



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Resistencia genética a la infección por VIH-1 mediada por polimorfismos genéticos del CR2

Alumno: Miguel Navarro Oliveros

Julio, 2014



UNIVERSIDAD DE JAÉN
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
Grado en Biología
Trabajo Fin de Grado

Resistencia genética a la infección por VIH-1 mediada por polimorfismos genéticos del CR2

Miguel Navarro Oliveros
Jaén, 30/07/2014

Índice

Resumen	página 4
Introducción	página 5
Antecedentes	página 15
Objetivos	página 17
Materiales y métodos	página 18
Resultados	página 37
Discusión	página 44
Conclusión	página 45
Bibliografía	página 48

RESUMEN

Genetic polymorphisms in complement receptor 2 has a role in the innate resistance to HIV-1 infection. In order to functional characterize the phenotype of these polymorphisms we need to express in vitro the envelope proteins isolated from HIV-1 patients. We have developed a proteins expression system based in the direct cytoplasmic transcription and IRES-mediated translation of a PCR product without cloning. The aim of this work is to construct one of the tools, a bacteriophage T7 RNA polymerase eukaryotic expression plasmid.

INTRODUCCIÓN

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) se presentó por primera vez tras una infección zoonótica con virus de inmunodeficiencia de primates desde África. El VIH-1 fue transmitido por simios y el VIH-2 por el mono mangabeye gris [1]. La destacable diversidad genética del VIH-1 se da como consecuencia de la falta de corrección de errores en la transcriptasa inversa [1].

En 2012, una estimación de unos 35,3 millones de personas viven con VIH [2]. La epidemia global producida por la infección del VIH ha cambiado de manera considerable: el número de personas con VIH se ha incrementado desde los 31 millones de enfermos en 2002, hasta los 35,3 millones en 2012, debido a que las personas sometidas a terapias antirretrovirales viven más tiempo [3], mientras que la incidencia de este se ha reducido desde 3,3 millones en 2002, hasta 2,3 millones en 2012 [2].

El VIH es uno de los principales elementos de la morbi-mortalidad mundial. Las muertes relacionadas con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) alcanzaron su pico en 2,3 millones en 2005, y disminuyeron hasta 1,6 millones en 2012 [2]. Según estudio, las principales causas de muerte por enfermedades no relacionadas con el SIDA fueron: cáncer no influido por SIDA (23,5%), enfermedades cardiovasculares (15,7%), y enfermedades hepáticas (14,1%) [4]. Los problemas hepáticos son comunes, básicamente porque la coinfección con hepatitis B y C es normal debido a que comparten vías similares de transmisión con el VIH [5].

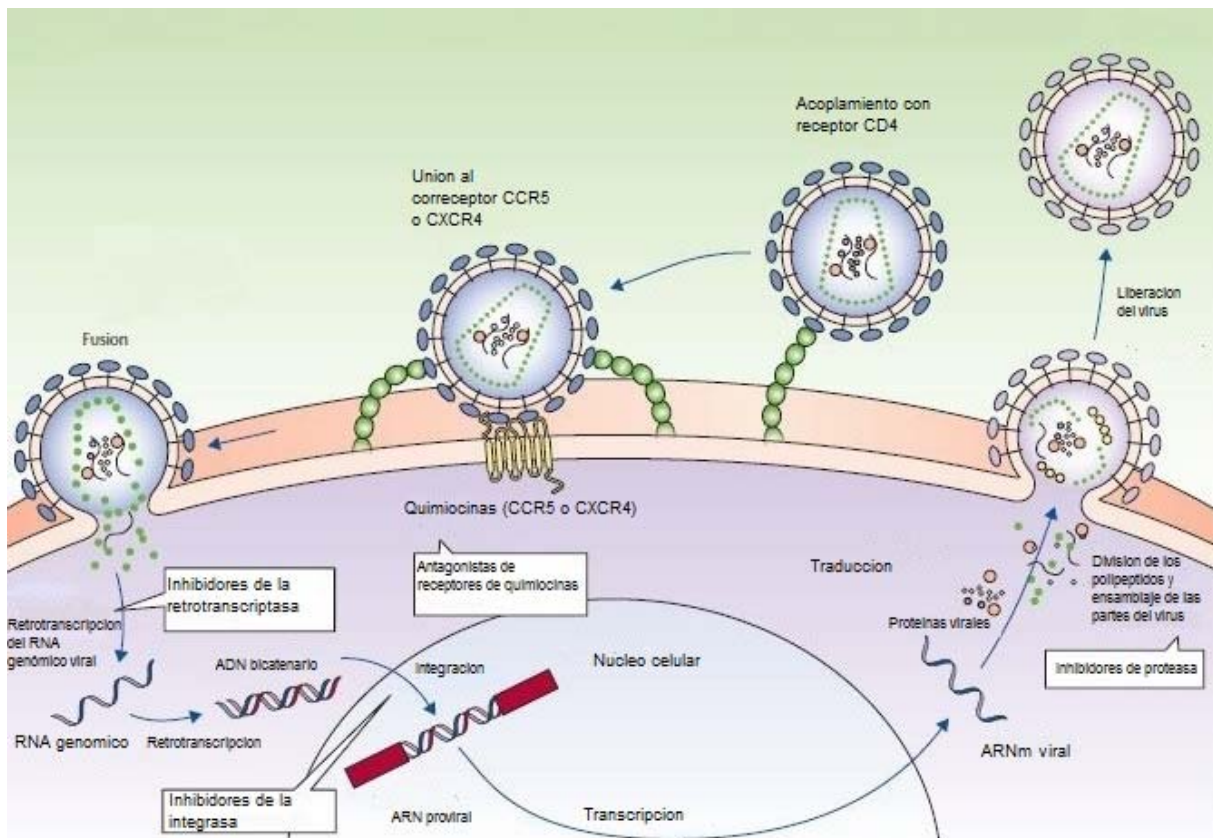


Figura 1: Ciclo vital del VIH mostrando los sitios de acción de las diferentes medicaciones. Recogido de Davidson's Principles and Practice of Medicine, 22nd edn. Walker BR, Colledge NR, Ralston SH, Penman I, eds. London, UK: Churchill Livingstone. 2014.

En la figura 1 se muestra el ciclo vital del virus. La entrada del virus es dependiente de la interacción de la proteína de envuelta viral con CD4 y los coreceptores de quimiocinas, CCR5 o CXCR4 [6]. Una vez dentro de la célula diana (fundamentalmente linfocitos CD4, macrófagos, etc) se produce un desempaquetamiento del ARN viral y su retrotranscripción. Posteriormente el ADN es transportado al núcleo celular e integrado gracias a la integrasa. A partir de este momento el provirus pasa a comportarse como un gen celular más. La expresión del ARNm viral genera las proteínas necesarias para la producción de una nueva generación de virus que geman a través de la membrana plasmática. Hay ciertas proteínas de la célula hospedadora que interactúan con las proteínas del VIH o con su material genético para restringir o promover la replicación del virus en células concretas (tabla 1).

	ACCION	OBJETIVO EN VIH
APOBEC-3G [7]	Proteína modificadora del ARN	Vif
TRIM-5α [8]	Ubiquitin ligasa de E3	Cápsida
Tetherin (BST-2) [9]	Proteína de membrana inmunomoduladora	Vpu
SAMHD1 [10]	Hidroliza dNTPs y restringe la eficacia de la transcripción reversa del VIH	Vpx (Expresado solo en VIH-2)
TREX-1 [11]	Exonucleasa citosólica que inhibe el reconocimiento de productos virales como el ADN del VIH	HIV DNA
LEDGF/p75 [12]	Lleva el ADN del VIH hasta la cromatina	integrasa
APOBEC-3G=apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like-3G. TRIM=tripartite motif. SAM=sterile α motif. HD1=histidine aspartic acid domain-containing protein 1. LEDGF=lens epithelium-derived growth factor.		

Tabla 1: Proteínas de la célula hospedadora que interactúan con el VIH para restringir o ayudarlo en la infección de la célula humana.

La carga viral, posteriormente, decrece hasta un punto establecido principalmente por la respuesta innata y las respuestas inmunes adaptativas. La muerte que ocasiona las células T CD8 de las células infectadas que producen virus ocurre poco después de la infección, y la potente adaptación del VIH frente a la respuesta inmune hace que el virus seleccione mutaciones en los epítomos clave, que suelen hacer que este pueda escapar de la respuesta inmune [13]. Para algunos antígenos leucocitarios humanos (HLA), como aquellos individuos con el alelo HLA-B27 que están infectados con el clado B, puede aparecer una respuesta inmune efectiva caracterizada por células T con gran avidéz, polifuncionales, y con capacidad para proliferar [14].

Los anticuerpos neutralizantes aparecen en torno a los 3 meses después de la transmisión y la selección de los mutantes virales que escapan [15]. En líneas generales, los anticuerpos neutralizantes, los cuales pueden bloquear muchos de los subtipos del VIH-1, son producidos por alrededor del 20% de los pacientes [16]. Estos anticuerpos están caracterizados por una alta frecuencia de mutaciones somáticas que suele tardar años en desarrollarse [17]. Generalmente, los anticuerpos neutralizantes no suelen otorgar beneficios a los pacientes ya que los

virus escapan a ellos por las mutaciones [18]. La producción de los anticuerpos neutralizadores mediante el uso de estrategias de diseño de inmunogenética es uno de los principales focos de la investigación de vacunas [19].

El sello de identidad de la infección por VIH es la progresiva reducción de células T CD4 debido a la disminución de su producción y al incremento de la destrucción de estas. Las células T CD4 son eliminadas mediante lisis directa [20]. En la fase temprana de la infección, una reducción transitoria de las células T CD4 viene seguida de la recuperación de concentraciones cercanas a las normales (2000 por μl), las cuales disminuirán lentamente hasta 50-100 células por μl (figura 2).

Las terapias antirretrovirales que fueron desarrolladas para suprimir la replicación viral fueron implementadas a finales de la década de los 90 y transformaron el VIH desde una enfermedad progresiva que tenía un final fatal hasta una enfermedad crónica manejable. Hay más de 25 medicamentos autorizados para bloquear la replicación del VIH en diferentes pasos de su ciclo vital que están disponibles.

Tras la iniciación en la terapia antirretroviral, en la mayoría de las personas, la carga viral en el plasma disminuye hasta concentraciones cercanas a los límites mínimos que los ensayos comerciales pueden detectar, normalmente en torno a los 3 meses (figura 2). En contra de esto, la recuperación de las células T CD4 en individuos con terapia antirretroviral es variable. En un estudio sobre las respuestas a las terapias antirretrovirales [21] realizado durante 6 meses en países de renta baja, el 56% de los pacientes tenían una respuesta viral y de células CD4 exitosa, un 19% tenían respuesta viral sin respuesta de las células CD4 y un 15% tenían una respuesta de las células CD4 sin respuesta viral. Los individuos que tenían una recuperación defectuosa de las células T CD4 pese a tener una buena supresión del virus, fueron asociados con factores de riesgo alto [22], los cuales incrementaban el riesgo de sufrir dolencias o enfermedades serias no relacionadas con el SIDA [23]. La interleucina 7, que promueve la proliferación de células T, hace que el número de estas se incremente, aunque no se sabe el beneficio clínico que esto tiene [24]. En cualquier caso, la interleucina 7 tiene un indeseable efecto al incrementar la cantidad de células T que están infectadas con VIH [25].

Tras comenzar la terapia antirretroviral, aquellos pacientes que llevan una vida cercana a la normal, es decir, aquellas personas que no han contraído el virus por el

consumo de drogas mediante vía inyectable, y han logrado tener un recuento de células CD4 y una supresión viral normal, se les estima una expectativa de vida normal.

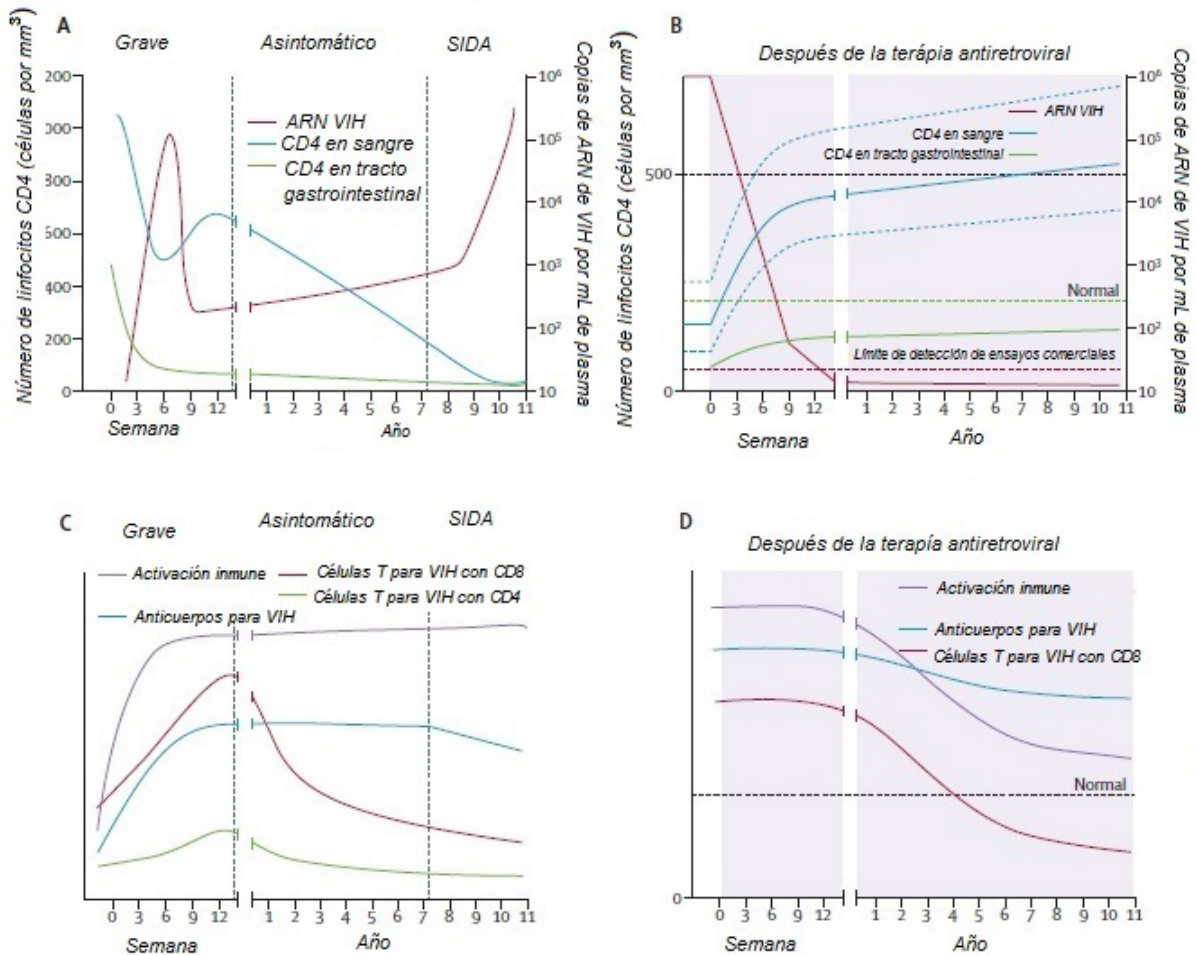


Figura 2: Seguimiento de la infección por VIH sin tratamiento y cambios tras la terapia antirretroviral.

(A) En una infección por VIH sin tratar, las células T CD4 se pierden progresivamente en la sangre pero las del tracto gastrointestinal las sustituyen rápidamente. (B) La respuesta aguda frente a la infección por el VIH incluye un dramático incremento en los marcadores de la activación de la inmunidad y la producción de anticuerpos no neutralizadores y de células T específicas para CD4 y CD8 que se asocian temporalmente con una reducción del ARN de VIH en sangre. (C) Tras la terapia antirretroviral, el ARN de VIH disminuye significativamente seguido de una recuperación de las células T CD4, las cuales varían según el individuo. En contraste con esto, la recuperación de las células T CD4 en el tracto gastrointestinal se reduce. (D) Con una reducción del ARN del VIH y del antígeno viral, las células T con el virus descienden tras la terapia, mientras que el anticuerpo persiste en todos los pacientes. La activación inmunitaria disminuye tras la terapia pero en la mayoría de los pacientes permanece significativamente más elevada comparándola con los controles sanos.

Los datos clínicos sugieren que un plazo corto de terapia antirretroviral aplicada en la infección temprana del VIH debe ralentizar el proceso de la enfermedad, pero hacen falta más estudios sobre personas que presenten infecciones agudas [26]. Del incremento del acceso a las terapias antirretrovirales se espera que se reduzca la transmisión del VIH, pero la duración de los efectos es desconocida, y el inicio temprano de la terapia expone a los pacientes a los efectos tóxicos de los medicamentos y al proceso de resistencia antes de que esto derive en beneficios clínicos [27]. La continuidad de los cuidados de los pacientes en los países de renta baja y media será el mayor reto ya que el número de personas apto para las terapias antirretrovirales se incrementaran desde los 16,5 millones hasta los 25,9 millones [28].

La terapia antirretroviral con replicación viral activa puede generar la selección de una subpoblación de VIH con mutaciones que les confiera resistencia contra los medicamentos antirretrovirales. Los pacientes que desarrollan resistencia frente a los antirretrovirales pueden transmitir la resistencia de un paciente a otro por infección cruzada. El porcentaje de la población infectada con virus mutantes resistentes a los diferentes tratamientos en los países de renta alta ha alcanzado un nivel en torno al 10-17%, mientras que en los países de renta baja y media está sobre el 6,6% en 2009 [29]. Las pautas generales en los países de renta alta recomiendan realizar un test de resistencia antes de iniciar una terapia antirretroviral, pero esta estrategia es muy cara como para ser implementada en lugares con recursos limitados.

A pesar del gran éxito de las terapias antirretrovirales para el control de la replicación del VIH y de la reducción significativa de los síntomas y de la mortalidad, las terapias antirretrovirales no suponen una cura frente al virus y son necesarios nuevos tratamientos a largo plazo. El VIH puede persistir en pacientes con terapias antirretrovirales debido a las células T que tienen una larga vida y permanecen infectadas [30], replicaciones residuales en algunos individuos [31], y reservorios anatómicos como el tracto gastrointestinal [32], tejidos linfoides, y el sistema nervioso central [33].

La latencia se define como la integración del ADN del VIH en el interior del genoma de la célula hospedadora en ausencia de replicación del virus. Las células T

infectadas con el virus de forma latente pueden padecer una proliferación homeostática [34] por la estimulación de citoquinas como la interleucina 7 [25], la cual contribuye en la persistencia y la larga vida de estas.

Hay mucho interés alrededor del descubrimiento de la cura funcional (el control a largo plazo del VIH sin el uso de las terapias antirretrovirales) o de aquella que elimine completamente las células infectadas por el virus. Las esperanzas de que una cura pueda ser posible han aumentado debido al descubrimiento de un caso en el que un hombre había sufrido el trasplante de unas células madre debido a la leucemia [35], y el de un bebé que había comenzado la terapia antirretroviral poco después de su nacimiento [36]. El mayor aporte sobre la posibilidad de una cura es un paciente de Berlín [35], un hombre con VIH que, en terapia antirretroviral, tenía una leucemia mieloide y recibió dos trasplantes de médula ósea de un donante homocigoto recesivo en CCR5, un correceptor clave necesario para la entrada en la célula del VIH. Poco después del trasplante, el paciente cesó la terapia antirretroviral y durante más de 6 años se le detectaron concentraciones mínimas o nulas del virus en el plasma o en tejidos [37]. Este caso ha inspirado el desarrollo de terapias génicas para eliminar el CCR5 mediante nuevas tecnologías como las nucleasas con dedos de zinc que pueden eliminar, de forma efectiva, la expresión de CCR5 [38].

Otra aproximación a la cura del VIH es eliminar a las células que contienen el virus de manera latente. Una estrategia, que está bajo investigación, es la activación del VIH latente para que induzca la expresión de las proteínas virales que lideran la inmunidad mediada a estas, o la citolisis de las células infectadas (figura 3). In vitro hay muchos compuestos que pueden activar el proceso lítico del VIH, como pueden ser los inhibidores de la histona deacetilasa [39]. Los resultados sobre el primer estudio de la histona deacetilasa muestran un incremento en la transcripción del VIH [40], pero esto no deja claro si, solo la activación, elimina de manera efectiva las células infectadas de manera latente, como se sugirió mediante un modelo in vitro de VIH latente [41]. Adicionalmente, un incremento en la inmunidad de las células T potenciales de infección del VIH podría ser necesario, mediante una vacuna terapéutica o mediante inmunomodulación. Hasta ahora, las vacunas que permitían el cese de las terapias antirretrovirales han producido resultados decepcionantes

[42], aunque las pruebas recientes con vacunas para células dendríticas [43] y vectores de citomegalovirus en simios [44] se han mostrado prometedoras [45].

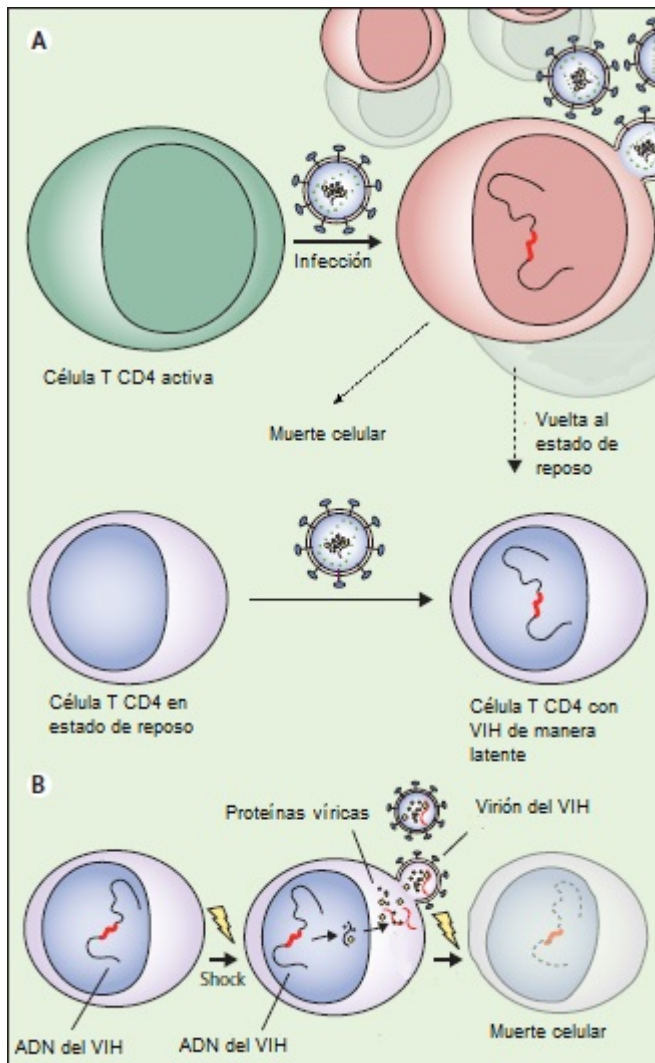


Figura 3: Latencia y activación de la infección celular por VIH

(A) La latencia puede ser establecida en una célula que ha sobrevivido a la activación y que ha vuelto a un estado de reposo, o a una célula en reposo que ha sido infectada.

(B) La activación de la transcripción producirá proteínas y viriones con el objetivo de producir la muerte celular.

Durante mucho tiempo, el sistema del complemento ha sido conocido por su contribución al sistema inmune innato en la defensa del

organismo mediante el uso de la lisis mediada por el complemento (CML). El complemento actúa como una vigilancia innata frente a intrusos como pueden ser hongos, bacterias y virus [46]. Casi 50 proteínas, algunas solubles y otras ligadas a membrana, están involucradas en la cascada del complemento y en su regulación, desde el reconocimiento de la superficie de un patógeno hasta la formación final del complejo de ataque de la membrana (MAC) [47]. Según el activador, el complemento tomará algunas de las 3 vías posibles que tiene de activación: la clásica, la alternativa y la de la vía de las lectinas; todas ellas coinciden en la activación del C3, que es el punto pivotante en la cascada de activación del complemento [48] (figura 4).

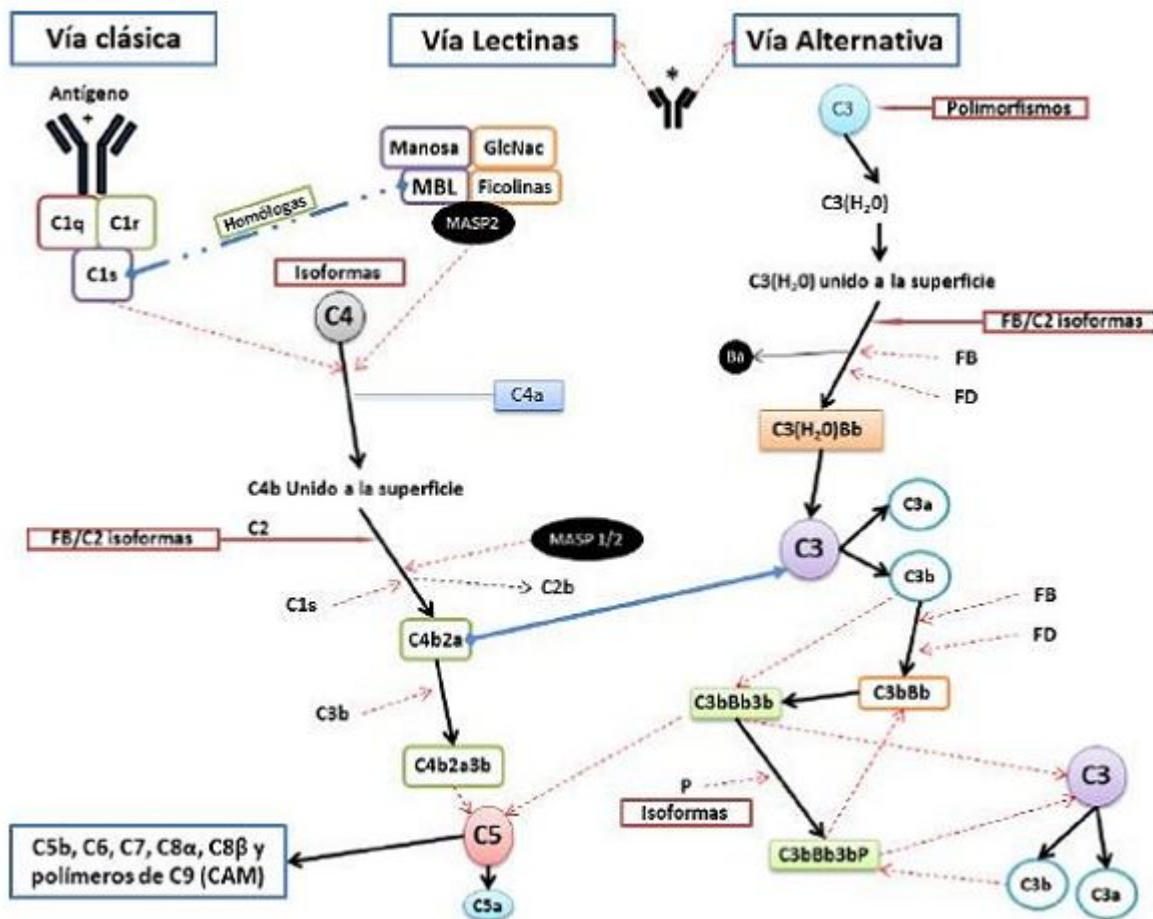


Figura 4: Esquema de las diferentes vías de activación del complemento.

Tras la opsonización de la superficie del patógeno con C3b, se forma un complejo multiproteico que hace que C5 se divida en C5a y C5b. La liberación de C5b inicia la cascada de pasos que se dará hasta la formación del MAC [49]. Durante este proceso, C6-C9 están formando el poro en torno a la membrana de la célula que dará como resultado la ruptura de la homeostasis de la célula afectada [48].

El VIH-1 es capaz de activar la ruta clásica del complemento en ausencia de anticuerpos; tal activación depende de la unión directa de la proteína C1q y la C3b que porta la membrana viral [50]. Este hecho se ve aumentado en presencia del anticuerpo anti-VIH-1 [51]. Además, el VIH-1 interacciona con la Manosa de unión a Lectina (MBL) mediante unión directa con gp120, desencadenando la activación de la ruta del complemento de las lectinas [52], aunque el virus parece ser resistente al complemento [53]; esto se explica mediante el uso que hace la partícula viral de las proteínas reguladoras de la activación del complemento (RCA), que son usadas por muchas familias de virus, lo que es un claro ejemplo de convergencia adaptativa

[54]. En el caso concreto del VIH-1, ha sido demostrada la absorción de la membrana unida a las proteínas RCA [53]. Estas proteínas mejoran la resistencia del virus a la lisis mediada por el complemento [53, 55, 56]. Otras proteínas solubles como el factor C del complemento (CFH) interactúan con la envuelta viral [57]. Los genes que producen las RCA son extremadamente polimórficos y en algunos casos ha sido encontrado algún polimorfismo con un efecto funcional [58]. Los viriones cubiertos por el complemento pueden interactuar con los receptores de este (CRs). A pesar de que la inactivación mediante la opsonización y la lisis ha sido observada [59], la expresión de los CRs en linfocitos T/B o eritrocitos puede también estimular el potencial de infección del virus en un proceso llamado estimulación de la infección mediante el complemento dependiente de anticuerpos (C'-ADE) [60], los CRs implicados en la C'-ADE incluyen CR1, CR2 y CR3.

Teniendo en cuenta estas interacciones entre el VIH-1, con las RCA y los receptores del complemento, planteamos la hipótesis de que los individuos que portan un polimorfismo que reduce la capacidad funcional de los CRs o las RCA o los sitios de interacción entre gp120/gp41 podrían disponer de una resistencia natural a la infección por VIH-1 mediada, o por un incremento en la probabilidad de la virolisis mediada por una activación óptima del complemento, o por una disminución de la infección mediada por el complemento.

ANTECEDENTES

Para demostrar esta hipótesis, se ha desarrollado un análisis genético de asociación caracterizando el fenotipo de los RCA y los CRs en dos cohortes independientes: una de individuos expuestos a VIH-1 seronegativos y otra de individuos VIH-1 positivos.

El equipo de trabajo consiguió incluir 451 muestras de individuos masculinos de raza blanca positivos para el virus de la hepatitis C (HCV) que han sido expuestos a la infección por parte de VIH-1 mediante el uso de inyectables para el consumo de drogas (IDU-España). Ambos, los que están infectados por los dos virus (HIV, 250 muestras), y los seronegativos para el VIH-1 (HESN, 201 muestras), [61]. Adicionalmente, una segunda población expuesta a la infección por VIH-1 mediante vía sexual fue analizada; los que están infectados por ambos virus (62 muestras) y los HESN (80 muestras) (Sexual-Italy). Las principales características de estas poblaciones han sido previamente descritas [62].

El estudio de asociación de genotipado de los polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) ha dado 139 SNPs en 19 genes relacionados con proteínas reguladoras del sistema del complemento o con los receptores de este. Nuestra población de estudio es altamente uniforme: todos son hombres, blancos caucásicos con ancestros españoles, positivos para HCV y consumidores de droga por vía intravenosa; incluyendo 201 HESN y 250 positivos para VIH-1. Encontramos dos SNPs que estaban significativamente asociados con la resistencia a la infección por VIH-1; rs1567190 localizado en CR2 y rs2842704 en C4BPA. Un posterior meta análisis donde incluimos una cohorte independiente de HESN procedente de Italia en riesgo de infección mediante ruta sexual nos dio soporte para pensar que solo CR2 estaba asociado con el riesgo de infección.

Este estudio tiene varias limitaciones; primero, la lista de genes relacionados con el sistema del complemento no es exhaustiva. Segundo, nuestro análisis fenotípico está limitado solo a la expresión del ARNm. Tercero, la cohorte de replicación procedente de Italia es significativamente más pequeña que la de España y los factores genéticos que afectan a la resistencia innata frente a la infección por VIH-1 vía sexual pueden ser diferentes a los de la vía parenteral.

El gen CR2 codifica para una proteína de membrana también conocida como CD21, la cual funciona como receptor de 5 ligandos: C3d/iC3b, el virus de Epstein-Barr, CD23 [63], interferón alfa [64] y ADN [65]. La unión de CR2 con complejos inmunes cubiertos por C3 da como resultado el incremento de la proliferación de linfocitos B y la activación de las vías de señalización intracelulares incluyendo la liberación de calcio o la activación de la MAP quinasa [66]. En las células dendríticas foliculares (FDCs) el CR2 captura los antígenos cubiertos por C3, aparentemente para mantenerlo en la superficie por largos periodos de tiempo, facilitando así una respuesta inmune prolongada [67]. El gen CR2 contiene 18 exones y en ellos existen dos isoformas principales que resultan de las diferentes uniones del exón 11: CR2-L y CR2-S. La primera isoforma es la que se expresa principalmente en las FDCs y contiene 16 repeticiones consenso cortas (SCRs); la segunda isoforma se expresa principalmente en los linfocitos B, en algunas células T activas y en células endoteliales, y contiene 15 SCRs; ambas tienen un dominio extracelular [68]. La función específica sobre la capacidad de unión que tienen a los ligandos es desconocida. Para confirmar funcionalmente que la expresión de las variantes alélicas y/o de splicing de CR2 influyen en la potenciación de la infección mediada por complemento, vamos a desarrollar un modelo de producción de pseudovirus pseudotipados con proteínas de envuelta de pacientes VIH-1 y un “core” viral basado en virus delecionados para la envuelta y portadores de la luciferasa. Este trabajo de fin de grado se centra en el desarrollo del sistema de expresión de envueltas VIH-1 para su posterior utilización en los ensayos in vitro.

OBJETIVOS

1. Clonación del gen de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 en un plásmido de expresión eucariota.
2. Generación de un fragmento de ADN bicatenario recombinante que contiene el promotor de la T7 polimerasa + IRES + gen de interés + poli-adenina. Se plantea realizarlo con dos genes reporter: TAT y luciferasa; y tras transfectar células testar si el sistema de expresión basado en la polimerasa de T7 polimerasa con IRES funciona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el estudio ha sido necesario desarrollar diferentes técnicas de ingeniería genética.

Los diferentes buffers y soluciones que se han ido usando durante los diferentes protocolos han sido los siguientes:

Medio LB líquido: Bapto-triptona (10 gr), extracto de levadura (5 gr), NaCl (10 gr), añadir unos 800 mL de agua destilada, ajustar el pH con NaOH a 7.5 y enrasar hasta 1 litro con agua.

Ampicilina 1000x.

X-gal 20 mg/mL (añadiendo unos 20 μ L por placa de Petri).

Marcador del peso molecular XVII (0.5-5 kpb) de Roche.

Marcador del peso molecular con ADN de 100-10000 pb de la casa ThermoScientific.

TAE al 1%: Solución de stock concentrada 50x: Tris base (242 gr), Ácido acético glacial (57.1 mL), EDTA pH 8 0.5M (100 mL), enrasar hasta 1 litro con agua.

StrataClone PCR Cloning Kit de la casa comercial Agilent.

JM109 de *E. coli* competentes de la casa Agilent.

dNTPs 10 mM.

Taq polimerasa de Kapa.

Tampón B para polimerasa de Kapa.

Kit Isolation of high copy plasmid de Macherey-Nagel.

KpnI HF de New England Biolabs.

XhoI de New England Biolabs.

NotI de New England Biolabs.

Buffer de digestión L de New England Biolabs.

NucleoSpin Extract de Macherey-Nagel.

Ligasa de T4 de Hoffmann-La Roche.

Buffer 10x de ligasa de Hoffmann-La Roche.

Expand long template PCR system de Hoffmann-La Roche.

Oligonucleótidos usados:

T7-gen-FOR: ATGAACACGATTAACATCGCTAAGAACGACT (31)

T7-gen-REV: TTACGCGAACGCGAAGTCCGACTCTAAGATGTCA (34)

TAT-DIRECTO:

CATCTCCTATGGCAGGAAGAAGATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCC
(52)

F-IRES-LUC:

CAACCCGGGATCCTCTAGAGTCGATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG (47)

R-IRES-LUC:

CCAGTCCCCCCTTTTCTTTTAAAAAGTTACAATTTGGACTTTCCGCCCTTCTTG
GCCTT (60)

ENV4-POLYA:

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCAGTCCCCCCTTTTCTTT
TAAAAAG (66)

Protocolo N° 1. Transformación bacteriana mediante choque térmico

Protocolo N° 2. Selección de colonias con plásmidos recombinantes portadores del gen de la polimerasa de T7

Protocolo N° 3. Electroforesis en gel de agarosa

Protocolo N° 4. Cultivo líquido de bacterias transformadas con plásmido de interés

Protocolo N° 5. Miniprep de las colonias

Protocolo N° 6. Cuantificación de ADN

Protocolo N° 7. Determinación de la orientación de un inserto en un plásmido

Protocolo N° 8. Digestión con enzimas de restricción para determinar orientación del inserto

Protocolo N° 9. Digestión para sacar el inserto

Protocolo N° 10. Extracción de bandas de ADN de gel de agarosa

Protocolo N° 11. Ligación en plásmido eucariota

Protocolo N° 12. Generación de productos de PCR T7-IRES-gen-polyA

Protocolo N° 1. Transformación bacteriana mediante choque térmico

El objetivo es introducir plásmidos de interés en bacterias para su amplificación en grandes cantidades.

Se ha usado la estirpe JM109 de *E. coli* competentes de la casa Agilent, medio LB líquido y placas de Petri con medio LB agar + antibiótico de selección (ampicilina 1000x) + X-gal. Se usará el StrataClone PCR Cloning Kit de la casa comercial Agilent (anexo 1) en el cual se ha clonado el gen de la polimerasa de T7. Se trabajará en atmósfera estéril en la campana de flujo laminar.

- Se coge el eppendorf con las bacterias del congelador de -80° C.
- En un eppendorf, previamente rotulado “pSC-A-amp/kan+T7pol”, se añade 20 µL de este mismo plásmido y 25 µL de bacterias competentes y se mezcla suavemente.
- Se deja incubar en hielo durante 15 minutos.
- Se somete a un choque térmico en un baño maría a 42° C durante 40 segundos y después durante 2 minutos en el hielo.
- Se añade 1 mL de medio LB líquido y se deja incubar a 37° C durante 90 minutos.
- Centrifugar 1 minuto a 14000 rpm.
- Retirar 1 mL del sobrenadante y resuspender con el medio sobrante.
- Sembrar la placa de Petri, previamente rotulada “pSC-A-amp/kan+T7pol”.

Incubar en la estufa a 37° C durante toda la noche.

Protocolo N° 2. Selección de colonias con plásmidos recombinantes portadores del gen de la polimerasa de T7

El objetivo es realizar una amplificación del fragmento de interés, que en este caso es la polimerasa de T7, mediante el uso de los primers concretos para este gen y la técnica de la PCR de colonias.

Se necesita la placa de medio LB agar + ampicilina + X-gal con las colonias transformadas con “pSC-A-amp/kan+T7pol”, una placa de Petri con medio LB agar + ampicilina, la mezcla de agentes reactivos necesarios para la PCR (Mix de PCR 1), eppendorf para el termociclador y puntas autoclavadas. Se trabajará en atmósfera estéril en la campana de flujo laminar.

Mix de PCR 1

Reactivo	Volumen/muestra
dNtPs 10 mM	2 µL
Oligo T7-gen-FOR	0.5 µL
Oligo T7-gen-REV	0.5 µL
Tampón B para polimerasa de Kapa	5 µL
Taq polimerasa de Kapa	0.5 µL
Agua	16.5 µL
Volumen total por muestra = 25 µL	

- Se prepara un volumen del Mix de PCR 1 para unas 16 muestras, depositando 25 µL de este en cada uno de los eppendorf para el termociclador, previamente rotulados del 1-14, Control + (C+) y control negativo (C-).
- Posteriormente, picaremos cada una de las colonias blancas (aquellas donde en el gen de selección LacZ' se supone se ha introducido nuestro inserto), haremos una réplica en la placa de Petri que se habrá rotulado previamente y

resuspenderemos en cada uno de los tubos con el Mix de PCR 1. El C+ deberá llevar cualquier muestra de ADN plasmídico que, con certeza, tenga el gen de la polimerasa de T7; y el C- solo lleva el Mix.

- Tras esto, se introducirán las siguientes condiciones para la extensión del gen de la T7 polimerasa en el termociclador:

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°	2 min
35	95°	30 seg
	60°	30 seg
	72°	3 min
1	72°	8 min
1	4°	indefinido

Protocolo N° 3. Electroforesis en gel de agarosa

Se pretende separar los diferentes ADNs que tenemos en una muestra concreta en función de su tamaño.

Será necesario el uso de agarosa en polvo, tampón TAE al 1%, bromuro de etidio, una cubeta de electroforesis con su fuente de alimentación, los eppendorf de la PCR que hemos realizado para la amplificación del gen de la polimerasa de T7, marcador de peso molecular (MPM) XVII de Roche (entre 0.5-5 kpb), tampón de carga y transiluminador.

- Primeramente, se tiene que hacer el gel de agarosa al 0.8% en un volumen final de TAE al 1% de 60 mL. Calentar en el microondas hasta que la agarosa esté totalmente disuelta y no se observen grumos. Dejar enfriar hasta que no se observe salida de vapores.
- Añadir 5 μ L de bromuro de etidio y diluir bien. Echar el gel, todavía líquido, en un molde para geles y dejar enfriar.
- Mientras, preparar las muestras de la PCR añadiéndoles 5 μ L de tampón de carga a cada uno de los eppendorf para cargar posteriormente en el gel 15 μ L de cada uno de ellos. Preparar también 5 μ L de MPM XVII.
- Introducir el gel, ya solidificado, en la cubeta para electroforesis y cargar todas las muestras.
- Aplicar un voltaje de unos 80-100 mV durante unos 30-40 min sin dejar que el frente se salga del gel.
- Observar en el transiluminador los diferentes tamaños del ADN de nuestras muestras.

Protocolo N° 4. Cultivo líquido de bacterias transformadas con plásmido de interés

El fin de esta técnica es la de conseguir una gran cantidad de células que contengan el plásmido de interés para luego poder seguir realizando diferentes protocolos con el plásmido.

El material necesario para poder desarrollarlo consta de Falcon de 15 mL, medio LB líquido, Ampicilina 1000x, puntas desechables autoclavadas y la placa donde se encuentren las colonias que se quieran clonar. Se trabajará en atmósfera estéril en la campana de flujo laminar.

- Echar en cada uno de los Falcon, previamente rotulados, un volumen de 2-5 mL de medio LB líquido. El C- solo lleva el medio LB líquido con la punta con la que se ha echado dentro del tubo Falcon.
- Añadir el volumen correspondiente de Ampicilina 1000x (entre 2-5 μ L) a cada uno de los tubos.
- Picar las colonias de interés con las puntas desechables y dejar dentro del tubo.
- Dejar durante, aproximadamente 24 horas, a 37° C en movimiento.

Protocolo N° 5. Miniprep de las colonias

La finalidad de este protocolo es la de sacar el plásmido de interés de cultivos bacterianos mediante el uso del protocolo comercial "Isolation of high copy plasmid" de Macherey-Nagel.

Se utilizará el kit comercial de extracción del plásmido ya nombrado anteriormente en el cual vienen las columnas de afinidad, buffer de resuspensión (A1), buffer de lisis (A2), buffer de neutralización (A3), buffer de lavado (A4) y el buffer de elución (AE).

- Precipitar los Falcon con el cultivo líquido a 4000 rpm durante 10 minutos.
- Desechar el sobrenadante con la punta.
- Añadir 500 µL de buffer A1 a cada uno de los Falcon y resuspender.
- Pasar las colonias resuspendidas en A1 a un eppendorf de 2 mL.
- Añadir 500 µL de buffer A2 e invertir el tubo 6-8 veces y dejar incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Añadir 600 µL de buffer A3 e invertir el tubo 6-8 veces.
- Precipitar a 11000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Cargar todo el sobrenadante posible en la columna de decantación (max. 750 µL) y centrifugar durante 1 minuto a 11000 rpm. Repetir hasta cargar todo el sobrenadante sin coger precipitado.
- Añadir 600 µL de buffer A4 y centrifugar a 11000 rpm durante 1 min.
- Desechar sobrenadante y centrifugar a 11000 rpm durante 4 minutos.
- Desechar el eppendorf donde se han realizado las centrifugaciones y sustituir por eppendorf definitivo, previamente rotulado.
- Añadir 50 µL de buffer AE precalentado a 70° C y dejar incubar a 70° C durante 2 minutos.
- Centrifugar a 11000 rpm durante 1 minuto.

Protocolo N° 6. Cuantificación de ADN

Para poder optimizar los resultados de las técnicas que se realizarán más adelante, se realiza esta técnica para saber cómo de purificado se ha obtenido el plásmido mediante la técnica anteriormente explicada.

Es necesario el uso de un Nanodrop para saber cuánto ADN hemos obtenido al extraer el plásmido de la bacteria, las muestras que se quieran cuantificar y agua destilada MQ.

- Previamente debe configurarse el Nanodrop para la medida de ADN y para que de la medida de la concentración de este en ng/μL.
- Antes de nada hay que limpiar la lente del aparato echando 2-5 μL de agua MQ y secar bien.
- Para realizar el blanco, añadir 1 μL de agua MQ y pulsar “BLANK” y secar bien.
- Poner 1 μL de cada muestra y pulsar “MEASURE”; secar bien.
- Tras finalizar con todas las muestras, volver a limpiar la lente del aparato.

La máquina arroja 4 datos que es necesario apuntar:

- Absorbancia a 260 nm
- Absorbancia a 280 nm
- Ratio = absorbancia 260 nm/absorbancia 280 nm; es una medida que si se encuentra entre 1.8-2 muestra que la extracción ha sido bien realizada.
- Concentración del ADN plasmídico, como ng/μL.

Protocolo N° 7. Determinación de la orientación de un inserto en un plásmido

Para extraer un inserto de un plásmido para, posteriormente, clonarlo en otro plásmido diferente, es muy necesario saber en qué orientación se encuentra el fragmento de ADN en el primero de ellos, ya que así, nos aseguraremos que tiene la orientación que interesa en el plásmido final. En este caso, el plásmido del que se quiere extraer el gen de la polimerasa de T7 es el pSC-A-amp/kan, para clonarlo luego en el plásmido de expresión en eucariotas pCMV-LUC (Anexo 2). Tras realizar un estudio mediante el uso de un software informático para la manipulación de secuencias de ácidos nucleicos (Bioedit: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) y teniendo en cuenta que es necesario encontrar una secuencia diana de un enzima de restricción que se encuentre tanto en el plásmido como en el inserto; se decide usar la enzima de restricción KpnI HF de New England Biolabs, así, según el esquema mostrado en la figura 5, podremos determinar la orientación del inserto en cada una de nuestras muestras.

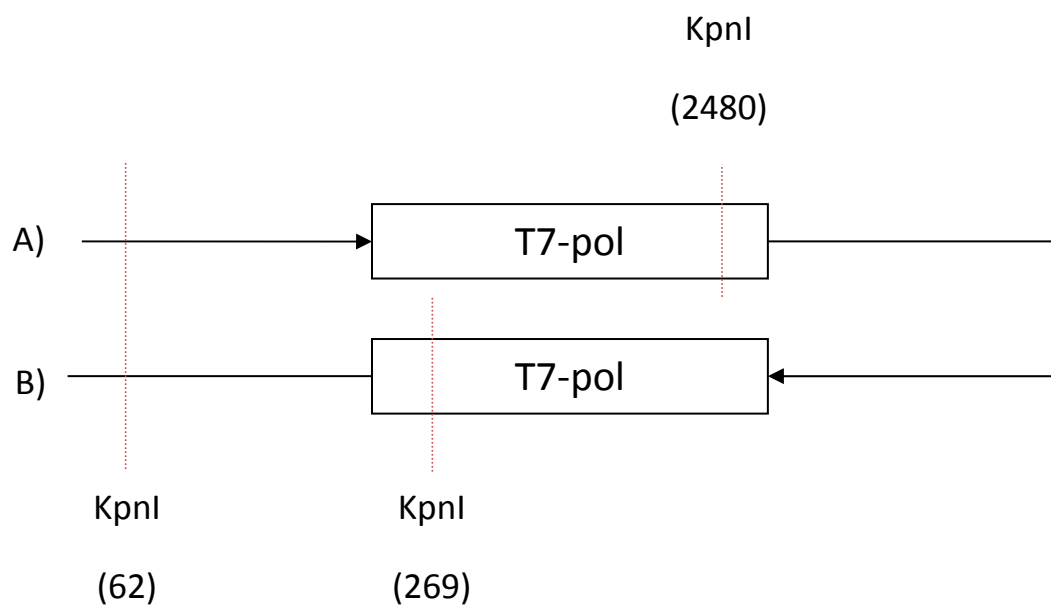


Figura 5: Distancia entre KpnI (62) hasta el inicio del gen T7-pol = 61 ppbb. Tamaño de T7-pol = 2749 ppbb. A) Si el inserto se encuentra según esta opción, el fragmento que se podrá observar tras el corte con KpnI es de 2541 ppbb. B) Si se encuentra el inserto en la orientación contraria, se obtendrá un fragmento de 330 ppbb.

Protocolo N° 8. Digestión con enzimas de restricción para determinar orientación del inserto

Tras el estudio realizado anteriormente, se realizará una restricción con enzimas de digestión para determinar la orientación del inserto de interés.

Se usará el kit comercial de restricción con KpnI HF de New England Biolabs en el cual vienen la enzima de restricción, el buffer 10x NE (necesario para la digestión de la enzima) y el 6x gel loading (para parar la reacción de esta). Se usaran todos esos reactivos según las siguientes cantidades:

<u>Reactivo</u>	<u>Volumen/muestra</u>
KpnI HF	1 µL
10x NE buffer	5 µL
ADN	1 µg
Agua	hasta 25 µL
STOP- 6x gel loading	5 µL

Incubar a 37° C durante 15 minutos y añadir 6x gel loading para detener la restricción.

Protocolo N° 9. Digestión para sacar el inserto

Para poder meter el inserto en el plásmido de destino es necesario saber que enzimas de restricción cortan y en qué lado, tanto del plásmido del que se quiere sacar, como al que se quiere introducir.

Para esto es necesario el uso de un software informático para la manipulación de secuencias de ácidos nucleicos (Bioedit: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) y tener conocimiento de cuáles son las enzimas que cortan a ambos lados del plásmido de origen, en el sitio de multiclonación (MCS) del plásmido donde se quiere llevar y que no corten en mitad del gen (T7-pol).

Tras el estudio con Bioedit, se determina usar las enzimas de restricción Xho I y Not I de la casa New England Biolabs para extraer el inserto de pSC-A-amp/kan e introducirlo en el plásmido de expresión eucariota pCMV-LUC. Se hacen dos Mix de digestión diferentes: uno para la digestión de pSC-A-amp/kan (Mix A) y otro para la digestión de pCMV-LUC (Mix B).

Mix A		Mix B	
<u>Reactivo</u>	<u>Volumen/muestra</u>	<u>Reactivo</u>	<u>Volumen/muestra</u>
Not I	0.5 µL	Not I	0.5 µL
Xho I	0.5 µL	Xho I	0.5 µL
Buffer de digestión L	2 µL	Buffer de digestión L	2 µL
ADN	1 µg	ADN (pCMV-LUC)	1 µg
Agua	hasta 20 µL	Agua	hasta 20 µL

Dejar incubar a 37° C durante 2 horas; para desactivar la digestión, poner a 80° C durante 5 minutos.

Protocolo N° 10. Extracción de bandas de ADN de gel de agarosa

La finalidad de este protocolo es la de purificar las bandas de ADN que hemos obtenido mediante la electroforesis en gel de agarosa, para el posterior uso de ellas.

Se realizará la extracción mediante el kit comercial NucleoSpin Extract de la casa Macherey-Nagel el cual incluye los buffers necesarios para el protocolo (NT1, NT3 y NE) y las columnas de cromatografía de afinidad..

- Añadir 300 μL de buffer NT1 en eppendorf por cada 100 mg de gel de agarosa.
- Incubar a 50° C durante 5-10 minutos agitando en el vórtex cada 2-3 minutos hasta que se disuelva por completo el gel.
- Cargar la muestra en la columna de decantación y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto; repetir hasta cargar por completo la muestra.
- Añadir 600 μL de NT3 y centrifugar a 11000 rpm durante 1 minuto para hacer el primer lavado.
- Añadir 200 μL de NT3 y centrifugar a 11000 rpm durante 2 minutos para realizar el segundo lavado.
- Desechar el eppendorf donde se han realizado las centrifugaciones y sustituir por eppendorf definitivo, previamente rotulado. Añadir 25-50 μL de NE y centrifugar a 11000 rpm durante 1 minuto.

Protocolo N° 11. Ligación de fragmentos de ADN con extremos cohesivos

El objetivo es la ligación de dos fragmentos de ADN con extremos cohesivos, que han sido digeridos mediante enzimas de restricción.

Se requiere para esta técnica el uso de una enzima ligasa de T4 de la casa Hoffmann-La Roche y el buffer 10x de ligasa de la misma casa comercial. Se realizarán 2 ligaciones diferentes: una será la ligación del gen de interés (T7-pol) con el plásmido de expresión en eucariota (pCMV), y otra será una ligación control del pCMV consigo mismo. Las proporciones de reactivos son:

T7-pol + pCMV		pCMV + pCMV	
<u>Reactivo</u>	<u>Volumen/muestra</u>	<u>Reactivo</u>	<u>Volumen/muestra</u>
Buffer 10x	2.5 µL	Buffer 10x	2.5 µL
pCMV	2 µL	pCMV	4 µL
T7-pol	1 µL	Ligasa T4	1.5 µL
Ligasa T4	1.5 µL	Agua	hasta 25 µL
Agua	hasta 25 µL		

Incubar a 4° C durante toda la noche.

Protocolo N° 12. Generación de productos de PCR T7-IRES-gen-polyA

El objetivo de esta técnica es la de conseguir fragmentos de ADN con una secuencia concreta que nos permita replicar el gen de interés sin necesidad de insertarlo en un plásmido. En este caso concreto, se quieren hacer las secuencias con dos genes: con TAT y con LUC.

Los materiales necesarios para realizar esto son: Expand long template PCR system de Roche, material convencional de PCR (dNTPs 10 mM, puntas con filtro, eppendorf para el termociclador, etc) y los diferentes oligonucleótidos necesarios para la amplificación de cada uno de los productos de las diferentes PCRs, que son:

PCR 1

MEZCLA A

Material	Volumen/muestra
dNTPs 10 mM	2 μ L
Oligo F-IRES-TAT	1 μ L
Oligo R-IRES-TAT	1 μ L
ADN	100 ng
Agua	hasta 12.5 μ L

MEZCLA B

Material	Volumen/muestra
Tampón 1 (Expand kit Roche)	5 μ L
Enzimas Taq/Pwo	0.5 μ L
Agua	hasta 12.5 μ L

Las condiciones para la PCR 1 son las siguientes:

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°	2 min
35	95°	20 seg
	60°	30 seg
	68°	30 seg
1	68°	10 min
1	4°	indefinido

El producto de esta PCR ya se había realizado con anterioridad, así que se procedió directamente a realizar la PCR 2

PCR 2

MEZCLA A

Material	Volumen/muestra
dNTPs 10 mM	2 μ L
Oligo TAT-DIRECTO	1 μ L
Oligo ENV4-POLYA	1 μ L
ADN	100 ng
Agua	hasta 12.5 μ L

MEZCLA B

Material	Volumen/muestra
Tampón 1 (Expand kit Roche)	5 μ L
Enzimas Taq/Pwo	0.5 μ L
Agua	hasta 12.5 μ L

Las condiciones para la PCR 2 son:

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°	2 min
10	95°	20 seg
	60°	30 seg
	68°	2 min y medio
25	95°	20 seg
	60°	30 seg
	68°	2 min y medio + 30 seg extra por ciclo
1	68°	10 min
1	4°	indefinido

La PCR de fusión implica que los productos de las PCRs 1 y 2 se mezclen y se reamplifiquen con los oligos F-IRES-TAT y ENV4-POLYA. PCR de ensamblaje

MEZCLA A

Material	Volumen/muestra
dNTPs 10 mM	2 µL
Oligo F-IRES-TAT	1 µL
Oligo ENV4-POLYA	1 µL
ADN	100 ng
Agua	hasta 12.5 µL

MEZCLA B

Material	Volumen/muestra
Tampón 1 (Expand kit Roche)	5 µL
Enzimas Taq/Pwo	0.5 µL
Agua	hasta 12.5 µL

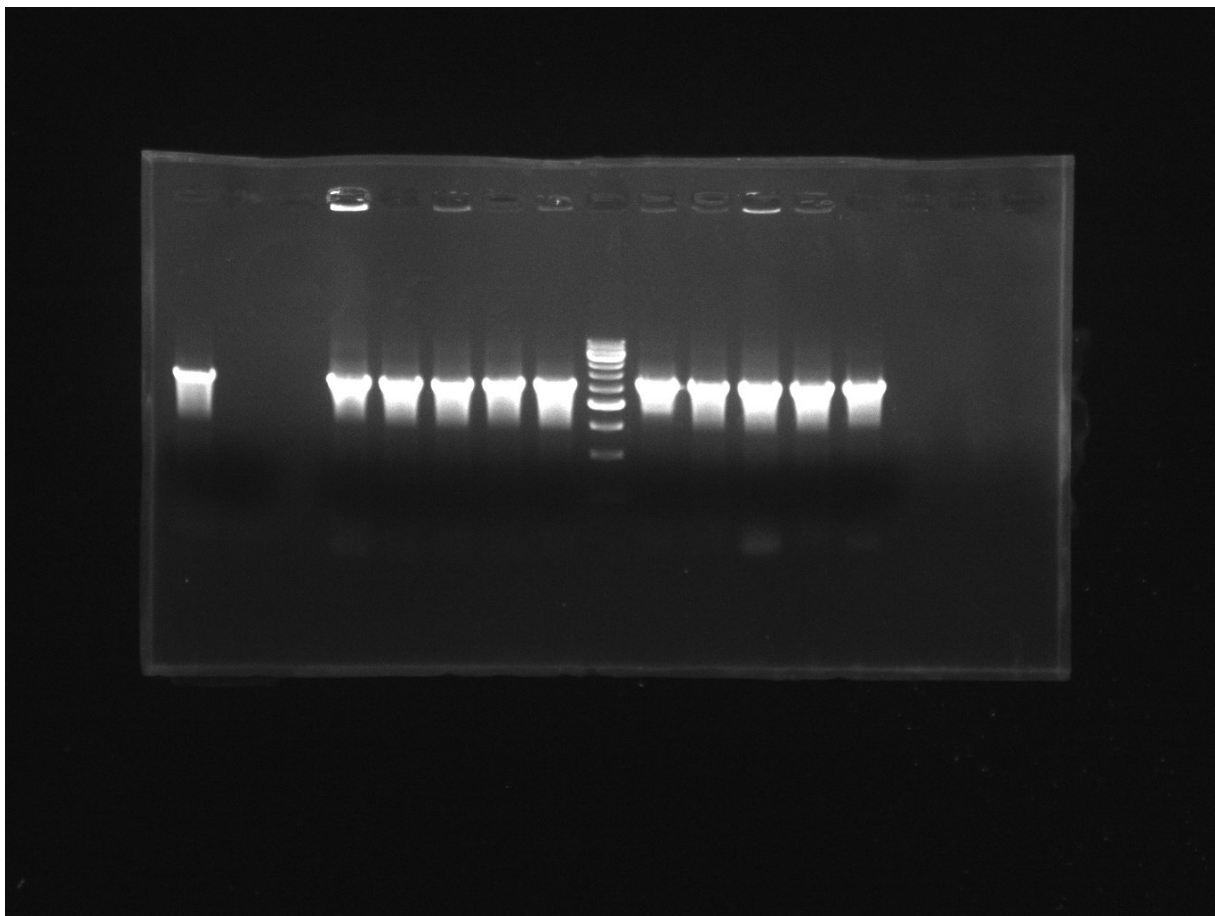
Las condiciones para la PCR de ensamblaje son las siguientes:

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°	2 min
10	95°	20 seg
	60°	30 seg
	68°	2 min y medio
25	95°	20 seg
	60°	30 seg
	68°	2 min y medio + 30 seg extra por ciclo
1	68°	10 min
1	4°	indefinido

RESULTADOS

Tras la transformación de bacterias competentes con pSC-A-amp/kan (protocolo 1) y su incubación durante, aproximadamente 24 horas, se realiza una réplica de 14 colonias blancas (al interrumpirse el gen de selección LacZ' en el plásmido de expresión en procariotas, estas no rompen la molécula de X-gal y las bacterias no se vuelven azules) en una placa con medio LB agar + ampicilina al 1000x poniéndole un número a cada una de ellas.

Después se procede a la selección de colonias portadoras del gen de interés (protocolo 2) al finalizar se hará una electroforesis en gel de agarosa (protocolo 3) con las muestras de la amplificación que acaban de realizarse; se observa que algunas muestras tienen un fragmento de unas 2.6 kpb (5ª banda corresponde a 2.5 kpb; correspondiente al gen de la T7 polimerasa) y que las colonias 2,3,5,7,10,11,12,13,14 y 15 son positivas y por lo tanto tienen el gen de interés.



De izquierda a derecha: C+/C-/pocillo vacio/2/3/5/7/10/MPM/11/12/13/14/15

Una vez que se han obtenido colonias que portan el pSC-A-amp/kan con el gen de la polimerasa de T7, se realizan los cultivos líquidos (protocolo 4) con estas colonias para obtener grandes cantidades de ellas para poder luego extraer el plásmido. La colonia número 2 no crece, por lo que se continúa con las otras 9 muestras.

Mediante el protocolo 5 se realizan las minipreps de los diferentes cultivos líquidos obteniendo así el plásmido purificado de cada una de las colonias positivas para el gen T7-pol. Previamente al protocolo de las restricciones se cuantifican las purificaciones (protocolo 6) para tener una aproximación sobre lo bien o mal que ha podido realizarse la técnica, se obtienen los siguientes resultados:

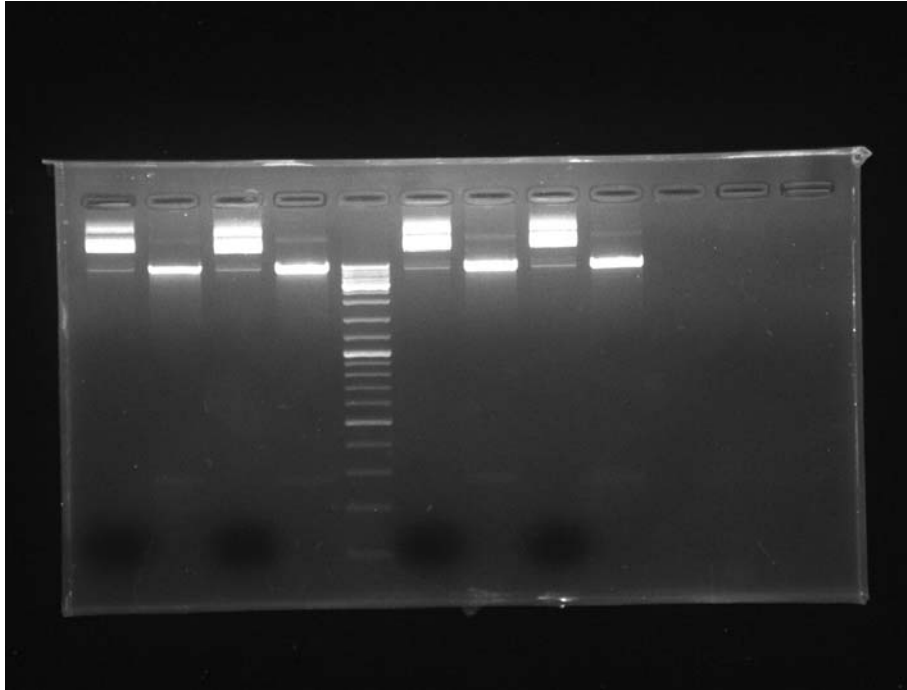
MUESTRA	ABS. 260 nm	ABS. 280 nm	RATIO (1.8-2)	CONCENTRACIÓN (ng/ μ L)
3	3.86	3.33	1.167	185.5
5	4.07	3.49	1.172	197.5
7	3.88	3.31	1.180	187
10	12.94	12.8	1.189	44
11	16.79	16.13	1.179	217.5
12	5.24	4.49	1.174	253.5
13	18.11	17.37	1.171	253
14	14.52	14.08	1.173	149
15	17.14	16.5	1.165	226

Al observar los datos, se decide realizar una dilución 1/10 y volver a medir, para ver si así las absorbancias se reducen; se obtienen los siguientes resultados:

MUESTRA	ABS. 260 nm	ABS. 280 nm	RATIO (1.8-2)	CONCENTRACIÓN (ng/ μ L)
3	0.15	0.079	1.628	9.2
5	0.254	0.174	1.58	10.9
7	0.228	0.142	1.593	11.6
10	0.132	0.115	1.739	2
11	0.37	0.251	1.697	14
12	0.58	0.45	1.555	18.5
13	0.43	0.297	1.62	17.5
14	0.231	0.168	1.534	9.1
15	0.41	0.282	1.542	17.5

Las absorbancias se han reducido y, al multiplicar las concentraciones por el factor de dilución usado (1/10) obtenemos las concentraciones reales que hay en las minipreps.

Tras esto, se procede a la digestión con las enzimas de restricción (protocolo 7) de las purificaciones de los plásmidos para determinar la orientación en la que se encuentra el inserto dentro de este. Las digestiones se realizan con las muestras número 11,12,13 y 15 por presentar mejores ratios y concentraciones. Se disponen las muestras en un gel de agarosa (protocolo 3) usando un MPM con ADN entre 100-10000 pb de la casa ThermoScientifics, obteniendo los siguientes resultados.



De izquierda a derecha: 11ND/11D/12ND/12D/MPM/13ND/13D/15ND/15D (*ND=no digerido; D=digerido)

Se observa que, en las cuatro muestras digeridas (pocillo 2,4,7 y 9), hay una banda de ADN de unas 300 pb que corresponde con el tamaño del fragmento de ADN que debería de salir tras la digestión si el inserto estuviera orientado como interesaba. Por lo que estos 4 plásmidos tienen la orientación del inserto que se persigue.

Una vez que se han obtenido los plásmidos con el inserto en la orientación deseada, se procede a digerir ambos plásmidos, tanto el de expresión en procariontas como el de expresión en eucariotas, con XhoI y NotI para extraer el inserto del primero e introducirlo en pCMV-LUC (protocolo 9) usando el plásmido extraído mediante la miniprep de la colonia número 11.

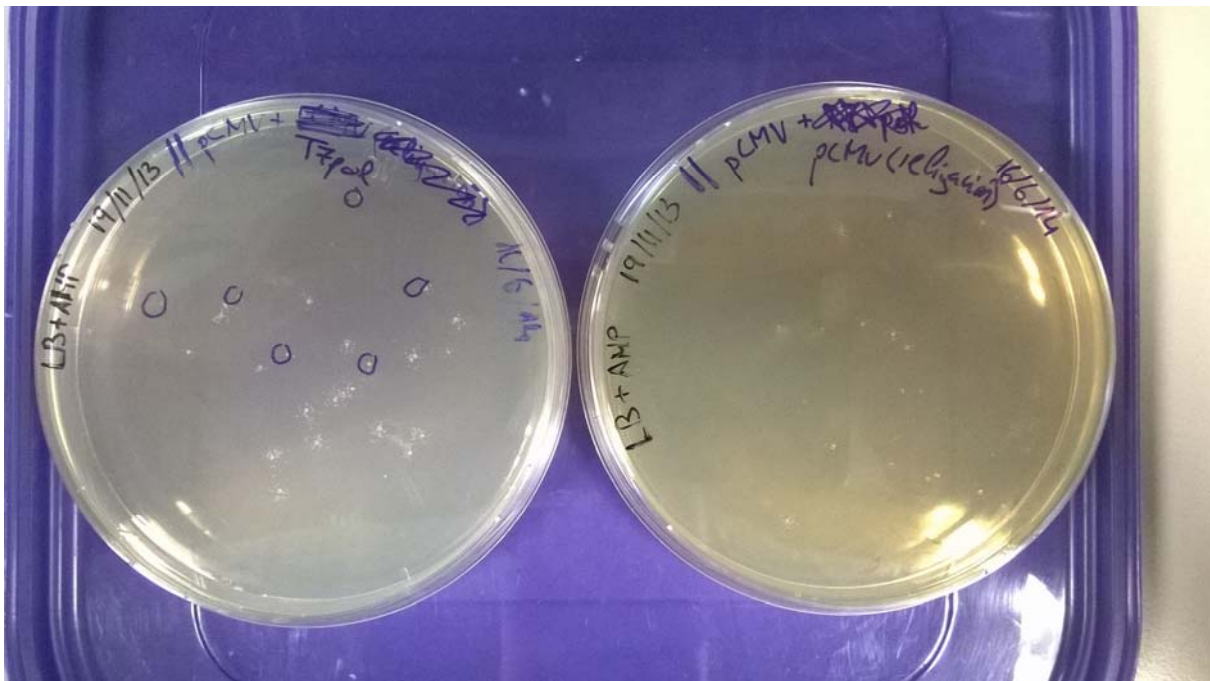
Tras correr las muestras en el gel de agarosa, se puede observar una banda de unas 2573 pb en el pSC-A-amp/kan que corresponde con el gen de la polimerasa de T7; y en la muestra de pCMV-LUC digerida, también se puede observar una banda de ADN de unas 5376 pb que corresponde con el plásmido sin la parte de la luciferasa cortada por las enzimas de restricción.

Después de cortar los fragmentos del gel que interesan, se procede a la extracción de las bandas de ADN (protocolo 10), y al finalizar se termina valorando lo bien que se ha realizado la técnica mediante la cuantificación del ADN obtenido (protocolo 6) obteniendo los siguientes resultados:

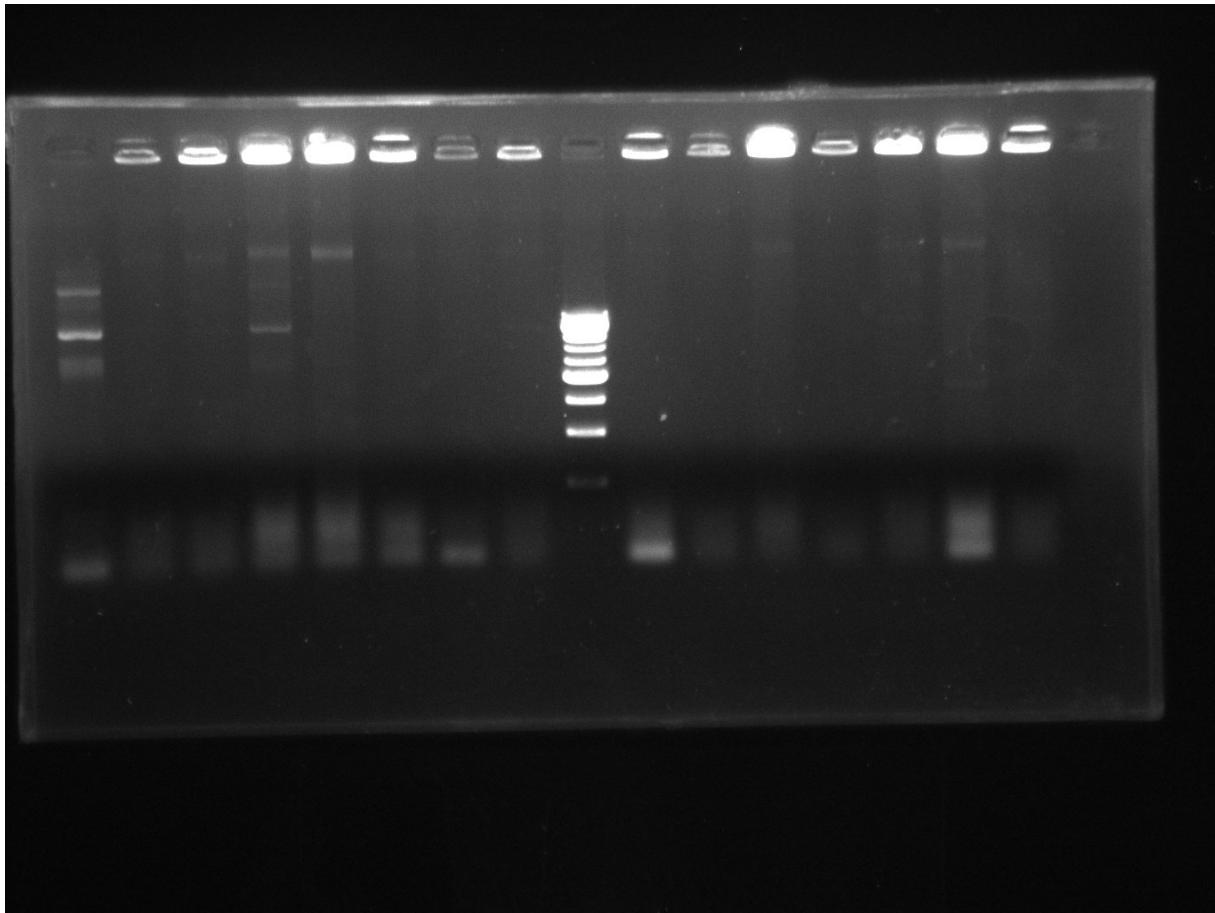
Muestra	Abs. 260 nm	Abs. 280 nm	Ratio(1.8 – 2)	Concentración
T7-pol XhoI/NotI	0.238	0.162	1.46	11.9 ng/ μ L
pCMV XhoI/NotI	0.083	0.051	1.62	4.2 ng/ μ L

Con la cuantificación de las digestiones hechas, se procede a la ligación de ambos fragmentos (protocolo 11) dejándolo durante toda la noche a 4° C.

Tras la ligación, se realiza una transformación de bacterias competentes (protocolo 1) para poder así obtener una gran cantidad de los plásmidos ligados, en caso de haberse realizado correctamente la técnica. Cuando se recogen los cultivos en medio LB agar + Ampicilina 1000x, se obtiene una estadística de 25 vs 13 de transformadas con pCMV+T7pol vs pCMV+pCMV.



Una vez obtenido los cultivos de bacterias transformadas con pCMV + T7pol se realiza una PCR usando los oligos para el gen de la polimerasa de T7 para corroborar que tienen el inserto (protocolo 2). Una vez cargadas las muestras de la PCR en un gel de agarosa (protocolo 3) se puede observar que las colonias 2 y 3 (pocillos 4 y 5, respectivamente) tienen una banda justo por encima de la que se corresponde con 2500 pb que correspondería con el gen de interés, luego las consideramos positivas para la ligación de la T7pol con pCMV.

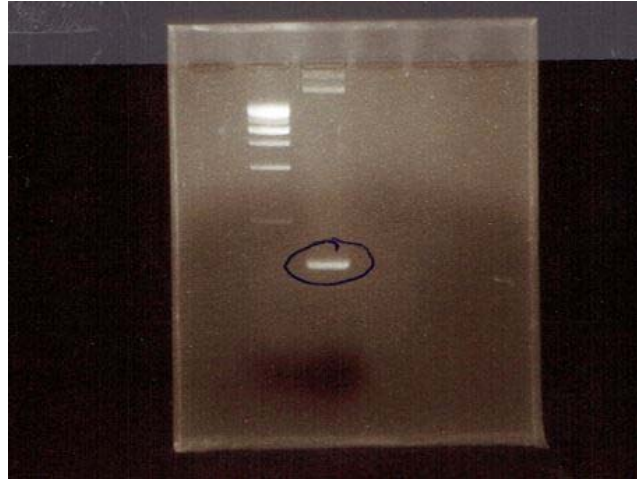


Se hacen los cultivos líquidos de las colonias 2 y 3, verificadas anteriormente que son positivas para el gen de la polimerasa de T7, para clonar el plásmido (protocolo 4), luego se realizan las minipreps (protocolo 5) y se cuantifican (protocolo 6).

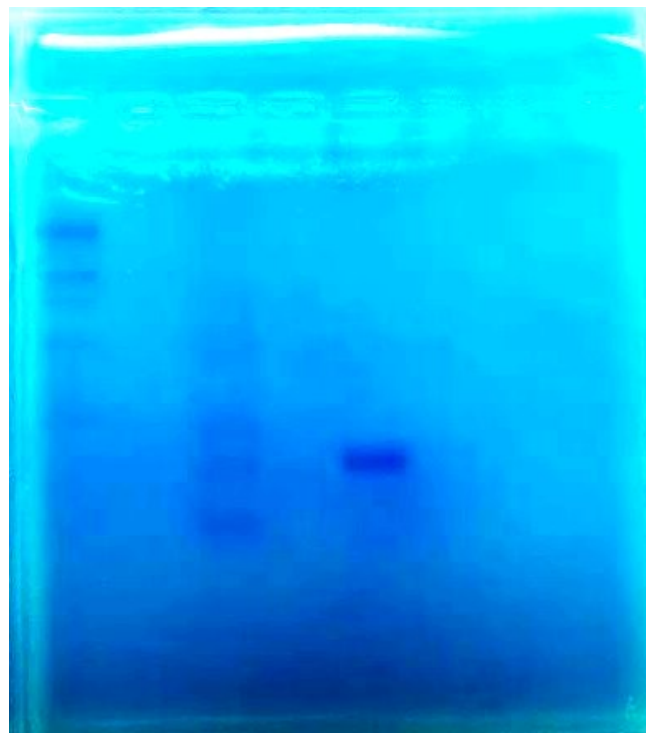
Muestra	Abs. 260 nm	Abs. 280 nm	Ratio (1.8-2)	Concentración
2	0.468	0.277	1.69	23.4
3	0.334	0.226	1.48	16.7

Se procede a realizar la generación de productos de PCR T7-IRES-gen-PolyA con dos genes: por un lado el gen de la proteína viral TAT, y por otro el de la luciferasa.

La PCR 1 de TAT (protocolo 12) se somete a una electroforesis (protocolo 3) donde se puede observar que hay una banda de ADN de un tamaño menor a 500 pb que se corresponde con el fragmento amplificado de TAT con la cola de IRES.



Tras esto, y con la PCR 2 del mismo protocolo realizada anteriormente, se procede a realizar la PCR de ensamblaje de ambas y cargarlas en un gel de agarosa (protocolo 3) tiñéndolo con azul de metileno. Se pueden observar, en el pocillo de la PCR de fusión, 3 grandes bandas que se corresponden, de manera descendente, con la PCR de ensamblaje, la amplificación de TAT (corresponde en tamaño con la amplificación control de TAT del pocillo de la derecha) y la amplificación de la PCR 2, respectivamente.



Una vez realizado esto, se purifica la banda de interés (de las 3 que están seguidas en el pocillo número 3, la que se encuentra más arriba) mediante el protocolo 10 para obtener la secuencia T7-IRES-TAT-PolyA.

DISCUSIÓN

1. Pese a faltar la verificación por digestión con enzima de restricción (KpnI) de que la ligación T7-pol + pCMV de las colonias 2 y 3 se ha realizado correctamente, cabe esperar que, en caso de realizarse la técnica, diera un resultado positivo teniendo en cuenta que, anteriormente, se ha realizado la misma verificación mediante PCR usando los oligos para este gen.
2.
 1. Se ha conseguido producir el fragmento con el promotor de la polimerasa de la T7 + IRES + TAT + Poli-adenina.
 2. No se ha conseguido producir el mismo fragmento con el gen de la Luciferasa por falta de tiempo para optimizar la técnica de la PCR de ensamblaje.
 3. El último paso de este objetivo era transfectar células y mediante la medición de los genes reporter (TAT y Luciferasa) poder concluir si el sistema de expresión basado en la polimerasa de T7 con IRES. Debido a la falta de tiempo no ha podido realizarse.

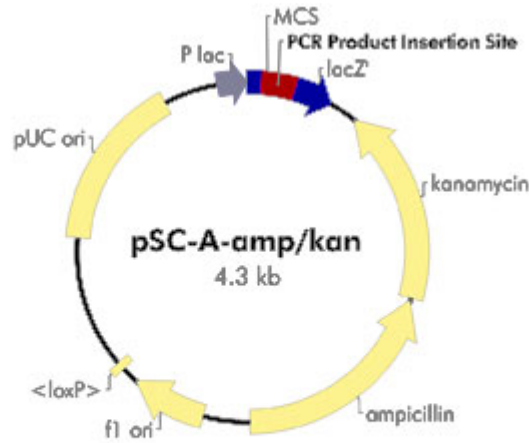
CONCLUSIÓN

El objetivo de este estudio era desarrollar un sistema de replicación en células eucariotas, y verificar que este funcionara correctamente, en el cual no hiciera falta insertar el gen que quisiéramos estudiar en un plásmido, ya que el desarrollo de este mecanismo es arduo complejo debido a las múltiples técnicas que hay que realizar hasta dar con el plásmido purificado.

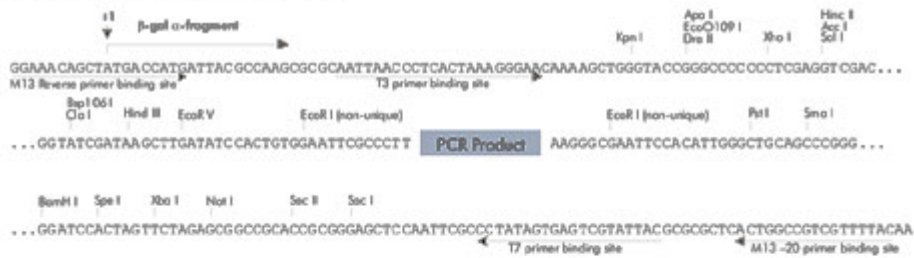
Aunque no se ha conseguido llegar a los objetivos marcados, el trabajo realizado ha supuesto un gran aporte en el desarrollo del alumno de cara a saber cómo se trabaja en un laboratorio y verse implicado en un proyecto de investigación real. Una de las ideas que se han valorado tras los resultados obtenidos, es la necesidad de haber dispuesto de más tiempo para realizar el trabajo fin de grado, ya que muchas técnicas no estaban optimizadas y ha sido necesario repetirlas en varias ocasiones hasta lograr el resultado que se esperaba.

Anexos

Anexo 1



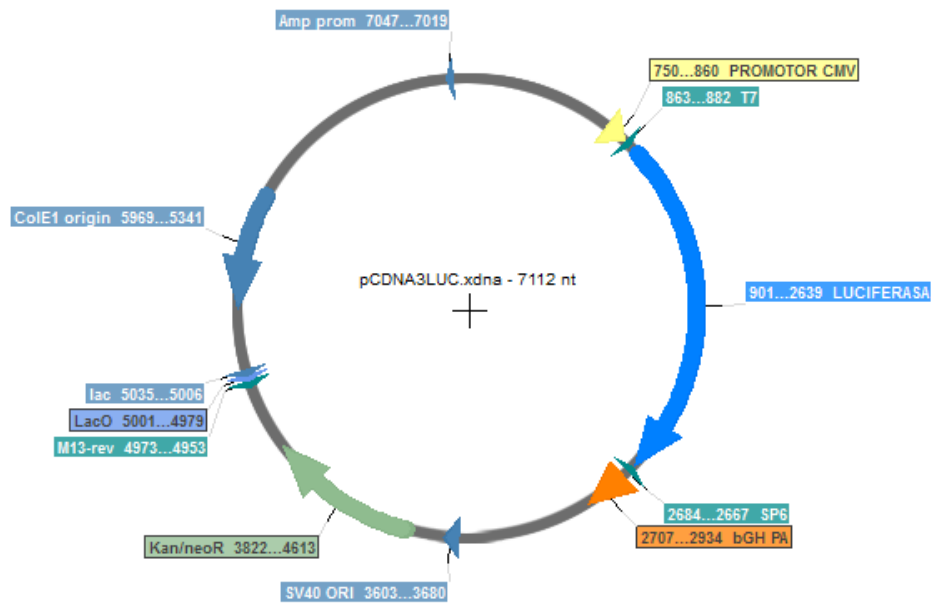
pSC-A-amp/kan PCR Cloning Vector PCR Product Insertion Site Region
(sequence shown 4261–4270, 1–250)



Feature	Nucleotide Position
β -galactosidase α -fragment coding sequence (<i>lacZ'</i>)	1–352
Multiple cloning site (MCS)	57–195
PCR product insertion site	123
Kanamycin resistance ORF	463–1254
ampicillin resistance (<i>bla</i>) ORF	1266–2123
<i>fl</i> origin of ss-DNA replication	2315–2621
<loxP> (mutant <i>loxP</i> -derived sequence <i>lox66/71</i> ; nonfunctional in Cre-mediated recombination)	2688–2721
pUC origin of replication	3262–3929
<i>lac</i> promoter	4151–4270

Anexo 2

Restriction map of pCDNA3LUC.xdna - 7112 nt
<Serial Cloner V2.5> -- <lun, 28 de jul de 2014 1:43>



BIBLIOGRAFÍA

1. Sharp, P.M. and B.H. Hahn, *Origins of HIV and the AIDS pandemic*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a006841.
2. *Report on the global AIDS epidemic 2013*. 2013: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf.
3. J, Z., et al., *Dramatic increases in HIV prevalence after scale-up of antiretroviral treatment: a longitudinal population-based HIV surveillance study in rural kwazulu-natal*. AIDS, 2013. **27**: p. 2301-2305.
4. Collaboration, A.T.C., *Causes of death in HIV-1-infected patients treated with antiretroviral therapy, 1996-2006: collaborative analysis of 13 HIV cohort studies*. Clin Infect Dis, 2010. **50**: p. 1387-1396.
5. Joshi, D., et al., *Increasing burden of liver disease in patients with HIV infection*. Lancet, 2011. **377**(9772): p. 1198-209.
6. Liu, Y., et al., *CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor*. J Virol, 2004. **78**(8): p. 4120-33.
7. Sheehy, A.M., N.C. Gaddis, and M.H. Malim, *The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1404-7.
8. Stremlau, M., et al., *The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys*. Nature, 2004. **427**(6977): p. 848-53.
9. Neil, S.J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu*. Nature, 2008. **451**(7177): p. 425-30.
10. Hrecka, K., et al., *Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein*. Nature, 2011. **474**(7353): p. 658-61.
11. Yan, N., et al., *The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1*. Nat Immunol, 2010. **11**(11): p. 1005-13.
12. Maertens, G., et al., *LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 33528-39.
13. Goonetilleke, N., et al., *The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection*. J Exp Med, 2009. **206**(6): p. 1253-72.
14. Almeida, J.R., et al., *Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover*. J Exp Med, 2007. **204**(10): p. 2473-85.
15. Richman, D.D., et al., *Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4144-9.
16. Walker, L.M., et al., *Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies*. Nature, 2011. **477**(7365): p. 466-70.
17. Klein, F., et al., *Somatic mutations of the immunoglobulin framework are generally required for broad and potent HIV-1 neutralization*. Cell, 2013. **153**(1): p. 126-38.
18. Liao, H.X., et al., *Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 469-76.
19. Jardine, J., et al., *Rational HIV immunogen design to target specific germline B cell receptors*. Science, 2013. **340**(6133): p. 711-6.
20. Cooper, A., et al., *HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration*. Nature, 2013. **498**(7454): p. 376-9.
21. Tuboi, S.H., et al., *Discordant responses to potent antiretroviral treatment in previously naive HIV-1-infected adults initiating treatment in resource-constrained countries: the antiretroviral therapy in low-income countries (ART-LINC) collaboration*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2007. **45**(1): p. 52-9.

22. Rajasuriar, R., et al., *Clinical predictors of immune reconstitution following combination antiretroviral therapy in patients from the Australian HIV Observational Database*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20713.
23. Helleberg, M., et al., *Causes of death among Danish HIV patients compared with population controls in the period 1995-2008*. Infection, 2012. **40**(6): p. 627-34.
24. Sereti, I., et al., *IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection*. Blood, 2009. **113**(25): p. 6304-14.
25. Vandergeeten, C., et al., *Interleukin-7 promotes HIV persistence during antiretroviral therapy*. Blood, 2013. **121**(21): p. 4321-9.
26. Walker, B.D. and M.S. Hirsch, *Antiretroviral therapy in early HIV infection*. N Engl J Med, 2013. **368**(3): p. 279-81.
27. Kulkarni, S.P., et al., *Clinical uncertainties, health service challenges, and ethical complexities of HIV "test-and-treat": a systematic review*. Am J Public Health, 2013. **103**(6): p. e14-23.
28. WHO, *Global update on HIV treatment 2013: results, impact and opportunities*. World Health Organization, 2013.
29. WHO, *WHO HIV drug resistance report 2012*. 2012.
30. Finzi, D., et al., *Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy*. Nat Med, 1999. **5**(5): p. 512-7.
31. Buzon, M.J., et al., *HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects*. Nat Med, 2010. **16**(4): p. 460-5.
32. Chun, T.W., et al., *Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2008. **197**(5): p. 714-20.
33. Cusini, A., et al., *Higher CNS penetration-effectiveness of long-term combination antiretroviral therapy is associated with better HIV-1 viral suppression in cerebrospinal fluid*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2013. **62**(1): p. 28-35.
34. Chomont, N., et al., *HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation*. Nat Med, 2009. **15**(8): p. 893-900.
35. Hutter, G., et al., *Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation*. N Engl J Med, 2009. **360**(7): p. 692-8.
36. Persaud, D., et al., *Absence of detectable HIV-1 viremia after treatment cessation in an infant*. N Engl J Med, 2013. **369**(19): p. 1828-35.
37. Yukl, S.A., et al., *Challenges in detecting HIV persistence during potentially curative interventions: a study of the Berlin patient*. PLoS Pathog, 2013. **9**(5): p. e1003347.
38. Li, L., et al., *Genomic editing of the HIV-1 coreceptor CCR5 in adult hematopoietic stem and progenitor cells using zinc finger nucleases*. Mol Ther, 2013. **21**(6): p. 1259-69.
39. Lewin, S.R. and C. Rouzioux, *HIV cure and eradication: how will we get from the laboratory to effective clinical trials?* AIDS, 2011. **25**(7): p. 885-97.
40. Archin, N.M., et al., *Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy*. Nature, 2012. **487**(7408): p. 482-5.
41. Shan, L., et al., *Stimulation of HIV-1-specific cytolytic T lymphocytes facilitates elimination of latent viral reservoir after virus reactivation*. Immunity, 2012. **36**(3): p. 491-501.
42. Papagno, L., et al., *Comprehensive analysis of virus-specific T-cells provides clues for the failure of therapeutic immunization with ALVAC-HIV vaccine*. AIDS, 2011. **25**(1): p. 27-36.
43. Garcia, F., et al., *A dendritic cell-based vaccine elicits T cell responses associated with control of HIV-1 replication*. Sci Transl Med, 2013. **5**(166): p. 166ra2.
44. Hansen, S.G., et al., *Immune clearance of highly pathogenic SIV infection*. Nature, 2013. **502**(7469): p. 100-4.
45. Dutta, A., et al., *Key harm reduction interventions and their impact on the reduction of risky behavior and HIV incidence among people who inject drugs in low-income and middle-income countries*. Curr Opin HIV AIDS, 2012. **7**(4): p. 362-8.
46. Walport, M.J., *Complement. First of two parts*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1058-66.

47. Ricklin, D., et al., *Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis*. Nat Immunol, 2010. **11**(9): p. 785-97.
48. Speth, C., et al., *Complement*. 2008: p. 1047-1078.
49. Kondos, S.C., et al., *The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins*. Tissue Antigens, 2010. **76**(5): p. 341-51.
50. NM, T., T.-D. P, and A. GJ, *Interaction of C1q and mannan-binding lectin with viruses*. Immunobiology, 2002. **205**: p. 563-574.
51. Z, P., et al., *Interaction of complement and specific antibodies with the external glycoprotein 120 of HIV-1*. Immunobiology, 1995. **85**: p. 184-189.
52. X, J., G. H, and S. GT, *Mannose binding lectin (MBL) and HIV*. Mol Immunol, 2005. **42**: p. 145-152.
53. H, S., C. A, and D. MP, *Role of complement in HIV infection*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 649-674.
54. D, T., et al., *Viral subversion of the immune system*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 861-923.
55. J, S., et al., *Antibody-dependent complement-mediated cytotoxicity in sera from patients with HIV-1 infections is controlled by CD55 and CD59*. The Journal of clinical investigation, 1995. **96**: p. 1520-1526.
56. M, S., et al., *Role of virion-associated glycosylphosphatidylinositol-linked proteins CD55 and CD59 in complement resistance of cell line-derived and primary isolates of HIV-1*. J Exp Med, 1995. **182**: p. 501-509.
57. H, S., et al., *Human complement proteins C3b, C4b, factor H and properdin react with specific sites in gp120 and gp 41, the envelope proteins of HIV-1*. Immunobiology, 1995. **193**: p. 98-113.
58. S, R.d.C., et al., *The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations*. Molecular immunology, 2004. **41**: p. 355-367.
59. D, W., et al., *IgG opsonization of HIV impedes provirus formation in and infection of dendritic cells and subsequent long-term transfer to T cells*. Journal of immunology, 2007. **178**: p. 7840-7848.
60. A, T. and K. Y, *Antibody-dependent enhancement of viral infection: molecular mechanisms and in vivo applications*. Rev Med Virol, 2003. **13**: p. 387-398.
61. MS, d.I.T., et al., *Vitamin D receptor gene haplotypes and susceptibility to HIV-1 infection in injection drug users*. J Infect Dis, 2008. **197**: p. 405-410.
62. Sironi, M., et al., *A common polymorphism in TLR3 confers natural resistance to HIV-1 infection*. J Immunol, 2012. **188**(2): p. 818-23.
63. Frank, M.M., *CD21 deficiency, complement, and the development of common variable immunodeficiency*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(3): p. 811-3.
64. Asokan, R., et al., *Characterization of human complement receptor type 2 (CR2/CD21) as a receptor for IFN-alpha: a potential role in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 383-94.
65. Asokan, R., et al., *Human complement receptor 2 (CR2/CD21) as a receptor for DNA: implications for its roles in the immune response and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE)*. Mol Immunol, 2013. **53**(1-2): p. 99-110.
66. Cambier, J.C., C.M. Pleiman, and M.R. Clark, *Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 457-86.
67. Cinamon, G., et al., *Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport*. Nat Immunol, 2008. **9**(1): p. 54-62.
68. Douglas, K.B., et al., *Complement receptor 2 polymorphisms associated with systemic lupus erythematosus modulate alternative splicing*. Genes Immun, 2009. **10**(5): p. 457-69.