



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**“Captura de exosomas humanos  
utilizando Tim4 en levaduras”**

**“Captura de exosomas humanos  
utilizando Tim4 en lévedos”**

**“Yeast tools for human exosome  
capture based on Tim4”**



**Sergi Garcia Boscà**

Febrero 2022



**“Captura de exosomas humanos utilizando Tim4 en levaduras”**

**“Captura de exosomas humanos utilizando Tim4 en lévedos”**

**“Yeast tools for human exosome capture based on Tim4”**

Sergi Garcia Boscà

Sergi  
Garcia  
Boscà-  
73102165T

Firmado  
digitalmente por  
Sergi Garcia  
Boscà- 73102165T  
Fecha: 2022.02.07  
17:41:21 +01'00'

**Facultad de presentación:**

Facultade de Ciencias

**Instituciones de realización del Trabajo Fin de Máster:**

Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA)

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular (Facultade de Ciencias, UDC)

El Dr. Ángel José Vizoso Vázquez y la Dra. Mónica Lamas Maceira en calidad de tutores de este Trabajo autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.

En A Coruña a 9 de febrero de 2022.

LAMAS  
MACEIRAS  
MONICA -  
DNI  
32837560T

Firmado  
digitalmente por  
LAMAS MACEIRAS  
MONICA - DNI  
32837560T  
Fecha: 2022.02.08  
10:16:59 +01'00'

VIZOSO  
VAZQUEZ  
ANGEL JOSE -  
DNI  
53163136Q

Digitally signed by  
VIZOSO VAZQUEZ  
ANGEL JOSE - DNI  
53163136Q  
Date: 2022.02.08  
23:35:18 +01'00'

## Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a Ángel y Mónica por permitirme realizar este trabajo. Gracias por todo lo aprendido y por vuestra paciencia infinita en cada día de laboratorio. También a todos los compañeros de *EXPRELA*, os deseo lo mejor.

A los amigos del máster por cada café entre clases mientras el mundo se desmoronaba a nuestro alrededor. En especial, gracias a Carlos, David y Sergio, sois geniales.

A Claudia. Que suerte haber convivido durante este tiempo con una persona tan increíble como tú. Gracias de corazón por todo. Galiza sempre levará o teu nome.

A mis bioquímicos favoritos Néstor, Ester, Ignacio, Óscar y Álex que, aunque la vida nos ha llevado a sitios muy lejanos, seguimos compartiendo nuestros proyectos.

A los de siempre. Gràcies amics, Jordi, Guillem, Ferran y Adrian. Ni Benigànim ni la música tendria sentido sin vosotros.

Y, sobre todo, a mi familia por apoyarme en todas mis decisiones. Gracias Amparo, Pascual y Mònica por ser la mirada invisible durante todo este tiempo, incluso estando a más de 1000 kilómetros de distancia. Vos estime.

# ÍNDICE

Resumen/Resumo/Abstract.....	I
Listado de abreviaturas.....	IV
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Vesículas extracelulares.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Exosomas.....</b>	<b>5</b>
1.2.1 Métodos de aislamiento.....	6
<b>1.3 Tim4.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 <i>Yeast Surface Display</i>.....</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Cepa de levadura y condiciones de crecimiento.....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 Construcción pYD1-Tim4D.....</b>	<b>12</b>
<b>3.3 Purificación del plásmido pYD1-Tim4D.....</b>	<b>14</b>
<b>3.4 Transformación levaduras.....</b>	<b>14</b>
<b>3.5 Extracción de proteínas EBY100.....</b>	<b>14</b>
<b>3.6 Línea celular de mamífero y condiciones de cultivo.....</b>	<b>15</b>
<b>3.7 Obtención de exosomas en medios de cultivo PC3.....</b>	<b>16</b>
<b>3.8 Aislamiento de exosomas.....</b>	<b>16</b>
<b>3.9 <i>Western blot</i>.....</b>	<b>17</b>
3.9.1 Análisis expresión Aga2-Tim4D ( <i>anti-6xHis</i> ).....	17
3.9.2 Análisis exosomas ( <i>anti-flotillin</i> ).....	18
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Construcción y purificación de pYD1-Tim4D.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Transformación EBY100 con pYD1-Tim4D.....</b>	<b>19</b>
<b>4.3 Pruebas de expresión Aga2-Tim4D.....</b>	<b>20</b>
<b>4.4 Análisis de exosomas.....</b>	<b>22</b>
4.4.1 Obtención en medios de cultivo PC3.....	22
4.4.2 Aislamiento exosomas.....	22
4.4.3 Análisis <i>Western blot</i> .....	23

<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>5.1 Perspectivas futuras.....</b>	<b>24</b>
<b>6. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓN/CONCLUSIONS.....</b>	<b>25</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>27</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Clasificación de VEs a partir de su biogénesis.....	1
<b>Figura 2:</b> Funciones de las VEs en la histología normal y en la patogénesis de las enfermedades.....	4
<b>Figura 3:</b> Artículos relacionados con VEs en revista indexadas.....	4
<b>Figura 4:</b> Biogénesis de exosomas. ....	5
<b>Figura 5:</b> Representación esquemática de las regiones y dominios de Tim4 humano.....	8
<b>Figura 6:</b> Mecanismo del método de aislamiento de VEs utilizando Tim4-Fc.....	9
<b>Figura 7:</b> Representación esquemática del sistema Aga1-Aga2.....	10
<b>Figura 8:</b> Mapa gráfico de pYD1.....	13
<b>Figura 9:</b> Representación esquemática del método convencional del sándwich de <i>Western blot</i> .....	17
<b>Figura 10:</b> Representación esquemática del proceso en el <i>Trans-blot turbo</i> .....	18
<b>Figura 11:</b> <i>Western blot (anti-6xHis)</i> de muestras extraídas con $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y microesferas de cristal.....	20
<b>Figura 12:</b> <i>Western blot (anti-6xHis)</i> de muestras extraídas con $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y vórtex.....	21

## Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b> Diferencias entre origen, tamaño, marcadores y contenido de los diferentes tipos de VEs.....	2
<b>Tabla 2:</b> Composición de los medios utilizados para el cultivo de EBY100.....	12
<b>Tabla 3:</b> Secuencia de los cebadores diseñados para flanquear <i>TIM4D</i> .....	19

## Resumen

Los exosomas son un tipo de vesículas extracelulares cuya biogénesis se encuentra en la vía endosómica de las células. La secreción de estas es un proceso evolutivamente conservado y está comprobado que juegan un papel esencial en la comunicación intercelular. Estas vesículas pueden transportar proteínas transmembrana o componentes citoplasmáticos, de modo que se ha comprobado su potencial como biomarcador no invasivo para el diagnóstico de varias enfermedades. Sin embargo, actualmente los protocolos de extracción son laboriosos y caros, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas técnicas.

En este trabajo se busca desarrollar un nuevo protocolo de aislamiento de exosomas humanos expresando una parte de la proteína Tim4 en la superficie de las levaduras. Dicha proteína es capaz de reconocer residuos de fosfatidilserina presentes en los exosomas. Por un lado, se transformó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 con el plásmido pYD1 que contiene una parte de la secuencia del gen *TIM4* y se indujo la expresión de esta proteína en la superficie de la membrana de la levadura. Por otro lado, se cultivó la línea de células humanas PC3 (provenientes de un cáncer de próstata) y del medio de cultivo se aislaron exosomas utilizando dos métodos: un método clásico de ultracentrifugación y nuestro método utilizando levaduras.

**Palabras clave:** Exosomas; Levadura; Tim4; Aislamiento; Vesículas extracelulares

## Resumo

Os exosomas son un tipo de vesículas extracelulares cuxa bióxénesis atópase na vía endosómica das células. A secreción destas é un proceso evolutivamente conservado e está comprobado que xogan un papel esencial na comunicación intercelular. Estas vesículas poden transportar proteínas transmembrana ou compoñentes citoplasmáticos, de modo que se comprobou o seu potencial como biomarcador non invasivo para o diagnóstico de varias enfermidades. Non obstante, actualmente os protocolos de extracción son laboriosos e caros, polo que é necesario o desenvolvemento de novas técnicas.

Neste traballo búscase desenvolver un novo protocolo de illamento de exosomas humanos expresando unha parte da proteína Tim4 na superficie dos lévedos. Dita proteína é capaz de recoñecer residuos de fosfatidilserina presentes nos exosomas. Por unha banda, transformouse a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 co plásmido pYD1 que contén unha parte da secuencia do xene *TIM4* e induciuse a expresión desta proteína na superficie da membrana do lévedo. Doutra banda, cultivouse a liña de células humanas PC3 (provenientes dun cancro de próstata) e do medio de cultivo illáronse exosomas utilizando dous métodos: un método clásico de ultracentrifugación e o noso método utilizando lévedos.

**Palabras clave:** Exosomas; Lévedo; Tim4; Illamento; Vesículas extracelulares.

## **Abstract**

Exosomes are a type of extracellular vesicles whose biogenesis is found in the endosomal pathway of cells. Their secretion is an evolutionarily conserved process and they have been shown to play an essential role in intercellular communication. These vesicles can transport transmembrane proteins or cytoplasmic components, so their potential as a non-invasive biomarker for the diagnosis of various diseases has been proven. However, current extraction protocols are laborious and expensive, so new techniques need to be developed.

In this work we aim to develop a new protocol for the isolation of human exosomes by expressing a part of the Tim4 protein on the yeast surface. This protein can recognize phosphatidylserine residues present in exosomes. On the one hand, the *Saccharomyces cerevisiae* strain EBY100 was transformed with the plasmid pYD1 containing a part of the *TIM4* gene sequence and the expression of this protein was induced on the yeast membrane surface. On the other hand, the human cell line PC3 (from prostate cancer) was cultured, and exosomes were isolated from the culture medium using two methods: a classical ultracentrifugation method and our method using yeasts.

**Keywords:** Exosomes; Yeast; Tim4; Isolation; Extracellular vesicles.

## Listado de abreviaturas

aa: aminoácidos

CD: *Cluster of Differentiation*

CM: medio sintético completo

CM-trp: medio sintético completo sin triptófano

CM-ura: medio sintético completo sin uracilo

CM-ura-trp: medio sintético completo sin uracilo ni triptófano

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DPBS: *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ESCRT: *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*

Fc: Fracción constante de IgG humana

Gal: galactosa

Gal\_CM-ura-trp: medio sintético suplementado con galactosa sin uracilo ni triptófano

h: horas

ILV: vesículas intraluminales

lncRNA: RNA largo no codificante

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

min: minutos

miRNA: microRNA

MVE: endosomas multivesiculares

ncRNA: RNA no codificante

OD<sub>600</sub>: densidad óptica a 600 nm

p/s: penicilina y estreptomicina

p/v: relación entre peso del soluto y el volumen de la solución

PBS: tampón fosfato salino

PBS-T: tampón fosfato salino con *Tween-20*

PEG: polietilenglicol

rcf: *relative centrifugal force*

rpm: revoluciones por minuto

FBS: Suero Bovino Fetal

Tim: *T-cell immunoglobulin and mucin domain-contains*

Tim4D: parte de dominio extracelular de Tim4

trp: triptófano

UC: ultracentrifugación

ura: uracilo

VEs: Vesículas Extracelulares

v/v: relación entre el volumen del soluto y volumen de la disolución

YNB: *Yeast Nitrogen Base*

YPD: *Yeast extract-Peptone-Dextrose*

YPGal: *Yeast extract-Peptone-Galactose*

YSD: *Yeast Surface Display*

# 1. INTRODUCCIÓN

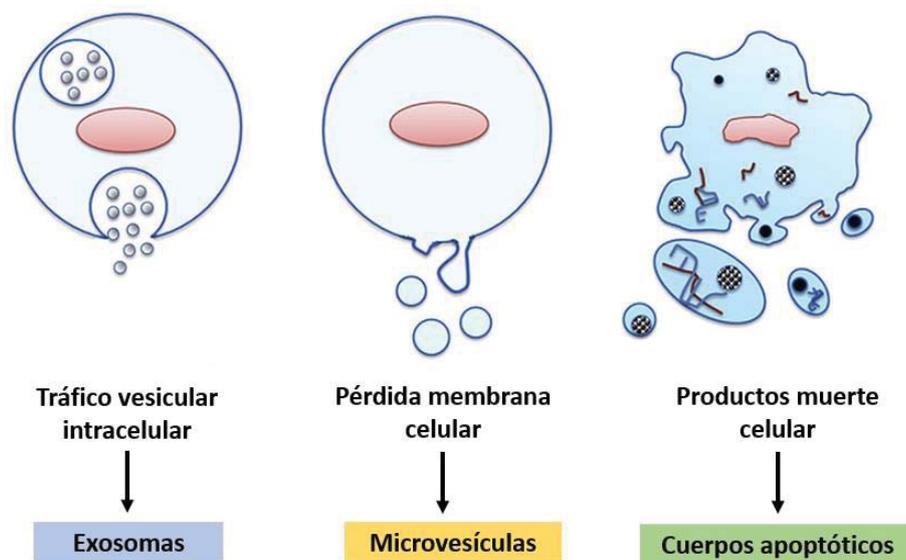
## 1.1 Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (VEs) son un conjunto heterogéneo de vesículas de tamaño nanométrico formadas por una bicapa fosfolipídica que derivan de las células (van der Pol *et al.*, 2012). Estas vesículas generalmente tienen insertadas proteínas transmembrana y transportan en su interior componentes citosólicos, como proteínas, mRNA o miRNA, derivadas de las células productoras (Zaborowski *et al.*, 2015).

La secreción de estas vesículas al espacio extracelular es un proceso evolutivamente conservado, ya que aparecen desde los organismos procariotas más simples hasta en plantas y en varios fluidos biológicos humanos (saliva, sangre, bilis, semen, etc.) (Colombo *et al.*, 2014).

La clasificación de las VEs es controvertida al tratarse de un grupo ampliamente heterogéneo en cuanto a su tamaño, su composición, al contenido que transportan, su origen y función (Devhare *et al.*, 2018). Actualmente, la clasificación que más consenso tiene se realiza a partir del mecanismo de generación de sus membranas (**Figura 1**):

- 1) Exosomas: derivan del tráfico vesicular intracelular endosomal.
- 2) Microvesículas: su origen se encuentra en la pérdida de la membrana plasmática de la célula.
- 3) Cuerpos apoptóticos: son productos de muerte celular.



**Figura 1:** Clasificación de VEs a partir de su biogénesis. Adaptación de Devhare *et al.*, 2018.

A partir de esta clasificación, también se observan diferencias (**Tabla 1**) en base a su tamaño, los marcadores que la caracterizan y el contenido que transporta, aunque existe cierto solapamiento (El Andaloussi *et al.*, 2013). La función final de las VEs depende de su célula de origen y de las condiciones en las que han sido generadas. Estos factores determinan la carga final de las VEs, y el contenido lipídico y proteico de sus membranas, lo que, a su vez, decide su destino y acciones finales (Ibrahim *et al.*, 2021).

**Tabla 1:** Diferencias entre origen, tamaño, marcadores y contenido de los diferentes tipos de VEs. Los marcadores presentados no son específicos, se describen aquellos que son más abundantes en comparación con los otros tipos. ESCRT=Endosomal Sorting Complexes Required for Transport; MHC=Complejo Mayor de Histocompatibilidad; miRNA=microRNA; ncRNA=RNA no codificante. Adaptación de El Andaloussi *et al.*, 2013.

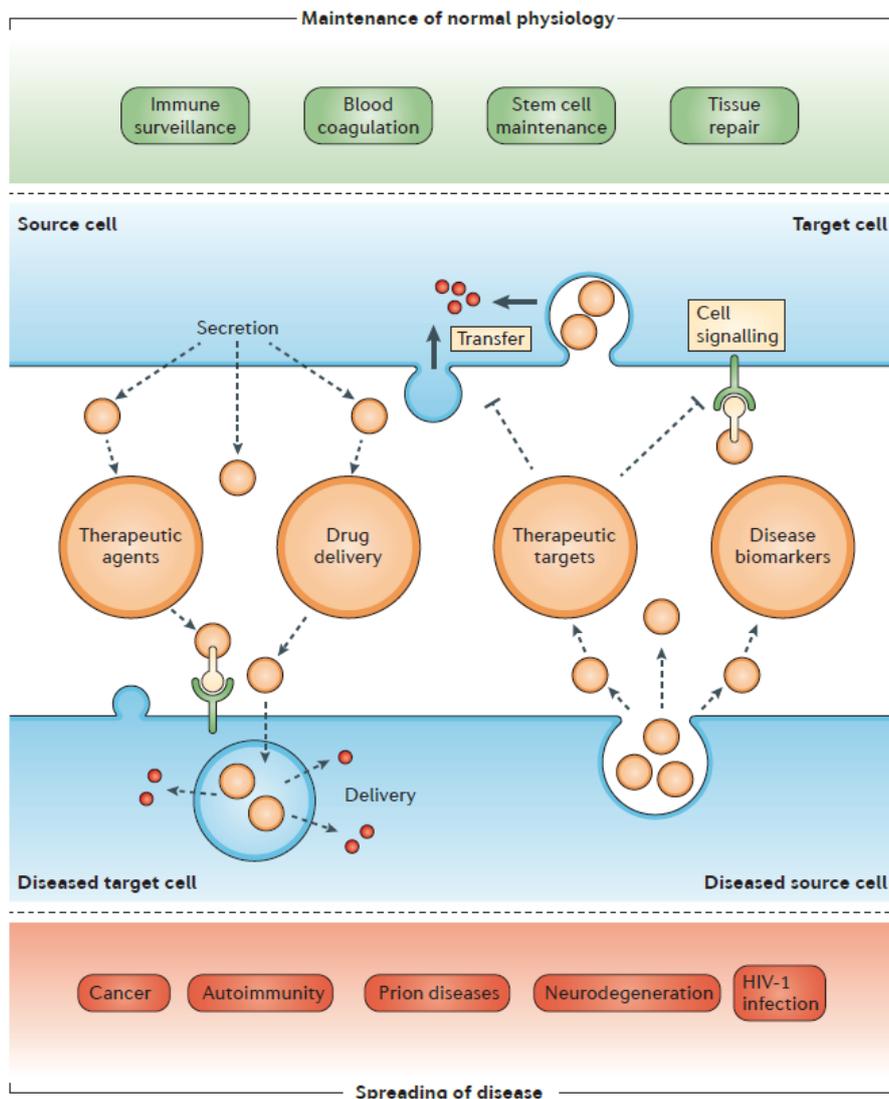
	<b>Exosomas</b>	<b>Microvesículas</b>	<b>Cuerpos apoptóticos</b>
<b>Origen</b>	Vía endosomal. Fusión del cuerpo multivesicular con la membrana celular	Superficie celular. Gemación de la membrana celular	Superficie de la célula. Desprendimiento de la membrana de la célula apoptótica
<b>Tamaño</b>	30-150 nm	100-1000 nm	100-5000 nm
<b>Marcadores</b>	Tetraspaninas (CD63, CD9, CD81), componentes ESCRT, PDCD6IP, TSG101, flotilina, MFGE	Integrinas, selectinas, ligando CD40	Grandes cantidades de fosfatidilserina
<b>Contenido</b>	mRNA, miRNA y otros ncRNA; proteínas citoplasmáticas y de membrana (incluyendo receptores y moléculas MHC)	mRNA, miRNA y otros ncRNA; proteínas citoplasmáticas y de membrana (incluyendo receptores)	Fracciones nucleares y orgánulos celulares

Cuando se describieron en 1983 se asociaron las vesículas con los mecanismos de eliminación de desechos de las células (Pan *et al.*, 1983), pero estudios recientes indican claramente que tienen un papel fundamental en la comunicación intercelular, por ejemplo:

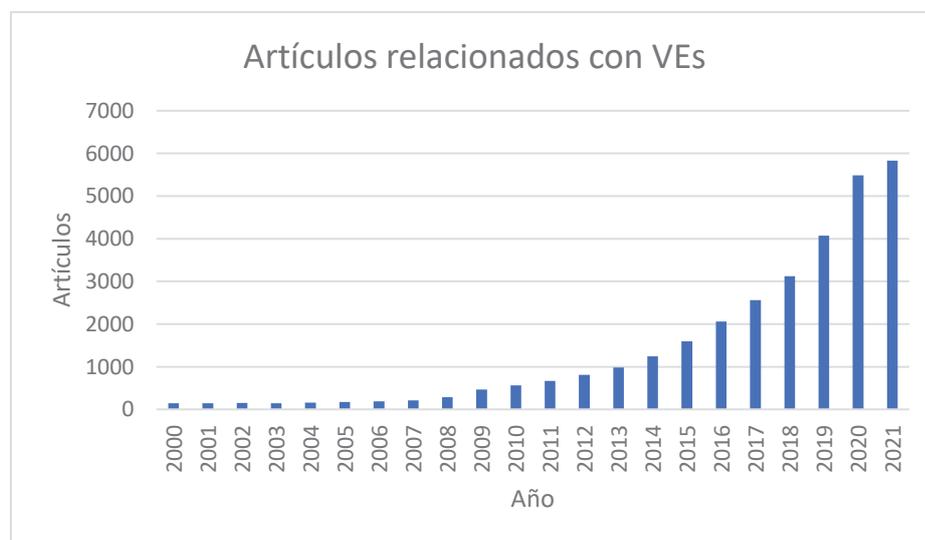
- La transferencia de su carga o de los componentes de su membrana de una célula donante a una receptora, pudiendo transferir funciones entre estas (Mathieu *et al.*, 2019).
- Las moléculas en su superficie actúan como ligandos estimulando algunos receptores de superficie en otras células, activando rutas de señalización intracelular (Maia *et al.*, 2018).
- Remodelan la matriz extracelular al tener enzimas en su superficie (Nawaz *et al.*, 2018).
- Actúan como cebo, en la que las proteínas de la superficie de la membrana capturan moléculas externas o patógenos para neutralizar sus efectos (Ibrahim *et al.*, 2021).

Por otra parte, las VEs desempeñan funciones principales en la fisiología normal y en la patogénesis de las enfermedades. Estas vesículas pueden considerarse como “señalosomas” para varios procesos biológicos (**Figura 2**) como respuestas inmunitarias, la cascada de coagulación, la plasticidad neuronal, el mantenimiento de las células madre y reparación de tejido. El conocimiento de la implicación en estas funciones biológicas permite el uso de estas vesículas en terapias como agente terapéutico o para la administración de fármacos. No obstante, estas mismas propiedades pueden tener implicación en condiciones patológicas al inducir respuestas inmunitarias hacia antígenos propios (autoinmunidad), activar procesos cancerígenos promoviendo la expresión de oncogenes y la angiogénesis, o transferir priones tóxicos que modulen la progresión de enfermedades neurodegenerativas. A causa de su participación en la progresión de varias enfermedades, las VEs pueden considerarse objetivos de intervención terapéutica y biomarcadores útiles de diversas enfermedades (El Andaloussi *et al.*, 2013).

Por esta razón, el mayor conocimiento de las VEs y de su potencial ha provocado un aumento significativo del interés que se refleja en el número de artículos relacionados publicados en revistas indexadas (**Figura 3**).



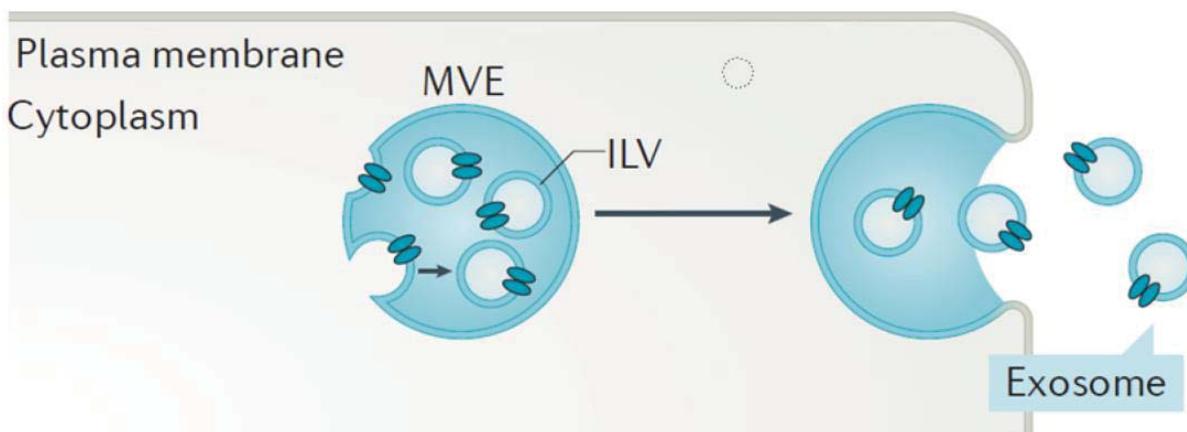
**Figura 2:** Funciones de las VEs en la histología normal y en la patogénesis de las enfermedades. Fuente: El Andaloussi *et al.*, 2013.



**Figura 3:** Artículos relacionados con VEs en revista indexadas. Fuente: *Pubmed*.

## 1.2 Exosomas

Como se ha comentado, los exosomas son un tipo de VEs cuya membrana deriva de la vía endosómica. Estas vesículas suelen tener un tamaño entre 30-150 nm y tienen como principales marcadores, entre otros, a varios componentes ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) y la flotilina. Centrándose en su biogénesis, los exosomas se generan a partir de vesículas intraluminales (ILV) que se forman en el interior de la membrana endosómica durante la maduración de endosomas multivesiculares (MVE) (**Figura 4**).



**Figura 4:** Biogénesis de exosomas. ILV=Vesículas intraluminales; MVE=endosomas multivesiculares. Adaptación de Van Niel *et al.*, 2018.

La principal aplicación clínica de los exosomas es su uso como biomarcadores no invasivos y, por tanto, son ideales para el diagnóstico de enfermedades (He *et al.*, 2018). Por ejemplo, se demostró que los exosomas derivados de células de cáncer de páncreas estaban enriquecidos con el proteoglicano GPC1 de la superficie de las células parenterales (Melo *et al.*, 2015). Por otra parte, un estudio demuestra que se encuentra diferencialmente la presencia de lncRNA exosómicos y miRNA-217 en suero de pacientes con carcinoma colorrectal, y que se puede correlacionar con la clasificación del tumor y el estadio clínico en el que se encuentra (Yu *et al.*, 2017).

### 1.2.1 Métodos de aislamiento

El gran potencial de los exosomas ha provocado un crecimiento de su interés como biomarcadores para diversas enfermedades. Sin embargo, aunque existen varios métodos de aislamiento estos son laboriosos y costosos. Las principales técnicas de aislamiento se pueden clasificar en 5 grupos (Doyle *et al.*, 2019), las cuales se pueden utilizar individualmente o combinándolas entre sí:

1. **Ultracentrifugación (UC).** Es la técnica por excelencia en la mayoría de los protocolos que separa en función del tamaño, densidad y forma. El problema es que consume mucho tiempo, requiere volúmenes de muestra elevados y puede deformar la estructura de los exosomas, además de que la reproducibilidad de los datos es limitada por el gran número de factores que pueden influir en el proceso (modelo de rotor, velocidad, etc.). Por otra parte, también son habituales la coprecipitación de agregados de proteínas y de fragmentos de nucleosomas (Zaborowski *et al.*, 2015). Este método se puede combinar con una separación en gradiente de densidad de sacarosa. Permite separar los agregados proteicos y partículas membranosas de las muestras y diferenciar mejor los exosomas (baja densidad) de las microvesículas (alta densidad) (Tauro *et al.*, 2012).
2. **Precipitación basada en polímeros.** El método es simple al utilizar polietilenglicol (PEG) que permite la precipitación de VEs. El inconveniente es que suele arrastrar una gran cantidad de contaminantes como proteínas extracelulares o agregados proteicos (Li *et al.*, 2017). Se han diseñado algunos kits comerciales basados en esta técnica como *ExoQuick* (System Biosciences) o *Total Exosome Isolation Kit* (ThermoFisher).
3. **Técnicas basadas en el tamaño.** La ultrafiltración respecto a la UC es más rápida, pero tiene más posibilidades de deformar y provocar lisis de VEs (Zerlinger *et al.*, 2015). En el caso de la cromatografía de exclusión, preservan la integridad de los exosomas, pero necesitan mucho tiempo y no son fácilmente escalables (Gámez-Valero *et al.*, 2016).

4. **Inmunoselección.** Se usan anticuerpos para capturar exosomas en función de la expresión del antígeno en la superficie de las VEs. Los anticuerpos pueden fijarse a una placa, perlas magnéticas, resinas y dispositivos microfluídicos. Permiten aislar un tipo concreto de VEs, aunque el antígeno diana debe expresarse en la superficie de los exosomas y la especificidad está limitada a la especificidad del anticuerpo comentado (Li *et al.*, 2017). Además, es un método costoso y necesita volúmenes grandes.
5. **Microfluídica.** Es un método rápido que necesita un volumen bajo de muestra, y que aísla las VEs a partir de sus propiedades físicas y bioquímicas. Sin embargo, falta estandarización y tiene una capacidad baja de muestreo (Li *et al.*, 2017).

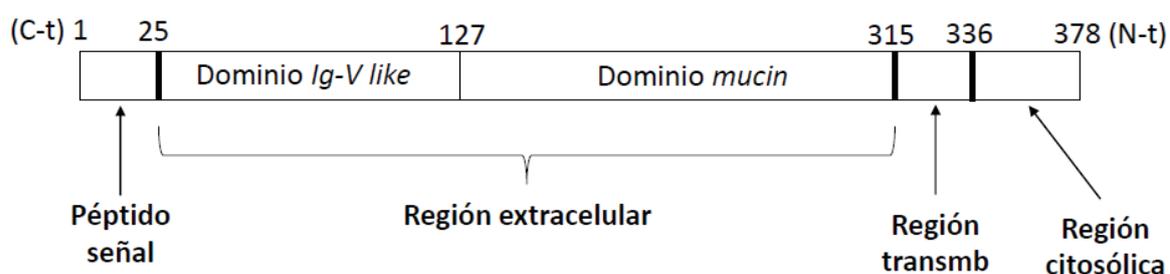
### 1.3 Tim4

La familia de genes *T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing* (Tim) está formada por 3 genes en humanos (*TIM1*, *TIM3* y *TIM4*) que se encuentran en la región 33.2 del brazo largo del cromosoma 5 (Liu *et al.*, 2020). Estos genes, codifican glicoproteínas de la superficie celular de tipo I formado por un dominio *Ig-V like* rico en cisteínas, un dominio *mucin*, una región transmembrana y un dominio intracelular o citoplasmático (McGrath, 2018). La identidad de secuencia en el dominio *Ig-V like* de los homólogos comparten un 40% de la secuencia, mientras que existe muchas más variedad en el dominio *mucin* rico en treonina, serina y prolina.

Aunque comparten una estructura común, estos genes poseen diferentes funciones y actúan en distintos procesos celulares. En particular, Tim4 se expresa principalmente en células presentadoras de antígenos, mientras que Tim1 y Tim3 se expresan en linfocitos T (Yeung *et al.*, 2011).

Por tanto, Tim4 se expresa principalmente en la superficie de macrófagos y células dendríticas (Miyaniishi *et al.*, 2007). Esta glicoproteína actúa, por un lado, como co-estimulador de linfocitos T, ya que su unión a células T *naive* estimula la proliferación estas células con una mayor producción de citoquinas inflamatorias y una menor expresión de señales antiapoptóticas (Rodríguez-Manzanet *et al.*, 2008). Por otro lado, también funciona como receptor de residuos de fosfatidilserina, un fosfolípido que se encuentra ampliamente en cuerpos apoptóticos, pero también en exosomas y microvesículas (Miyaniishi *et al.*, 2007).

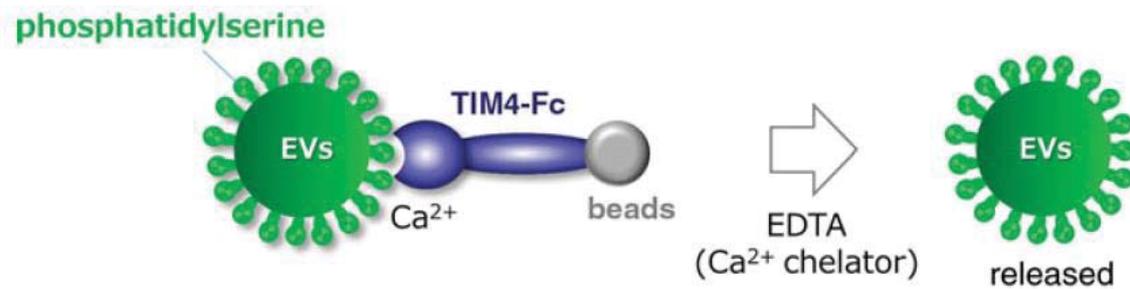
En humanos, la longitud del gen *TIM4* es de 43.935 nucleótidos y está compuesto por 10 exones, mientras que el transcrito maduro consta de 1.330 nucleótidos. Por otra parte, la proteína está compuesta por 378 aminoácidos y tiene 4 regiones diferenciadas (**Figura 5**): el péptido señal, la región extracelular que se extiende desde el aminoácido 25 hasta el 314, la región transmembrana y la región citoplasmática. Dentro de la región extracelular, entre los aminoácidos 25 y 126 destaca el dominio *Ig-V like* entre reconoce residuos de fosfatidilserina de forma dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$  (Miyanishi *et al.*, 2007).



**Figura 5:** Representación esquemática de las regiones y dominios de Tim4 humano. En la parte superior se muestran las posiciones de los aminoácidos. Adaptación de Miyanishi *et al.*, 2007.

Además, cabe destacar que existe otra isoforma de esta proteína que contiene 350 residuos, en la que ha perdido los aminoácidos entre las posiciones 254 y 281 correspondientes al dominio *mucin* de la región extracelular a causa de un proceso de *splicing* alternativo.

Aprovechando la capacidad de Tim4 para reconocer y unirse como diana a los residuos de fosfatidilserina, en un estudio reciente se evaluó un nuevo método de purificación de VEs. En este trabajo (Nakai *et al.*, 2016), se utilizó la proteína Tim4 de ratón fusionada con la fracción constante (Fc) de IgG humana. Posteriormente, la construcción Tim4-Fc se conjugó con perlas magnéticas de estreptavidina (**Figura 6**) y se examinó la capacidad para purificar exomas suponiendo que las perlas conjugadas con Tim4-Fc pueden capturar las VEs en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y que las VEs unidas pueden liberarse de las perlas mediante la adición de un tampón de elución que contenga el quelante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Nakai *et al.*, 2016).



**Figura 6:** Mecanismo del método de aislamiento de VEs utilizando Tim4-Fc. Las perlas (*beads*) con Tim4-Fc unido capturan VEs en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las VEs unidas se liberan por la adición de EDTA. Fuente: Yoshida *et al.*, 2017.

Los resultados del nuevo protocolo desarrollado por Nakai *et al.* demostraron la ausencia de proteína no exosomal, frecuentes en otros métodos de aislamiento convencionales, y la posibilidad de analizar estas muestras en ELISA y citometría de flujo.

### 1.4 *Yeast Surface Display*

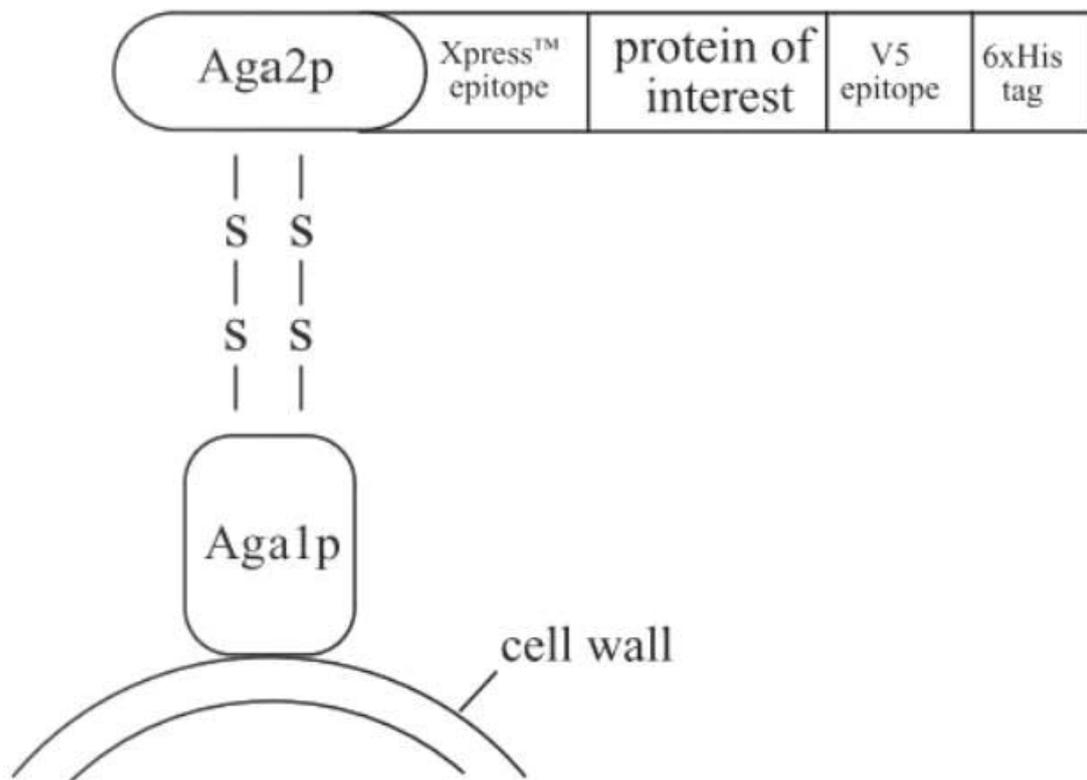
*Saccharomyces cerevisiae* es un organismo unicelular eucariota modelo en el estudio de biología molecular y celular de varios procesos fisiológicos. Este organismo se utiliza por su crecimiento rápido, el bajo coste de mantenimiento, y por su capacidad para promover el plegamiento correcto de proteínas complejas (Cherf *et al.*, 2017).

El sistema *Yeast Surface Display* (YSD) es una plataforma tremendamente útil para experimentos de ingeniería de proteínas mediante evolución dirigida, ya que permite la exposición en la superficie celular de una proteína de interés mediante la fusión a una proteína de anclaje. De este modo, se permite la formación de un complejo proteico en la cara externa de la membrana (Mei *et al.*, 2017). Por otra parte, la principal ventaja, con respecto a la ingeniería en sistemas de bacterias y fagos, es la capacidad de introducir modificaciones postraduccionales.

Las levaduras ofrecen múltiples opciones para las proteínas de superficie celular, como Aga1, Cwp1, Cwp2, Tip1, Flo1, Sed1, YCR89w y Tir113 (Mei *et al.*, 2017). La fusión de una proteína de interés en alguno de sus extremos da lugar a la distribución extracelular de un número alto de copias de la proteína de fusión. Es importante destacar que

la elección de la proteína de anclaje y de fusión depende de la proteína de interés que se vaya a manipular.

Es frecuente el uso del par de proteínas  $\alpha$ -aglutininas Aga1 y Aga2, que actúan respectivamente como proteína de anclaje a la membrana celular y proteínas de fusión. Ambas proteínas están unidas covalentemente por dos puentes disulfuro en el espacio extracelular (**Figura 7**). En este sentido, la cepa EBY100 de *S. cerevisiae* tiene insertada en su genoma el gen *AGA1* bajo el control de un promotor fuerte inducible por galactosa, de tal forma que si se transforma con un plásmido cuya proteína de fusión también está bajo un promotor inducible por galactosa, se puede inducir de forma simultánea para conseguir la mayor eficiencia de visualización en superficie.



**Figura 7:** Representación esquemática del sistema Aga1-Aga2. Fuente: *pYD1 Yeast Display Vector Kit (Invitrogen)*.

Una aplicación reciente del sistema YSD, y en particular del uso de Aga1-Aga2, es el diseño de varias vacunas orales que provienen de extractos de EBY100, ya que esta cepa se transformó con plásmidos que poseen proteínas características de alguna enfermedad. De este modo, si se cultiva EBY100 en medios con galactosa, se obtiene la expresión de la proteína de interés en la superficie de la levadura. Por ejemplo, en un estudio reciente (Gao *et al.*, 2021) se busca inmunizar a ratones con la administración oral de vacunas para el *SARS-CoV-2* diseñadas a partir de la transformación de dicha cepa con un plásmido clonado con la proteína *Spike*. Otro ejemplo, es el diseño de vacunas orales para inmunizar ratones modelo de Alzheimer mediante la administración orales de levaduras EBY100 recombinantes que expresan en su superficie celular fragmentos de los monómeros de péptido  $\beta$ -amiloide (Wang *et al.*, 2017).

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es evaluar el potencial de un nuevo método de purificación de exosomas utilizando levaduras. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Construir el plásmido pYD1-Tim4D por recombinación homóloga.
- 2) Determinar la correcta expresión de Tim4D mediante un sistema YSD.
- 3) Comparar la eficiencia de aislamiento de exosomas por la metodología desarrollada en el presente trabajo en comparación con ultracentrifugación.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Cepa de levadura y condiciones de crecimiento

La cepa utilizada durante los experimentos es EBY100 de *Saccharomyces cerevisiae*, que tiene como genotipo *MATa AGA1::GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2-delta200 his3-delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL*. De esta cepa cabe destacar la auxotrofia a

triptófano (*trp1*), y la inserción en su genoma del gen *AGAI* bajo el control de un promotor inducible por galactosa (*GALI*) con un marcador seleccionable *URA3*.

Las levaduras se cultivaron a 30°C en medios sintéticos completos (CM) o en *Yeast extract-Peptone-Dextrose* (YPD) previamente autoclavados (**Tabla 2**). En el caso de los medios CM carecían en su composición de uracilo (CM-ura), triptófano (CM-trp), o ambos componentes (CM-ura-trp). Para inducir los genes controlados por el promotor *GALI* situados en el genoma de EBY100 y en el plásmido, se utilizaron los medios comentados sustituyendo la glucosa por galactosa (Gal\_CM-ura-trp y YPGal).

**Tabla 2:** Composición de los medios utilizados para el cultivo de EBY100 (%p/v). aa=aminoácidos; CM= medio sintético completo, ura=uracilo, trp=triptófano, YPD= *Yeast extract-Peptone-Dextrose*; YNB=*Yeast Nitrogen Base*.

	YPD	YPGal
Glucosa	2%	-
Galactosa	-	2%
Extracto de levadura	1%	
Peptona	2%	

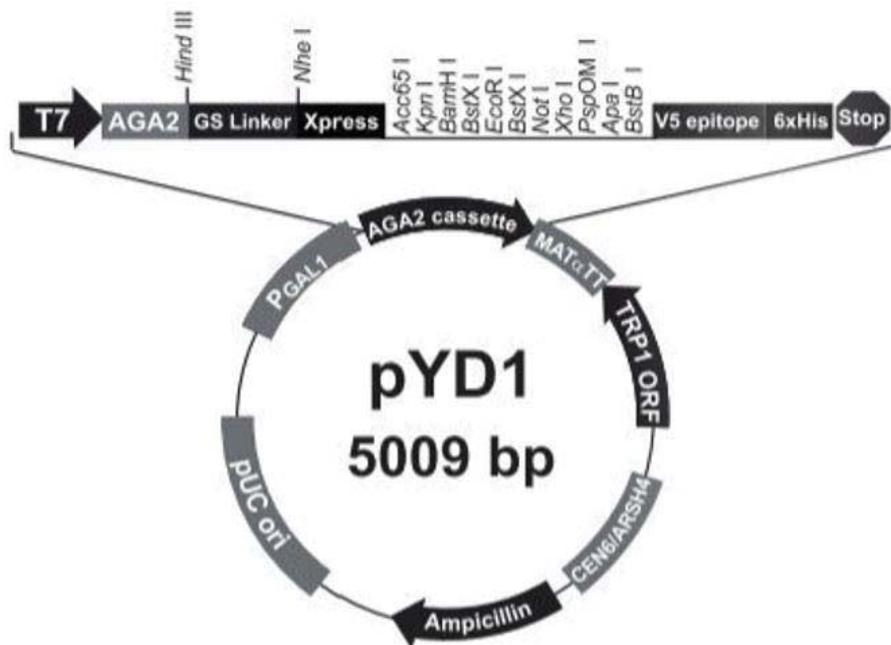
	CM-ura	CM-trp	CM-ura-trp	Gal_CM-ura-trp
Glucosa	2%	2%	2%	-
Galactosa	-	-	-	2%
Adenina	0.004%			
Leucina	0.004%			
Tirosina	0.004%			
Uracilo	-	0.004%	-	-
Triptófano	0.004%	-	-	-
Metionina	-	-	0.004%	0.004%
Mezcla aa	0.5%			
YNB	6.7%			

### 3.2 Construcción pYD1-Tim4D

pYD1 es un plásmido centromérico de bajo número de copia que se puede replicar tanto en bacterias como en levaduras. Además, también posee marcadores de selección para ambos organismos: resistencia a ampicilina en bacterias, y en levaduras permite a cepas auxótrofas el crecimiento en medios sin triptófano (**Figura 8**).

El aspecto más relevante de este plásmido es el *AGA2 cassette* que, de igual forma que *AGA1* en EBY100, está bajo el control de un promotor fuerte inducible por galactosa (*PGal1*). Dentro del *AGA2 cassette* destaca:

- *AGA2*: codifica la  $\alpha$ -aglutinina 2, incluyendo el péptido señal, de forma que permite la secreción de la proteína de fusión.
- *Multicloning site*: permite la inserción del gen de interés por las secuencias de reconocimiento de varias enzimas de restricción.
- *6xHis Tag*: permite la detección de la proteína de fusión en su extremo C-terminal con *anti-6xHis*.



**Figura 8:** Mapa gráfico de pYD1. Destaca el marcador *TRP1 ORF* y el *AGA2 cassette*, con su *6xHis* tag. Fuente: *pYD1 Yeast Display Vector Kit (Invitrogen)*.

En este trabajo, se clonó en pYD1 una parte de la región extracelular de Tim4 (Tim4D) que incluye el dominio *Ig-V like*, el cual es capaz de reconocer los residuos de fosfatidilserina localizados en la membrana de los exosomas. Esta clonación se realizó por recombinación homóloga entre las secuencias homólogas al vector pYD1.

### 3.3 Purificación del plásmido pYD1-Tim4D

Las células de *Escherichia coli* transformadas se crecieron y se purificó el plásmido siguiendo el protocolo marcado por el *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher)*, que permite aislar el DNA plasmídico utilizando una columna con membrana de sílice.

### 3.4 Transformación levaduras

Para la transformación de EBY100 se utilizó el método de acetato de litio, ya que el efecto de este compuesto combinado con un choque térmico de 42°C, y con la presencia de PEG y de DNA de salmón como *carrier*, permite la entrada del DNA plasmídico de forma eficiente (Kawai *et al.*, 2010).

Las células de EBY100 se sembraron en YPD hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600nm (OD<sub>600</sub>) entre 0.6-0.8, se precipitaron las células (5.000 rpm, 3 min) y se resuspendieron con tampón LiAc-1XTE (Acetato de litio 0.9M; EDTA 1 mM; Tris-HCl 10 mM, pH 8). A continuación, se preparó una reacción de transformación de 100 µL de resuspensión de estas células con DNA plasmídico pYD1-Tim4D, DNA de salmón ( $0.12 \frac{mg}{mL}$ ) y PEG 4000 (36.14%). Después de una incubación de 30 min a 30°C, se añadieron 88µL de dimetilsulfóxido (DMSO) y se realizó el choque térmico a 42°C durante 7 minutos. Posteriormente, se dejaron recuperar a las células 2 horas a 30°C con YPD en agitación, y por último se precipitaron las células (5.000 rpm, 5 min) y se sembraron en placas CM-trp.

### 3.5 Extracción proteínas EBY100

Los cultivos de la cepa EBY100 transformada con la construcción de interés se realizaron en medios con galactosa para inducir la expresión de Aga1 y Aga2-Tim4D. Independientemente del método de extracción, se tomaron alícuotas (1 mL) a diferentes tiempos de cultivo con galactosa (que van desde las 24 horas hasta las 144 horas), se precipitaron las células (13.000 rpm, 1 min) y se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

Los distintos métodos de extracción fueron:

- 1) Las células se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  PBS y se sonicaron durante 1 minuto.
- 2) Las muestras se resuspendieron en 250  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM, se mezclaron con microesferas de cristal y se agitaron con vórtex a máxima velocidad durante 3 minutos. Por último, se centrifugaron las muestras (13.000 rpm, 10 min) y se separó el sobrenadante.
- 3) Las células se resuspendieron en 50  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y se agitaron a máxima velocidad en el vórtex durante 15 minutos. Finalmente, se centrifugaron (13.000 rpm, 1 min) y se separó el sobrenadante.

### **3.6 Línea celular de mamífero y condiciones de cultivo**

La línea celular PC3 (*American Type Culture Collection*) es una línea de células cancerígenas de próstata humano que proviene de un adenocarcinoma epitelial en estadio avanzado y que crece formando monocapas (Kaighn *et al.*, 1979). Estas células se cultivaron en placas p100 con *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (*Lonza*) suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (FBS) (*Gibco*®) y 1% de penicilina ( $10.000 \frac{\text{unidades}}{\text{mL}}$ ) y estreptomicina ( $10.000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ ) (p/s) (*Gibco*®). Los cultivos se incubaron en un incubador húmedo de CO<sub>2</sub> en condiciones estándar (37°C y 5% de CO<sub>2</sub>).

Cuando estas células alcanzaron una confluencia entre el 70-80% se realizó una expansión de células. En primer lugar, se eliminó el medio y se lavó con 4 mL de tampón *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) (*Lonza*). A continuación, se añadió 1 mL de tripsina-EDTA 0.25% (*Thermo Fisher*) y se incubó 5 minutos en las condiciones estándar, de forma que se hidrolizaron las uniones celulares que mantienen las células y pasaron de estar adheridas formando una monocapa a una suspensión celular. Posteriormente, se inactivó la tripsina añadiendo 5 mL de DMEM suplementado con 10% FBS y 1% p/s, y se pasó 1 mL de la suspensión de células a una placa p100 con 7 mL de este medio. Las placas se incubaron en condiciones estándar hasta que tuvieron una confluencia del 90% (aproximadamente 5 días).

### 3.7 Obtención de exosomas en medios de cultivo PC3

Se obtuvieron 5 placas de PC3 con células al 90% de confluencia. De estas, se eliminó el medio y se lavaron dos veces con DPBS para eliminar los exosomas del FBS. A continuación, se incubaron las placas durante durante 72 horas en 10 mL medio DMEM suplementado con 1% p/s (sin FBS).

Después de esta incubación, se recogió el medio y se centrifugó para eliminar restos celulares, y el sobrenadante se concentró con amicones 100kDa (*Pierce<sup>TM</sup> Protein Concentrator PES, 100kDA MWCO, ThermoFisher*) mediante centrifugaciones sucesivas hasta un volumen de 5mL.

Por último, se incubaron de nuevo las placas p100 en 10mL de DMEM suplementado con 1% p/s, y el proceso se repitió dos veces consecutivas, obteniéndose finalmente 15 mL de concentrado del medio de cultivo PC3.

### 3.8 Aislamiento de exosomas

El medio de cultivo de PC3 concentrado se dividió a partes iguales para aislar los exosomas por UC o por el nuevo método utilizando EBY100 recombinante.

En el caso del aislamiento por UC, se realizó una primera centrifugación (16.000 rcf, 1 hora, 4°C). A continuación, se transfirió el sobrenadante a un tubo de ultracentrífuga y se centrifugó con la ultracentrífuga *Hitachi CP100NX* con el rotor P70AT2 (100.000 rcf, 2 horas, 4°C). El precipitado se resuspendió con 3 mL de PBS previamente filtrado y se volvió a centrifugar (100.000 rcf, 2 horas, 4°C). Por último, se eliminó el sobrenadante, el precipitado visible se resuspendió con 200 uL PBS filtrado y se almacenó a -20°C hasta su análisis por *Western blot*.

En el caso del nuevo método, se incubó concentrado de PC3 con levaduras EBY100 después del cultivo con galactosa. Se extrajeron muestras de la mezcla a diferentes tiempos de incubación y se trataron con  $\beta$ -mercaptoetanol 20mM. Finalmente, se concentraron con amicones de 100kDa (*Pierce<sup>TM</sup> Protein Concentrator PES, 100kDA MWCO, ThermoFisher*) hasta tener un volumen final de 50  $\mu$ L.

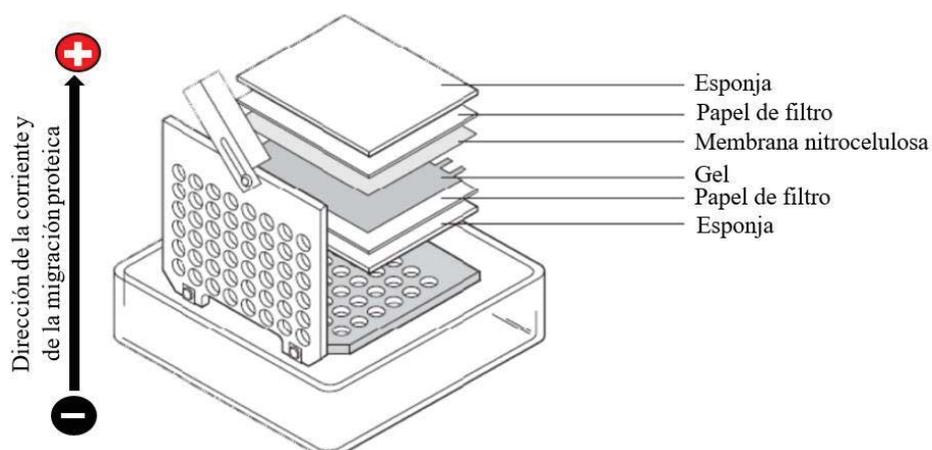
### 3.9 Western Blot.

La separación de las proteínas en función de su peso molecular se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE de 0.75 mm o de 1.5 mm, aplicando 120 V durante 80 minutos (*Bio-Rad*). Se utilizaron geles discontinuos, siendo el separador con un 12% de acrilamida y el concentrador al 4% de acrilamida. Además, todas las muestras se incubaron 10 minutos a 95°C antes de cargarlas en los geles.

#### 3.9.1 Análisis expresión Aga2-Tim4D (*anti-6xHis*)

El análisis de expresión de la proteína de fusión Aga2-Tim4D se realizó después de un cultivo las células transformadas en medios con galactosa (YPGal y Gal\_CM-ura-trp) durante tiempo que van de 24 horas (1 día) hasta 144 horas (6 días).

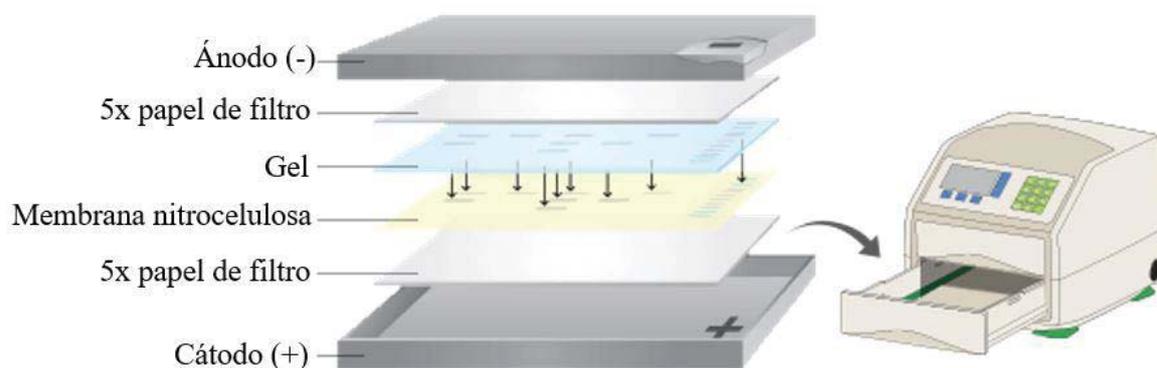
Una vez completada la electroforesis, se realizó la transferencia por el método convencional del sándwich (**Figura 9**), a 300mA durante 60 minutos (*Bio-Rad*). La membrana de nitrocelulosa se lavó con PBS-T (10 mM  $\text{PO}_4^{3-}$ , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, *Tween-20* 0.1% (v/v)), y se bloqueó durante toda la noche en PBS-T suplementado con 5% (p/v) de leche descremada a temperatura ambiente y agitación continua (50 rpm). Al día siguiente se incubó con una dilución 1:1000 de un anticuerpo *anti-6xHis* de ratón (*Proteintech*) durante 4 horas a temperatura ambiente y agitación continua (50 rpm). Por último, se lavó con PBS-T tres veces durante 5 minutos y se reveló por luminiscencia (*Pierce<sup>TM</sup> ECL Western Blotting Substrate, ThermoFisher*) utilizando una capturadora *ChemiDoc* y el software *ImageLab* (*Bio-Rad*).



**Figura 9:** Representación esquemática del método convencional del sándwich de *Western blot*. Adaptación de Theriault, M., 2016.

### 3.9.2 Análisis exosomas (*anti-flotillin*)

En el caso del análisis de la presencia de exosomas la transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa se realizó con el equipo *Trans-blot turbo* (Bio-Rad) (**Figura 10**) con dos ciclos consecutivos de 7 minutos a 2.5 A y 25 V. La membrana se bloqueó 10 minutos en PBS-T suplementado con 10% (p/v) de leche descremada a temperatura ambiente y agitación continua (50 rpm). A continuación, se incubó toda la noche a 4°C con una dilución 1:1000 el anticuerpo primario *mouse anti-flotillin* (Santa Cruz Biotechnology). Después se lavó 3 veces consecutivas cada 10 minutos con PBS-T. Seguidamente, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1:1000 del anticuerpo secundario *anti-mouse* (Santa Cruz Biotechnology) que reconoce al anticuerpo primario. Finalmente, se lavó 3 veces consecutivas durante 10 minutos y se reveló con luminiscencia (Pierce<sup>TM</sup> ECL Western Blotting Substrate) utilizando una *ChemiDoc* y el software *ImageLab* (Bio-Rad).



**Figura 10:** Representación esquemática del proceso en el *Trans-blot turbo*. Adaptación de *Western Blotting Transfer Techniques* (Bio-Rad).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Construcción y purificación del plásmido pYD1-Tim4D.

En primer lugar, se amplificó la secuencia de Tim4D que incluye el dominio *Ig-V like* por PCR con los cebadores diseñados (**Tabla 3**), de forma que se flanqueó la secuencia de este gen con secuencias homólogas al vector pYD1. Se utilizó como DNA molde una preparación de cDNA obtenida previamente a partir de células mononucleares de

sangre periférica. El producto de PCR con las secuencias flanqueantes permite la inserción en el plásmido siguiendo la pauta de lectura del resto de componentes del *AGA2 cassette*.

La incorporación de *TIM4D* al *AGA2 cassette* aumentó su longitud sumándole 1.074 pares de bases, siendo la proteína de fusión de un tamaño aproximado de 30 kDa.

**Tabla 3:** Secuencia de los cebadores diseñados para flanquear los extremos del *TIM4D*.

<b>Cebador directo</b>	
Secuencia homóloga pYD1 5'	5' GATCTGTACGACGATGACGATAAGGTACCA 3'
Secuencia inicio <i>TIM4D</i>	5' ATGTCCAAAGAACCTCTCATTCTCTGGCTG 3'
<b>Secuencia cebador directo</b>	<b>5' GATCTGTACGACGATGACGATAAGGTACCA ATGTCCAAAGAACCTCTCATTCTCTGGCTG 3'</b>
<b>Cebador reverso</b>	
Secuencia homóloga pYD1 3'	5' GTTAGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCC 3'
Secuencia final <i>TIM4D</i>	5' GAGGGTAAAAAGGCCGTCTTCGTCTTCCC 3'
<b>Secuencia cebador reverso</b>	<b>5' GTTAGGGATAGGCTTACCTTCGAAGGGCCC GAGGGTAAAAAGGCCGTCTTCGTCTTCCC 3'</b>

El producto de PCR se subclonó en el plásmido pYD1 por recombinación homóloga, previa linealización del vector con las enzimas *BamHI* y *XhoI*. Para ello, se transformaron células competentes de *Saccharomyces cerevisiae* W303 con 1 µg del plásmido pYD1 linealizado, y 1 µg del producto de PCR con la secuencia de Tim4D con el *Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit* (*ZymoResearch*). Finalmente, se sembraron en placas CM-trp, de modo que todas aquellas células que incorporaron el plásmido recombinante correctamente crecieron por complementación de la auxotrofia.

Por otra parte, el DNA plasmídico purificado después del cultivo de *E. coli* transformadas con este plásmido mediante el protocolo de *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* (*ThermoFisher*), se obtuvo con una concentración de  $325.5 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$  y una proporción  $A_{260}/A_{280}=1.86$ , por lo que se concluyó que la pureza plasmídica que se consiguió fue suficiente.

## **4.2 Transformación EBY100 con pYD1-Tim4D.**

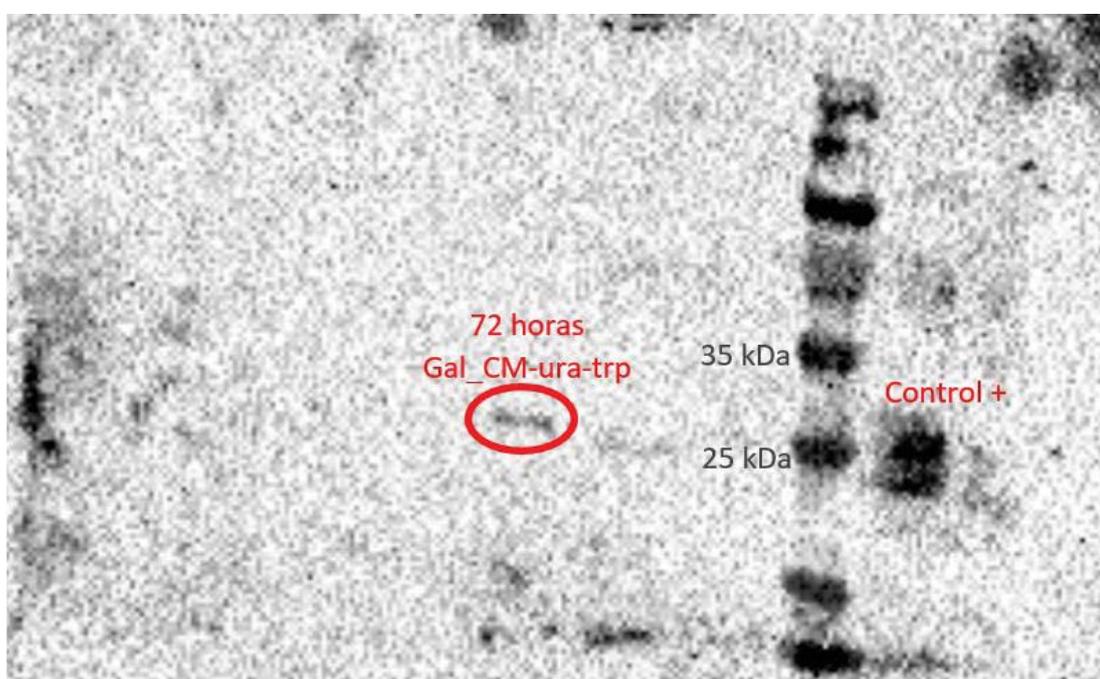
Se realizó la transformación de EBY100 siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos con 3.3 µg de DNA plasmídico y, tras 72 horas de incubación, se obtuvieron colonias en las placas CM-trp, de modo que se concluyó que la transformación

fue efectiva ya que únicamente aquellas células que poseen el plásmido crecieron por complementación de la auxotrofia.

### 4.3 Pruebas de expresión Aga2-Tim4D.

En primer lugar, las células transformadas se cultivaron en medios YPGal y se tomaron muestras de 1 mL a las 24, 48 y 72 horas de incubación. La extracción de estas muestras se realizó por sonicación tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Después de la incubación de la membrana de nitrocelulosa del *Western blot* con *anti-6xHis*, que permite detectar la proteína de fusión Aga2-Tim4D, no se detectó ninguna señal. Por este motivo, se decidió cambiar el protocolo de extracción y cultivar, además de con YPGal, con Gal\_CM-ura-trp.

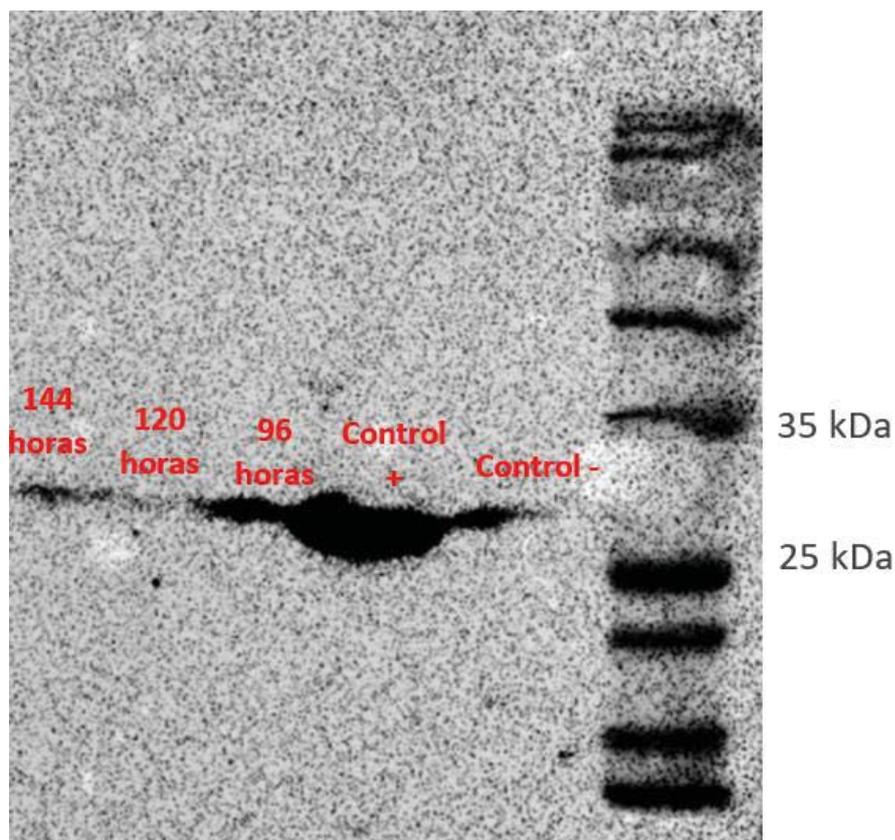
El segundo protocolo de extracción consistió en tratar las muestras  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y microesferas de cristal. Las células se cultivaron en medio YPGal y Gal\_CM-ura-trp y se tomaron diferentes muestras de 1 mL 24, 48 y 72 horas. En este caso, en el *Western blot* (**Figura 11**) la muestra de 72 horas de incubación con Gal\_CM-ura-trp mostró una señal débil.



**Figura 11:** *Western blot* (*anti-6xHis*) de muestras extraídas con  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y microesferas de cristal. Se rodea en rojo la señal correspondiente a las 72 horas de cultivo con Gal\_CM-ura-trp que tiene un tamaño entre 25kDa y 35kDa.

Por tanto, como se mostró una ligera expresión de la muestra con 72 horas de incubación en medio Gal\_CM-ura-trp se concluyó que con este medio se estaba induciendo mejor la expresión de Aga2-Tim4D, aunque la señal era demasiado baja. En un segundo experimento se extendieron los periodos de incubación (96, 120 y 144 horas) en medio Gal\_CM-ura-trp para así buscar una mayor expresión en la superficie de EBY100 de la proteína de fusión. Además, también se modificó el método de extracción de las proteínas, en este caso, agitando las células durante 15 minutos en el vórtex en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol con una concentración final de 10mM.

En este caso, el *Western blot* (**Figura 12**) muestra de nuevo una expresión de Aga2-Tim4D entre las bandas de 25 y 35 kDa. Sin embargo, control positivo parece que contaminó los pocillos adyacentes correspondientes a las muestras del control negativo y a la de 96 horas de cultivo con Gal\_CM-ura-trp. Aun así, sí que se observó una señal más fuerte respecto el pasado *Western blot* (**Figura 11**) a las 120 y 144 horas de cultivo.



**Figura 12:** *Western blot* (*anti-6xHis*) de muestras extraídas con  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM y vórtex. Aunque la muestra de 96 horas parece contaminada, se observa señal a las 120 y 144 horas de cultivo entre 25 y 35 kDa.

Una vez comprobada la expresión de Aga2-Tim4D, se concluyó que hay una expresión significativa a tiempos mayores de 96 horas de incubación. Por esta razón, se decidió almacenar con glicerol-PBS 50% a -80°C, las células a las 168 horas, hasta su uso posterior en el nuevo método de aislamiento utilizando levaduras recombinantes.

## **4.4 Análisis exosomas**

### **4.4.1 Obtención exosomas en medio de cultivo PC3**

Para la obtención de exosomas, después de la incubación en condiciones estándar durante 72 horas en medio DMEM suplementado con 1% de p/s (sin FBS), se recogió el medio (50 mL en total), se centrifugó (1.100 rpm, 10 minutos, 4°C) para eliminar restos de las células, y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio. De este modo, el medio se concentró con amicones de 100 kDa (*Pierce<sup>TM</sup> Protein Concentrator PES, 100kDA MWCO, ThermoFisher*) mediante centrifugaciones sucesivas (3.500 rpm, 4°C) hasta un volumen de 5mL.

Todo este proceso se repitió 2 veces consecutivas, de forma que se obtuvieron finalmente 15 mL del medio de cultivo de PC3 concentrado que contiene los exosomas.

### **4.4.2 Aislamiento de exosomas**

Los 15 mL de medio de cultivo de PC3 concentrado se dividieron a partes iguales (2 x 7.5 mL) para aislar los exosomas por UC o con la mezcla de EBY100 transformada con pYD1-Tim4D.

Por una parte, se aislaron los exosomas mediante UC siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos.

Por otra parte, en el caso del nuevo método con la mezcla de las levaduras transformadas, en primer lugar, se mezclaron 7.5 mL de medio concentrado de PC3 con 2.8 mL de EBY100 después de 168 horas de cultivo con galactosa. De esta forma, se incubó la mezcla a diferentes tiempos (30 minutos, 2 horas, 6 horas y toda la noche) a 4°C y con agitación. Para cada muestra (1.8 mL) se precipitaron las células (5.000 rpm, 5 min, 4°C), se lavaron en 1 mL de PBS y se resuspendieron en 1 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol 20mM. Esta

mezcla se incubó 10 minutos en agitación a 4°C. Después, se centrifugó de nuevo (5.000rpm, 5 min, 4°C) y el precipitado se resuspendió con 1 mL de PBS. Así, de esta forma, se concentró esta disolución con amicones de 100kDa (*Pierce<sup>TM</sup> Protein Concentrator PES, 100kDa MWCO, ThermoFisher*) hasta tener un volumen final de 50 µL y se almacenó a -20°C hasta su análisis por *Western blot*.

#### **4.4.3 Análisis *Western blot***

Para el análisis de exosomas, el objetivo que se siguió era comprobar la efectividad del nuevo método y, además, compararlo con la extracción de exosomas siguiendo un protocolo convencional de UC. La proteína que se buscó detectar en este caso es la flotilina, una proteína transmembrana que se encuentra en las membranas de los exosomas y que tiene un tamaño aproximado de 48 kDa.

En primer lugar, se realizó un *Western blot* de un gel de acrilamida de 0.75 mm en los que se cargaron 15 µL de todas las muestras (UC, 30 min, 2 horas, 6 horas y toda la noche). Una vez realizada la transferencia se incubó secuencialmente con *mouse anti-flotillin* (anticuerpo primario) y *anti-mouse* (anticuerpo secundario). En este caso, no se detectó ninguna señal al revelar la membrana.

A continuación, se decidió repetir el proceso porque era posible que la concentración de exosomas en todas las muestras no fuese suficientemente alta para que el anticuerpo primario pudiera unirse a su proteína diana. En este punto, el *Western blot* se realizó a partir de un el gel de acrilamida de 1.5 mm, en los que se cargaron 55 µL de la muestra control de aislamiento por UC, mientras que de las muestras extraídas de la mezcla con EBY100-Tim4D se cargaron 35 µL. De nuevo, después de la incubación de la membrana de nitrocelulosa con los dos anticuerpos, no se obtuvo ninguna señal en el revelado.

## **5. DISCUSIÓN**

Como en el *Western blot* para analizar la presencia de exosomas (*anti-flotillin*) no se detectó ninguna señal, en primera instancia se pensó que podía existir algún problema con los anticuerpos, ya que su uso continuado podía haber afectado a su unión con los antígenos

correspondientes. Para comprobar este hecho, se incubaron con anticuerpos que había detectado señal recientemente en un experimento independiente. El anticuerpo primario usado fue *mouse anti-flotillin/CD9*, que también tiene la capacidad de unirse a la proteína de membrana CD9 de la familia de las tetraspaninas, mientras que el anticuerpo secundario se sustituyó por la proteína G que es capaz de unirse a la fracción constante del anticuerpo primero. Una vez más, no se detectó ninguna señal después del revelado, por lo que el error no podía estar en la funcionalidad de los anticuerpos.

Por esta razón, se plantearon las posibles causas que podían haber impedido la comparación entre los dos métodos de aislamiento:

- Una posibilidad son los errores de manipulación durante pasos clave de los experimentos de aislamiento de exosomas durante la UC y el proceso de transferencia del *Western blot*. Sin embargo, respectivamente, se comprobó la presencia de precipitado en el tubo de UC y la transferencia exitosa del marcador molecular.
- En el caso de las muestras extraídas de la mezcla con EBY100, existía la posibilidad de que no pudieran unir correctamente los exosomas. Esto podría estar por la clonación del dominio *Ig-V like* de Tim4D en el *AGA2 cassette* de pYD1 podía alterar su función como receptor de residuos de fosfatidilserina situados en exosomas, ya que se trata de una proteína de fusión y algún elemento del *cassette* podría haber comprometido su plegamiento y, por tanto, su función.
- Otra posible causa pudo ser que el almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  con PBS-glicerol 50% de EBY100 recombinante haya influenciado en la estructura y, por tanto, la función de la proteína de fusión.

## **5.1 Perspectivas futuras**

Es obvio que son necesarias más investigaciones para comprobar el potencial de este nuevo protocolo que, por las incidencias comentadas en el *Western blot* de detección de la

flotilina sumado a la falta de tiempo, no se han podido comprobar correctamente en este trabajo.

Aun así, aunque se hubieran detectado la presencia de exosomas por la presencia de flotilina en sus membranas, no se puede obviar que el uso de Tim4D para el aislamiento de exosomas es un protocolo que no está suficientemente desarrollado para aislar únicamente este tipo de vesículas, ya que los residuos de fosfatidilserina también se pueden encontrar en microvesículas y cuerpos apoptóticos (Whiteside, 2017). Este hecho podría alterar los resultados y las conclusiones de los trabajos.

Por último, aunque el método tuviera un gran potencial, se debería de comprobar en fluidos humanos en estados fisiológicos patológicos.

## **6. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓNS/CONCLUSIONS**

### **Conclusiones**

Después de la realización de este trabajo, las conclusiones son la siguientes:

1. La inducción de la proteína de fusión Aga2-Tim4D en la membrana de EBY100 fue efectiva. Se observó una mayor expresión destacable a tiempos mayores de 96 horas de cultivo.
2. El nuevo protocolo debe mejorar y son necesarios estudios posteriores para evaluar la efectividad de este método de aislamiento.

### **Conclusións**

Despois da realización deste traballo, as conclusións son a seguintes:

1. A indución da proteína de fusión Aga2-Tim4D na membrana de EBY100 foi efectiva. Observouse unha maior expresión destacable a tempos maiores de 96 horas de cultivo.
2. O novo protocolo debe mellorar e son necesarios estudos posteriores para avaliar a efectividade deste método de illamento

## **Conclusions**

After this work, the conclusions are:

1. Induction of the Aga2-Tim4D fusion protein in the EBY100 membrane was effective. Significantly higher expression was observed at times longer than 96 hours of culture.
2. The new protocol needs to be improved and further studies are needed to evaluate the effectiveness of this isolation method.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Bio-Rad. Western Blotting Transfer Techniques [Internet]. 2019 [consultado el 8 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.bio-rad.com/es-es/applications-technologies/western-blotting-transfer-techniques?ID=PQEEOP70KWE7>
- Colombo, M., Raposo, G., Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 30: 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Devhare, P. B., Ray, R. B. (2018). Extracellular vesicles: Novel mediator for cell to cell communications in liver pathogenesis. *Mol Aspects Med.* 60: 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.001>
- Doyle, L., Wang, M. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells.* 8: 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- El Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., Wood, M. J. A. (2013). Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 12: 347–357. <https://doi.org/10.1038/nrd3978>
- Gámez-Valero, A., Monguió-Tortajada, M., Carreras-Planella, L., Franquesa, M., Beyer, K., Borràs, F. E. (2016). Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. *Sci Rep.* 6: 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep33641>
- Gao, T., Ren, Y., Li, S., Lu, X., Lei, H. (2021). Immune response induced by oral administration with a *Saccharomyces cerevisiae*-based SARS-CoV-2 vaccine in mice. *Microb Cell Fact.* 20: 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01584-5>
- He, C., Zheng, S., Luo, Y., Wang, B. (2018). Exosome theranostics: Biology and translational medicine. *Theranostics.* 8: 237–255. <https://doi.org/10.7150/thno.21945>
- Ibrahim S.A., Khan Y.S. Histology, Extracellular Vesicles. StatPearls [revista en Internet] 2021. [consultado 8 de febrero de 2022]. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562256/>
- Invitrogen. pYD1 Yeast Display Vector Kit. 2002 [consultado el 8 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.yumpu.com/en/document/read/49535338/pyd1-yeast-display-vector-kit>
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., Jones, L. W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* 17: 16–23.
- Kawai, S., Hashimoto, W., Murata, K. (2010). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioeng Bugs.* 1: 395–403. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.6.13257>
- Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., Gao, Z. (2017). Progress in exosome isolation techniques. *Theranostics.* 7: 789–804. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>
- Cherf, G., Cochran, J. (2015). Applications of yeast surface display for protein engineering. In: Liu, B. (Ed). *Yeast surface display: methods, protocols and applications.* New York: Humana Press. 155–175. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2748-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2748-7_8)
- Liu, W., Xu, L., Liang, X., Liu, X., Zhao, Y., Ma, C., Gao, L. (2020). Tim-4 in Health and Disease: Friend or Foe? *Front Immunol.* 11: 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00537>
- Maia, J., Caja, S., Strano Moraes, M. C., Couto, N., Costa-Silva, B. (2018). Exosome-based cell-cell communication in the tumor microenvironment. *Front Cell Dev Biol.* 6: 1–19. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00018>
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieau, G., Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol.* 21: 9–17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>

- McGrath, M. M. (2018). Diverse roles of TIM4 in immune activation: Implications for alloimmunity. *Curr Opin Organ Transplant*. 23: 44–50. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000487>
- Mei, M., Zhou, Y., Peng, W., Yu, C., Ma, L., Zhang, G., Yi, L. (2017). Application of modified yeast surface display technologies for non-Antibody protein engineering. *Microbiol Res*. 196: 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.002>
- Melo, S. A., Luecke, L. B., Kahlert, C., Fernandez, A. F., Gammon, S. T., Kaye, J., LeBleu, V. S., Mittendorf, E. A., Weitz, J., Rahbari, N., Reissfelder, C., Pilarsky, C., Fraga, M. F., Piwnica-Worms, D., Kalluri, R. (2015). Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature*. 523: 177–182. <https://doi.org/10.1038/nature14581>
- Miyaniishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., Nagata, S. (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidyserine receptor. *Nature*. 450: 435–439. <https://doi.org/10.1038/nature06307>
- Nakai, W., Yoshida, T., Diez, D., Miyatake, Y., Nishibu, T., Imawaka, N., Naruse, K., Sadamura, Y., Hanayama, R. (2016). A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. *Sci Rep*. 6: 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep33935>
- Nawaz, M., Shah, N., Zanetti, B. R., Maugeri, M., Silvestre, R. N., Fatima, F., Neder, L., Valadi, H. (2018). Review extracellular vesicles and matrix remodeling enzymes: The emerging roles in extracellular matrix remodeling, progression of diseases and tissue repair. *Cells*. 7: 1–26. <https://doi.org/10.3390/cells7100167>
- Pan, B. T., Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 33: 967–978. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5)
- Rodriguez-Manzanet, R., Meyers, J. H., Balasubramanian, S., Slavik, J., Kassam, N., Dardalhon, V., Greenfield, E. A., Anderson, A. C., Sobel, R. A., Hafler, D. A., Strom, T. B., Kuchroo, V. K. (2008). TIM-4 expressed on APCs induces T cell expansion and survival. *J Immunol*. 180: 4706–4713. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4706>
- Tauro, B. J., Greening, D. W., Mathias, R. A., Ji, H., Mathivanan, S., Scott, A. M., Simpson, R. J. (2012). Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods*. 56: 293–304. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.01.002>
- Therriault, M. Innate Immune Recognition of *Candida Albicans* in Zebrafish [tesis doctoral]. University of Maine: The Honors College; 2016. Disponible en: <https://digitalcommons.library.umaine.edu/honors/420>
- ThermoFisher. GeneJET Plasmid Miniprep Kit. 2014 [consultado el 8 de febrero de 2022] Disponible en: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012655\\_GeneJET\\_Plasmid\\_Miniprep\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012655_GeneJET_Plasmid_Miniprep_UG.pdf)
- van der Pol, E., Böing, A. N., Harrison, P., Sturk, A., Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*. 64: 676–705. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005983>
- van Niel, G., D'Angelo, G., Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 19: 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Wang, S. W., Liu, D. Q., Zhang, L. X., Ji, M., Zhang, Y. X., Dong, Q. X., Liu, S. Y., Xie, X. X., Liu, R. T. (2017). A vaccine with A $\beta$  oligomer-specific mimotope attenuates cognitive deficits and brain pathologies in transgenic mice with Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 9: 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0267-5>
- Whiteside, T. L. (2017). Extracellular vesicles isolation and their biomarker potential: Are we ready for testing? *Ann Transl Med*. 5: 3–6. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.01.62>
- Yeung, M. Y., McGrath, M., Najafian, N. (2011). The Emerging Role of the TIM Molecules in Transplantation. *Am J Transplant*. 11: 2012–2019. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03727.x>

- Yoshida, T., Ishidome, T., Hanayama, R. (2017). High Purity Isolation and Sensitive Quantification of Extracellular Vesicles Using Affinity to TIM4. *Curr Protoc Cell Biol.* 77: 3.45.1-3.45.18. <https://doi.org/10.1002/cpcb.32>
- Yu, B., Du, Q., Li, H., Liu, H. Y., Ye, X., Zhu, B., Zhai, Q., Li, X. X. (2017). Diagnostic potential of serum exosomal colorectal neoplasia differentially expressed long non-coding RNA (CRNDE-p) and microRNA-217 expression in colorectal carcinoma. *Oncotarget.* 8: 83745–83753. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19407>
- Zaborowski, M. P., Balaj, L., Breakefield, X. O., Lai, C. P. (2015). Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience.* 65: 783–797. <https://doi.org/10.1093/biosci/biv084>
- Zerlinger, E., Barta, T., Li, M., Vlassov, A. V. (2015). Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015: 319–323. <https://doi.org/10.1101/pdb.top074476>