

Generación de un reportero lentiviral para monitorear la expresión de Helios en células T CD8+

Eduardo Magallón Cárdenas, Rosa M. Rubio Robles, José C. Crispín, Florencia Rosetti
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Dpto. de Inmunología y Reumatología

INTRODUCCIÓN

El gen *IKZF2*, miembro de la familia Ikaros, codifica la proteína Helios, que juega un rol como marcador en células T reguladoras (Tregs) provenientes de timo, donde estabiliza la expresión de Foxp3. Por otra parte, se ha observado un aumento en la expresión de Helios en células T CD8+ bajo condiciones de agotamiento, lo que sugiere que éste puede estar involucrado en el desarrollo de este fenómeno. Por medio de un reportero genético, se busca poder cuantificar de manera eficiente la expresión de Helios en células T CD8+, para así desarrollar estrategias de inhibición.

OBJETIVO

Clonación del promotor de *IKZF2* en un plásmido lentiviral y su aplicación en células T CD8+ humanas para el estudio de la expresión de Helios.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

- Localización del promotor del gen *IKZF2* utilizando bases de datos disponibles en línea.
- Selección del sitio de clonación utilizando el mapa del plásmido lentiviral Lego-G.

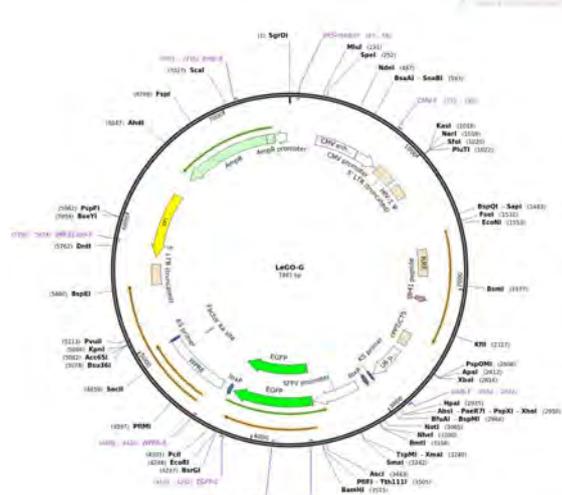


Fig 1: Mapa del plásmido lentiviral con los sitios de restricción para BamHI y XbaI. Fuente: Addgene

- Diseño de los primers necesarios para la amplificación del promotor del gen *IKZF2*, agregando los sitios de restricción correspondientes utilizando herramientas disponibles en línea.

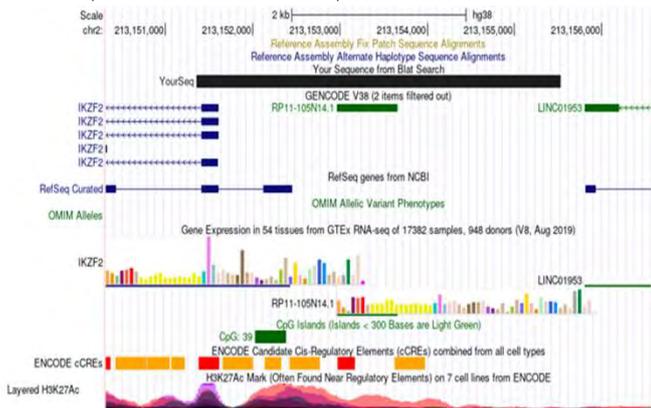


Fig 2: Mapa genómico del gen *IKZF2* enfocado a una zona con alta actividad regulatoria. Fuente: Ensembl.

CLONACIÓN

- Amplificación del promotor del gen *IKZF2* por PCR, utilizando como plantilla DNA genómico de humano, agregando sitios de restricción.

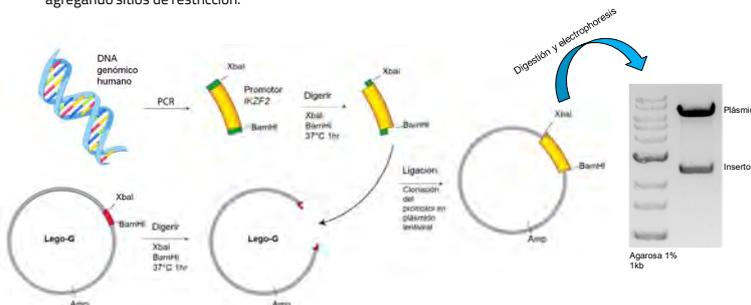


Fig 3: Procedimiento de la clonación del promotor del gen *IKZF2* en el plásmido lentiviral Lego-G. Gel de agarosa mostrando las bandas del inserto y del vector.

GENERACIÓN DE LENTIVIRUS

- Células productoras: **HEK293 T17**
- Plásmidos necesarios: **psPAX2**, **pMD2.G** y **Lego-G con el promotor clonado**.

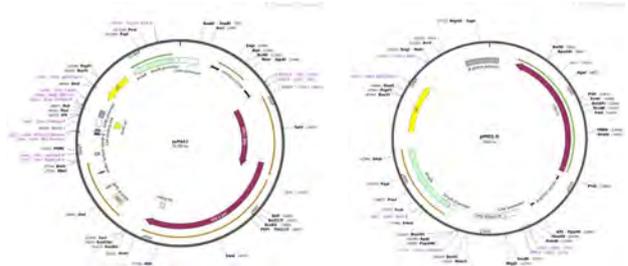


Fig 4: Mapas de los vectores lentivirales psPAX2 (codifica enzimas para replicación y envoltura viral) y pMD2.G (codifica la proteína de envoltura VSV-G). Fuente: Addgene

- Día 0:** se hace la mezcla de Opti-MEM con Lipofectamina y con los tres plásmidos. Se agrega toda la mezcla a las células a transfectar.
- Días 1 y 2:** quitar y agregar medio DMEM a las células
- Días 3 y 4:** recolectar el medio con lentivirus. Filtrar y alicuotar a -80° C.

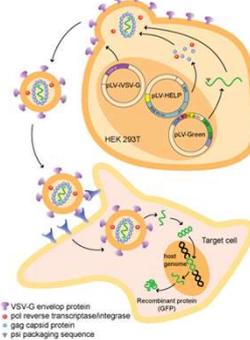


Fig 5: Formación de lentivirus y transducción de una célula, que comienza a expresar GFP.

TRANSDUCCIÓN Y ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T CD8+

- Extracción de células T CD8+ de una muestra de sangre con **ficoll**.

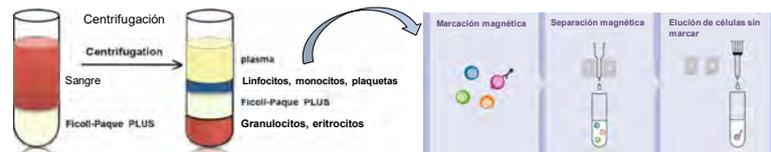


Fig 6: Extracción de PBMCs de una muestra de sangre con ficoll y purificación de células T CD8+ con una columna magnética de afinidad (protocolo Miltenyi Biotec)

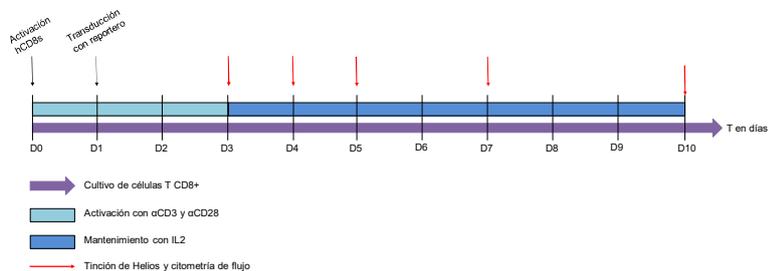


Fig 7: Línea temporal de la activación, transducción y tinción de células T CD8+ humanas.

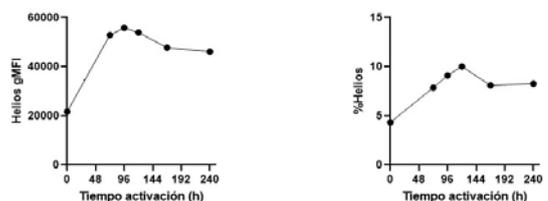


Fig 8: Diagramas de la expresión de Helios a lo largo de diez días. Medido con citometría de flujo.