

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LOS DOMINIOS EXTRACELULARES DE PD-1 Y PD-L1

Priscilla González¹, Evangelina Beltrán-López¹, Héctor Samuel López-Moreno¹

¹Laboratorio de Biomedicina Molecular, Posgrados en Ciencias Biomédicas y en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa, México. CP.80013. *hslmoreno@ms.uas.edu.mx

Palabras clave: DNA recombinante, PD-1, PD-L1

Introducción. La proteína de muerte celular programada-1 (PD-1), es un correceptor inhibitorio expresado en la membrada del linfocito T(1). Diversos tipos de cáncer sobreexpresan el Ligando de PD-1 (PD-L1), que tras la desfosforilación de moléculas activadoras como ZAP70 y PKCθ río abajo del TCR, evocan la anergia o agotamiento de los Linfocitos T Infiltrantes del Tumor, repercutiendo negativamente en la respuesta efectora antitumoral (2). El empleo de inmunoterapéuticos humanizados basados en anticuerpos monoclonales (MAb), que bloquean la interacción PD-1/PD-L1 mejoran la respuesta al tratamiento de los pacientes con cáncer (2-4), para ello, un aspecto crítico es la disponibilidad del antígeno, por lo que la biotecnología biomédica es clave para este fin.

Objetivo. Clonar y expresar los dominios extracelulares IgV-like de PD-1 y de PD-L1.

Metodología. Debido a que la interacción de PD-1/PD-L1 está mediada por sus dominios extracelulares tipo variable de inmunoglobulina (IgV-like), se diseñaron iniciadores específicos para clonarlos. Una vez clonados, se ligaron al vector de expresión pcDNA6-HisA, cada DNA recombinante se insertó por separado en *Escherichia coli*. Se seleccionaron y verificaron las transformantes mediante Colony-PCR. Con cada una, se realizó una expresión piloto, inducida con IPTG (1mM) el tiempo óptimo de expresión se definió empleando SDS-PAGE al 12%, siguiendo protocolos estándar del LBM.

Resultados. Los amplicones obtenidos en las PCR correspondientes (375pb para el IgV-like de PD-1 y 357pb para el IgV-like de PD-L1), fueron secuenciados, alineados y verificados, obteniendo un 99% de identidad para PD-1 y un 100% para PD-L1, cada secuencia fue registrada en GenBank PD-1 (OM363223) y PD-L1 (OM363224). El análisis de la expresión piloto sugiere el mismo tiempo óptimo en cada caso (4h post-inducción), y también una banda de ~15 kDa, consistente con el peso molecular esperado.

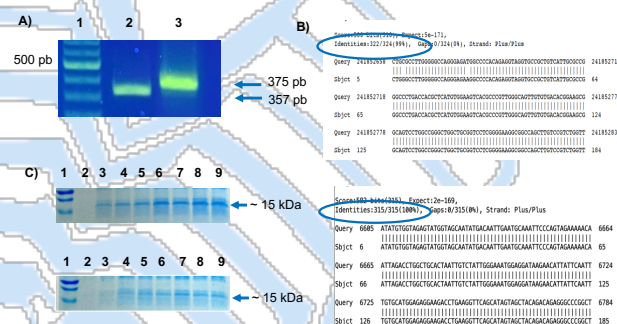


Fig. 1. Clonación y expresión recombinante de los IgV-like de PD-1 y PD-L1. (A): Amplicones de cada IgV-like en gel de agarosa al 2%. Carril 1: Marcador; Carril 2: IgV-like de PD-L1; Carril 3: IgV-like de PD-1. (B): Alineamiento de las secuencias IgV-like de PD-1 (superior), y PD-L1 (inferior), experimentales con las de referencia. (C): Expresión piloto de IgV-like PD-L1 (superior) e IgV-like PD-1 (inferior). Carril 1: Marcador; Carriles del 2 al 9, tiempo en horas post-inducción 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9 respectivamente. Se señala la banda de ~15kDa (SDS-PAGE 12%) esperada.

Conclusiones. Se logró la clonación y expresión recombinante de los dominios extracelulares IgV-like de PD-1 y PD-L1, lo que permitirá contar con una fuente antigénica cuasi-inagotable, para la eventual producción de un MAb, MAb humanizado u otro inmunoterapéutico, algo que aún no se logra en México.

Agradecimiento. Al fondo CB-2014-240185, por el financiamiento de este proyecto.

Bibliografía.

- Wellenstein D, de Visser E. (2018). Cancer-Cell-Intrinsic Mechanisms Shaping the Tumor Immune Landscape. *Immunity*, 48(3), 399-416.
- Borst J, Busselaar J, Bosma M, Ossendorf F. (2021). Mechanism of action of PD-1 receptor/ligand targeted cancer immunotherapy. *European Journal of Immunology*.
- Velcheti V, Schalper A, Carvajal E. (2014). Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Laboratory Investigation*; 94(1):107-16
- Twomey D, Zhang B. (2021). Cancer Immunotherapy Update: FDA-Approved Checkpoint Inhibitors and Companion Diagnostics. *The AAPS Journal*, 23(2), 1-11.