBY100 con pYD5-Tim4D ás 48 h. En verde márcase a poboación considerada positiva indicando a porcentaxe do total.

Como se pode ver nos histogramas (**Figura 20**), tanto a expresión da etiqueta de histidinas, como a de HA foi baixa en proporción ao total da poboación, pois a porcentaxe de poboación que as expresou non chegou ao 10% en ningún dos casos. Non se detectaron aumentos na expresión da proteína ao aumentar o tempo de indución. Empregando ambos vectores, observouse que a poboación na que se induciu a expresión da proteína diminúe lixeiramente ás 48 h comparado coa expresión ás 24 h. Isto puido ser debido a unha imprecisión á hora de determinar o número de células, de tal xeito que a 48 h o número de células era maior ao estimado, polo que a proporción de Ac con respecto ao número de células era menor a 48 h. Isto podería explicar a lixeira diminución do sinal a 48 h. Atendendo á distribución destas poboacións en canto ao seu tamaño (eixo de abscisas, FSC) e complexidade (eixo de ordenadas, SSC), pódese concluír que existe unha diminución homoxénea en tódalas mostras e, polo tanto, os eventos que deron un sinal positivo correspóndense coas células.

Estes resultados puxeron de manifesto que se conseguiu a indución do plásmido no lévedo EBY100. Con todo, como a maioría da poboación non ten sinal, aínda é necesario mellorar as condicións de indución para aumentar a expresión da proteína de interese.

4.5 Perspectivas futuras

Tal e como se puido comprobar ao longo deste bloque de resultados, é obvio que son necesarias máis investigacións para comprobar o potencial deste novo protocolo que, polas sucesivas incidencias, especialmente na detección da proteína de fusión, sumado á falta de tempo, non se puideron comprobar neste estudo.

A principal mellora que se debería efectuar neste proxecto é a de incrementar a eficacia da posta a punto do proceso de indución da expresión da proteína Aga2-Tim4D. Para iso, habería que volver revisar con detalle todos e cada un dos compoñentes dos medios de cultivo, e estudar en profundidade se algún deles exerce algún tipo de inhibición que durante o proceso experimental deste traballo non se chegou a detectar.

A maiores, tamén se poderían levar a cabo tempos de expresión máis longos, porque pode acontecer que a proteína de interese non comece a expresarse ata despois das 48 h dende o inicio do cultivo, que foi a duración máxima que tiveron os mesmos na maioría dos ensaios ao longo do estudo. Así mesmo, o emprego de técnicas máis sofisticadas, poderían axudar a detectar Aga2-Tim4D ou a revelar erros que coas técnicas utilizadas neste proxecto se descoñecían.

Por último, polas incidencias comentadas e pola falta de tempo, non se puido comparar se a técnica desenrolada era mellor ou peor que a de ultracentrifugación para o illamento dos exosomas da liña celular humana PC3 derivada de cancro de próstata. Esta sería a derradeira fase do proxecto que, para evitar perdas de tempo e sobre todo económicas, non se debería desenvolver ata que se verifique con varias análises a presenza da proteína de fusión.

5. CONCLUSIÓNS

En vista dos resultados obtidos e atendendo aos obxectivos específicos propostos, pódense extraer as seguintes conclusións:

1. Obtívose con éxito a construción recombinante pYD5-Tim4D.
2. Logrouse transformar a cepa EBY100 do lévedo *S.cerevisiae* coas construcións pCTcon2-Tim4D, pYD1-Tim4D e pYD5-Tim4D.
3. O novo protocolo debe incluír melloras e son necesarios máis estudos posteriores para avaliar a efectividade deste método de illamento de exosomas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Andreu, C., Gómez-Peinado, J., Winandy, L., Fischer, R., Li, M., & Olmo, D. (n.d.). Surface display of HFBI and DewA hydrophobins on *Saccharomyces cerevisiae* modifies tolerance to several adverse conditions and biocatalytic performance. *APPLIED GENETICS AND MOLECULAR BIOTECHNOLOGY*. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11090-8/Published>
- Ausubel, F. M. (2007). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons.
- Cappellaro, C., Baldermann, C., Rachel, R., & Tanner, W. (1994). Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. *The EMBO Journal*, 13(20), 4737–4744. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06799.x>
- Cherf, G. M., & Cochran, J. R. (2015). Applications of yeast surface display for protein engineering. *Methods in Molecular Biology*, 1319, 155–175. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2748-7_8
- Gera, N., Hussain, M., & Rao, B. M. (2013). Protein selection using yeast surface display. In *Methods* (Vol. 60, Issue 1, pp. 15–26). <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.03.014>
- Herrmann, I. K., Wood, M. J. A., & Fuhrmann, G. (2021). Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. In *Nature Nanotechnology* (Vol. 16, Issue 7, pp. 748–759). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00931-2>
- Jaé, N., McEwan, D. G., Manavski, Y., Boon, R. A., & Dimmeler, S. (2015). Rab7a and Rab27b control secretion of endothelial microRNA through extracellular vesicles. *FEBS Letters*, 589(20), 3182–3188. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.040>
- Jeppesen, D. K., Fenix, A. M., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Zhang, Q., Zimmerman, L. J., Liebler, D. C., Ping, J., Liu, Q., Evans, R., Fissell, W. H., Patton, J. G., Rome, L. H., Burnette, D. T., & Coffey, R. J. (2019). Reassessment of Exosome Composition. *Cell*, 177(2), 428–445.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029>
- Jeppesen, D. K., Zhang, Q., Franklin, J. L., & Coffey, R. J. (2023). Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging complexities. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 33, Issue 8, pp. 667–681). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.01.002>
- Linciano, S., Pluda, S., Bacchin, A., & Angelini, A. (2019). Molecular evolution of peptides by yeast surface display technology. In *MedChemComm* (Vol. 10, Issue 9, pp. 1569–1580). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c9md00252a>
- Liu, W., Xu, L., Liang, X., Liu, X., Zhao, Y., Ma, C., & Gao, L. (2020). Tim-4 in Health and Disease: Friend or Foe? In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00537>
- Merchant, M. L., Rood, I. M., Deegens, J. K. J., & Klein, J. B. (2017). Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: Implications for biomarker discovery. In *Nature Reviews Nephrology* (Vol. 13, Issue 12, pp. 731–749). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.148>
- Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., & Nagata, S. (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*, 450(7168), 435–439. <https://doi.org/10.1038/nature06307>
- Mustafa, M. I., Alzebair, A. A., & Mohammed, A. (2024). Development of Recombinant Antibody by Yeast Surface Display Technology. In *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery* (Vol. 6). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2024.100174>

- Ostenfeld, M. S., Jeppesen, D. K., Laurberg, J. R., Boysen, A. T., Bramsen, J. B., Primdal-Bengtson, B., Hendrix, A., Lamy, P., Dagnaes-Hansen, F., Rasmussen, M. H., Bui, K. H., Fristrup, N., Christensen, E. I., Nordentoft, I., Morth, J. P., Jensen, J. B., Pedersen, J. S., Beck, M., Theodorescu, D., ... Ørntoft, T. F. (2014). Cellular disposal of miR23b by RAB27-dependent exosome release is linked to acquisition of metastatic properties. *Cancer Research*, 74(20), 5758–5771. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3512>
- Pan, B.-T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., & Johnstone, R. M. (n.d.). *Electron Microscopic Evidence for Externalization of the Transferrin Receptor in Vesicular Form in Sheep Reticulocytes*.
- Santiago, C., Ballesteros, A., Tami, C., Martínez-Muñoz, L., Kaplan, G. G., & Casanovas, J. M. (2007). Structures of T Cell Immunoglobulin Mucin Receptors 1 and 2 Reveal Mechanisms for Regulation of Immune Responses by the TIM Receptor Family. *Immunity*, 26(3), 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.014>
- Shakhov, A. N., Rybtsov, S., Tumanov, A. V., Shulenin, S., Dean, M., Kuprash, D. V., & Nedospasov, S. A. (2004). SMUCKLER/TIM4 is a distinct member of TIM family expressed by stromal cells of secondary lymphoid tissues and associated with lymphotoxin signalling. *European Journal of Immunology*, 34(2), 494–503. <https://doi.org/10.1002/eji.200324590>
- Tanaka, T., Yamada, R., Ogino, C., & Kondo, A. (2012). Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 95, Issue 3, pp. 577–591). <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4175-0>
- Tao, J., Shen, X., Qian, H., Ding, Q., & Wang, L. (2024). TIM proteins and microRNAs: distinct impact and promising interactions on transplantation immunity. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1500228>
- Tlaposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, ~willem, Leijendekker, R., Hardingf Cornelis, C., Melief, J. M., & Geuze, H. J. (n.d.). *B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles*.
- Venkatramani, A., Park, C., & Kaseniit, E. (n.d.). *Designing a protein to specifically bind an MHC-peptide complex*.
- Wang, S. wei, Liu, D. qun, Zhang, L. xiao, Ji, M., Zhang, Y. xin, Dong, Q. xiu, Liu, S. ying, Xie, X. xiu, & Liu, R. tian. (2017). A vaccine with A β oligomer-specific mimotope attenuates cognitive deficits and brain pathologies in transgenic mice with Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0267-5>
- Wang, Z., Chen, C., Su, Y., & Ke, N. (2023). Function and characteristics of TIM-4 in immune regulation and disease (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 51(2). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2022.5213>
- Wang, Z., Mathias, A., Stavrou, S., & Neville, D. M. (2005a). A new yeast display vector permitting free scFv amino termini can augment ligand binding affinities. *Protein Engineering, Design and Selection*, 18(7), 337–343. <https://doi.org/10.1093/protein/gzi036>
- Wang, Z., Mathias, A., Stavrou, S., & Neville, D. M. (2005b). A new yeast display vector permitting free scFv amino termini can augment ligand binding affinities. *Protein Engineering, Design and Selection*, 18(7), 337–343. <https://doi.org/10.1093/protein/gzi036>
- Zhao, L., Cheng, S., Fan, L., Zhang, B., & Xu, S. (2021). TIM-3: An update on immunotherapy. In *International Immunopharmacology* (Vol. 99). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107933>