

## Estudio de la expresión de *VSTM1* en macrófagos humanos y su posible implicación en el desarrollo de cirrosis hepática

Juan Francisco Rodríguez-Alcázar, Ana Tapia-Abellán, María Dolores Fernández-Fernández, Antonio José Ruíz-Alcaraz, Pilar García-Peñarrubia\*, María Martínez-Esparza\*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100, Murcia.

\* correspondencia: pigarcia@um.es, maria@um.es

### Resumen

Uno de los objetivos de este trabajo fue el estudio bibliográfico del gen *VSTM1*, que codifica un receptor inhibitorio recientemente descrito en fagocitos. Para ello se revisó la bibliografía publicada en revistas de investigación científica, así como las secuencias depositadas en las principales bases de datos biológicos disponibles en la red hasta el momento. Los resultados encontrados revelaron que la información depositada en las bases de datos por los diferentes autores era redundante y presentaban una nomenclatura diferente. Tras estudios de alineamiento con diferentes herramientas informáticas, pudimos establecer las equivalencias entre los datos publicados. De las 6 isoformas descritas, generadas por maduración alternativa del ARN, sólo algunas secuencias coincidieron en las bases de datos consultadas. Además, se detectó un error en la notación de la secuencia ACU00108, ya que se tradujo en glicina un codón que codifica para serina.

El siguiente objetivo fue el estudio de la expresión del gen *VSTM1* mediante qRT-PCR en macrófagos peritoneales obtenidos del líquido ascítico de pacientes con cirrosis hepática, y su comparación con los obtenidos para macrófagos de sangre periférica de donantes sanos, como población de referencia. Esta patología se asocia a un incremento de mediadores inflamatorios y podría estar relacionada con la disregulación de algunos de los mecanismos de control del sistema inmunitario. La qRT-PCR realizada con los cebadores diseñados para estudiar las isoformas *VSTM1*-v1 y v2, reveló que éstas se expresan en ambas poblaciones de macrófagos, siendo mayores los niveles de expresión del transcrito que codifica la isoforma proteica de membrana (v1) que la secretada (v2). Además, la expresión génica de *VSTM1*-v1 aumenta con la diferenciación del macrófago. Sin embargo, aunque se aprecia una tendencia hacia una menor expresión en la población de macrófagos de pacientes con cirrosis, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

### Abstract

One of the goals of this work was the bibliography study of the gene *VSTM1*, which encodes an inhibitory receptor recently described on phagocytes. To do this, we reviewed the bibliography from several scientific journals, as well as the sequences that so far now we can find in the main biological databases on the internet. Our results showed that the information available in the different databases was redundant and a different nomenclature was used for unique sequences. Using alignment studies with different bioinformatic tools we established equivalences between the published data. Taking into account the 6 isoforms described, generated by alternative splicing of the RNA, only some of them matched in the data bases revised. Furthermore, we detected a mistake in the sequence ACUU108, where a codon which encodes a serine was translated into glycine.

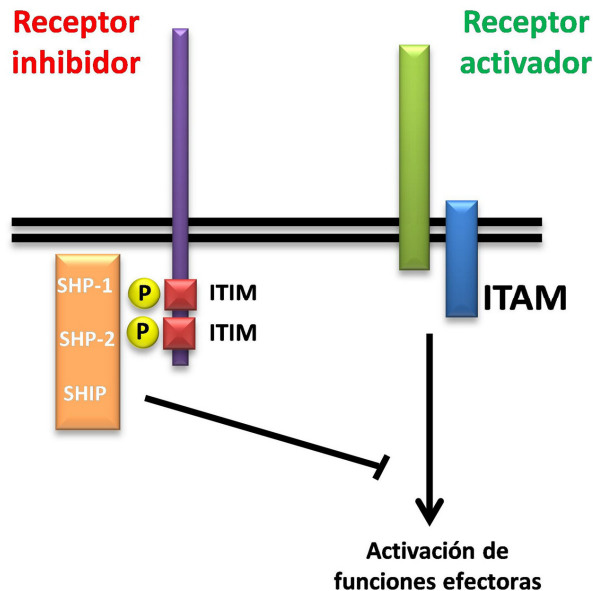
Our next objective was to study the expression profile of the gene *VSTM1*, using qRT-PCR, on peritoneal macrophages obtained from ascitic fluid from patients with hepatic cirrhosis, and compared it with the expression on peripheral blood macrophages from healthy donors, which we used as a referential population. This pathology is related to an increase of inflammatory mediators that could be produced by a dysregulation of some control mechanisms involved in immune response. qRT-PCR performance using specific primers designed for *VSTM1*-v1 and v2, showed that these isoforms were expressed on both macrophage populations, and the level of expression was higher for the transcript which encodes the membrane protein (v1) than for the secreted one (v2). Moreover, we described that gene expression of *VSTM1*-v1 increases during macrophage differentiation. Nevertheless, although a tendency to a lower expression in cirrhotic macrophages was appreciated, this was not statistical significant.

**Palabras clave:** receptor inhibitorio, PCR cuantitativa, líquido ascítico

## Introducción

El sistema fagocítico humano, que incluye neutrófilos, monocitos y macrófagos, cuenta con una serie de mecanismos con los que combatir y eliminar a los patógenos, tales como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), de citocinas y quimiocinas que activan también otras células inmunitarias. Sin embargo, estos mecanismos pueden resultar muy dañinos para el organismo si no se controlan en tiempo e intensidad. Las enfermedades que se caracterizan por una inflamación persistente, como la aterosclerosis o la cirrosis hepática (Tapia-Abellán et al. 2012), son un claro ejemplo de la importancia que tiene la regulación de la síntesis de mediadores inflamatorios en la respuesta inmune.

Uno de los mecanismos por los cuales el sistema inmunitario controla su actuación, es mediante receptores inhibidores (Fig. 1). Los receptores inhibidores cuentan con un motivo de inactivación de inmunoreceptores basados en tirosina (ITIM) en su cola citoplasmática, que presenta la secuencia consenso V/L/I/SxYxxV/L/I (Vivier & Dacron 1997). Mediante la fosforilación de esta tirosina, los receptores inhibidores pueden reclutar fosfatasa, como SHP-1, SHP-2 o SHIP, que desfosforilan moléculas necesarias para las vías de activación, llevando a cabo así su función inhibidora (Ravetch & Lanier 2000). Recientemente se han identificado un gran número de receptores inhibidores en fagocitos (Steevels & Meyaard 2011) y VSTM1 es uno de ellos.



**Figura 1.** Señalización por receptores inhibidores. Los receptores inhibidores poseen en su cola citoplasmática ITIMs cuyas tirosinas son fosforiladas con la unión del ligando. Las tirosinas fosforiladas de los ITIMs reclutan fosfatasa (SHP-1, SHP-2 o SHIP) que inhibirán la señalización por los receptores activadores.

## Material y métodos

### *Obtención de macrófagos derivados de monocitos (M-DM) peritoneales de líquido ascítico (LA)*

El LA se obtuvo en condiciones asépticas mediante paracentesis evacuadora clínicamente indicada y en ningún caso para obtener muestras de estudio de pacientes. Las muestras se obtuvieron en la Unidad Hepática del Hospital General Universitario de Alicante (España) o en la Unidad de Trasplante Hepático del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia (España). El

protocolo de estudio fue aprobado por los comités éticos pertinentes y todos los pacientes fueron informados y consintieron ser incluidos en el estudio.

El contenido celular de la muestra de LA se obtuvo mediante centrifugación de ésta, a 1500 rpm, durante 10 min en botes de capacidad de 600 mL cada uno. Las células obtenidas fueron lavadas y resuspendidas en tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm y se resuspendieron las células en medio DMEM+glutaMAX (GIBCO Invitrogen, Paisley, UK), suplementado con un 10% de STF previamente descomplementado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos y con 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina. Denominaremos este medio posteriormente como MCC (Medio de Cultivo Completo).

Se realizó el conteo celular y se midió la viabilidad utilizando la técnica de exclusión con azul tripano. Previo al cultivo de la muestra se determinó la proporción de los M-DM mediante criterios de tamaño, morfología y expresión de marcadores de superficie específicos por citometría de flujo. Se usó el anticuerpo de ratón anti-humano CD14-FITC (eBioscience, San Diego, CA, USA) y el anticuerpo de ratón IgG1-FITC como isotipo control (BD-Pharmingen, NJ, USA). Una vez conocido el porcentaje de macrófagos peritoneales presentes en la muestra, se sembraron a una concentración  $1-2 \times 10^6$  M-DM/pocillo en placas de 6 pocillos. Tras incubación durante la noche a 37°C, las células se lavaron con MCC para eliminar las células no adherentes. La pureza de M-DM en los cultivos celulares fue mayor al 95%.

#### *Obtención de M-DM de sangre periférica*

Las muestras de sangre de voluntarios sanos se obtuvieron en el Centro de Hemodonación de la Región de Murcia. Estas muestras fueron donadas previo descarte por el Centro al no alcanzar el peso óptimo necesario para su uso, y su extracción no se realizó en ningún caso para obtener muestras de estudio.

La sangre se diluyó con PBS estéril, en proporción 1:1 y se depositaron 35 mL de la mezcla sobre 15mL de Ficoll (Axis-Shield PoC As Oslo, Norway) en tubos Falcon para la separación de la porción linfo-monocítica, que se realizó mediante centrifugación a temperatura ambiente a 2000 rpm durante 20 minutos sin freno. Las células se lavaron con MCC. Se empleó una alícuota de esta suspensión celular para determinar la pureza de los macrófagos de la muestra por citometría de flujo, utilizando el mismo criterio y método que en el apartado anterior. Una vez conocido el porcentaje de monocitos presentes en la muestra, las células se sembraron como se describió en el apartado anterior. Tras incubación durante 24h, se lavaron con MCC para eliminar las células no adherentes y purificar la fracción de M-DM en el cultivo.

#### *Extracción de ARN*

Para la extracción del ARN total de los M-DM se utilizó el kit RNeasy Mini Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ARN extraído se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) midiendo la absorbancia a 260 nm. Se consideró puro aquel ARN cuyo valor del ratio  $A_{260}/A_{280}$  se encontrara entre 1,9 y 2,1. El ARN se almacenó a -80°C hasta su uso.

#### *Síntesis de ADN complementario (ADNc)*

Se partió de 0,6-2 µg de ARN total y se utilizó la transcriptasa inversa *SuperScript II* (Invitrogen) para conseguir un volumen final de 20 µL de ADNc. La síntesis fue llevada a cabo mediante el uso de cebadores oligo(dT), que hibridan con la cola de poli(A) de los ARN mensajeros para comenzar la retrotranscripción.

En un tubo libre de nucleasas se mezcló la muestra de ARN con 1 µL de oligo(dT)<sub>12-18</sub> (500 µg/mL) y 1 µL de una mezcla de dNTPs (cada uno a 10 mM), llevándose hasta un volumen de 12 µL con agua libre de nucleasas. Tras mezclar bien los componentes, se incubó a 65°C durante 5 minutos y se enfrió inmediatamente en hielo. Después se añadieron 7 µL de una disolución madre preparada a partir de cuatro volúmenes de tampón 5x First Strand, dos volúmenes de DTT 0,1 M y un volumen de RNase OUT (40 unidades/ µL). Todos los reactivos fueron suministrados por Invitrogen. Tras mezclar bien todos los reactivos, la mezcla se incubó durante 2 minutos a 42°C y

se añadió 1  $\mu\text{L}$  de la transcriptasa, mezclando bien con la pipeta. Por último se incubó la reacción a 42°C durante 50 minutos, y, tras esto, a 70°C durante 15 minutos.

### *Estudio de la expresión génica mediante PCR cuantitativa (qPCR)*

Para estudiar y cuantificar la expresión del gen *VSTM1* se llevaron a cabo PCRs a tiempo real empleando el equipo *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) utilizando el ADNc previamente sintetizado y los cebadores diseñados (Tabla 1).

**Tabla 1.** Cebadores utilizados para la PCR a tiempo real. Se muestran los cebadores utilizados para amplificar nuestro gen diana, tanto el cebador directo (*VSTM1-R*) como el inverso para la isoforma v1 (*VSTM1-F1*) y para la v2 (*VSTM1-F2*), así como el cebador directo (*GAPDH-F*) como inverso (*GAPDH-R*) para amplificar el gen que utilizaremos como control endógeno. El tamaño se mide en nucleótidos (nt) y la temperatura de fusión es la calculada a través de la aplicación OligoCalc.

Nombre	Secuencia	Tamaño	Temperatura de fusión
<b>VSTM1-F1</b>	5'-GTCTTCATCATCTACAGATGC-3'	21 nt	57.5 °C
<b>VSTM1-F2</b>	5'-CTCAATGAAAACAGGTTTCATC-3'	21 nt	55.4 °C
<b>VSTM1-R</b>	5'- CCGTCGAGAGAGATACCCT-3'	19 nt	58.4 °C
<b>GAPDH-F</b>	5'-CATGTTCCAATATGATTCCACC-3'	22 nt	58.4 °C
<b>GAPDH-R</b>	5'-CCTGGAAGATGGTGATGG-3'	18 nt	56.3 °C

La reacción de PCR se llevó a cabo adicionando en cada uno de los pocillos de una placa de reacción de 96 pocillos MicroAmp Optical (Applied Biosystems) 10  $\mu\text{L}$  de Power SYBR Green PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems), 1  $\mu\text{L}$  de cada uno de los cebadores directo e inverso 1  $\mu\text{M}$  y 4  $\mu\text{L}$  del ADNc. El volumen de reacción se llevó a 20  $\mu\text{L}$  añadiendo agua libre de nucleasas. Los ciclos de PCR fueron una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C seguida de una repetición de 40 ciclos con dos pasos: desnaturalización durante 15 segundos a 95°C, e hibridación y elongación durante un minuto a 60°C. El SYBR Green se unió a la doble cadena de ADN en cada ciclo de amplificación, generando una señal fluorescente que aumentaba con el incremento del número de copias de ADN original. Esta cualidad permitió la generación de curvas de amplificación que, mediante el programa de análisis y recogida de datos 7500 System SDS v2.05, nos proporcionaron los valores a los cuales cada muestra sobrepasa el umbral de fluorescencia (Ct).

Para determinar los niveles de expresión génica de *VSTM1* se utilizó el método comparativo de Ct y conocido como método  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  (Livak & Schmittgen 2001). La expresión de *VSTM1-v1* y *VSTM1-v2* se calculó relativizando los valores de expresión obtenidos por triplicado para cada una de las isoformas con respecto a un gen de expresión constante (control endógeno), que en nuestro caso fue *GAPDH*.

Las muestras de ADNc de *VSTM1-v1* amplificadas anteriormente por PCR cuantitativa se mezclaron en una proporción 5:1 con loading dye 6x (Thermo Scientific) para visualizar el frente de electroforesis y aumentar la densidad de la muestra. El gel se preparó al 1% de agarosa en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM/EDTA 1mM, pH 8,0) y la separación de los fragmentos se produjo al aplicar un voltaje constante de 90 V en una cubeta horizontal de electroforesis que contenía el mismo tampón TAE. Se dispuso una calle con un marcador de 50 pb (50 bp DNA ladder, Invitrogen).

Para visualizar el resultado de la electroforesis se bañó el gel en una disolución 1:3 de bromuro de etidio durante cinco minutos. Luego se observó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta y se tomó una fotografía.

### *Estudio in silico de VSTM1*

Las secuencias génicas y proteicas que se utilizaron durante el estudio *in silico* de *VSTM1* en este trabajo fueron obtenidas de la base de datos de secuencias génicas GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), las bases de datos de secuencias proteicas, Protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) y Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), y el visor genómico Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Para realizar la comparación de las secuencias génicas y proteicas de VSTM1, éstas se alinearon utilizando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del NCBI.

Las secuencias de los cebadores diseñados se introdujeron en la aplicación OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>) para estudiar sus características y comprobar que no formaban estructuras secundarias ni hibridaban entre ellos.

### *Tratamiento estadístico de los datos*

Para la representación gráfica de los resultados y el tratamiento estadístico de los datos, se empleó el programa *GraphPad Prism versión 5.00* para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

En los diagramas de barras y en los de puntos conectados, se representó el valor medio de los datos y el error estándar de la media de ensayos realizados por triplicado. En los diagramas de cajas, la parte superior e inferior de la caja se corresponde con el percentil 25 y 75 respectivamente y la banda dentro de la caja se corresponde con el percentil 50, es decir, la mediana. Las líneas verticales que sobresalen de la caja, denominadas bigotes, se extienden respectivamente hasta el valor mínimo y máximo del conjunto de datos, siempre que estos valores no difieran en más de una vez y media del IQR.

La significación estadística fue calculada mediante un test t de muestras no pareadas. Los valores de probabilidad (P) por debajo de 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

## **Resultados y discusión**

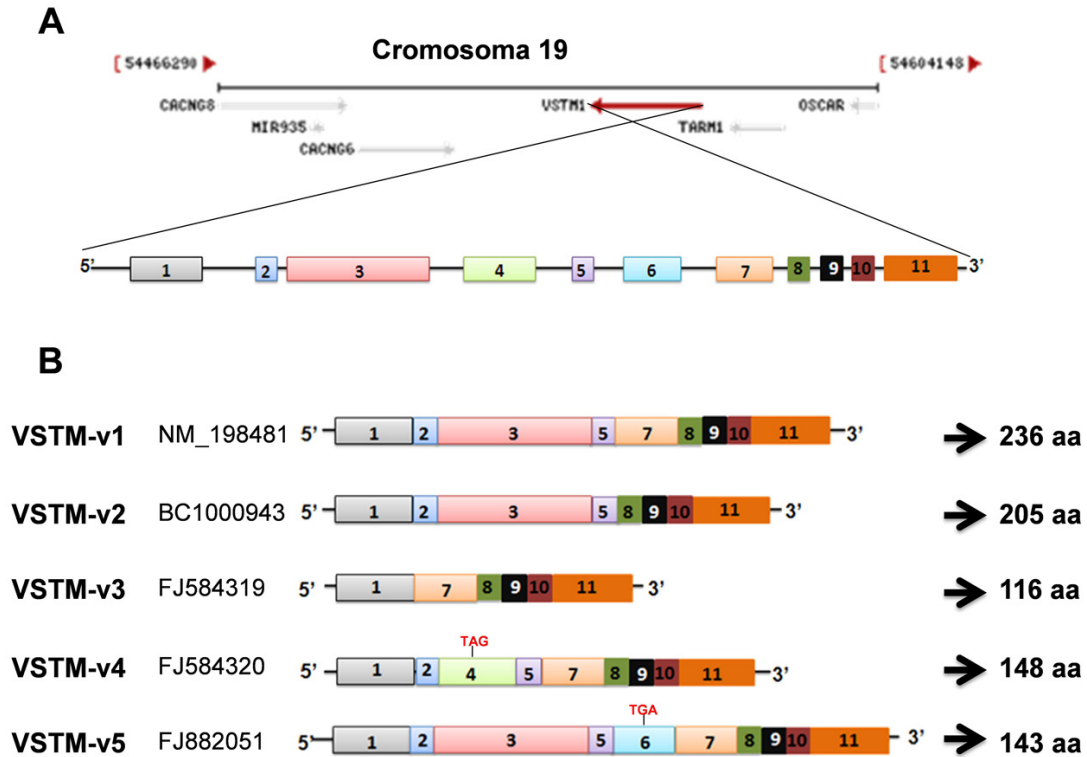
### *Estudio bibliográfico de VSTM1*

VSTM1 (V-set and transmembrane domain containing 1) fue por primera vez descrito como gen codificante del receptor inhibitor en neutrófilos y fagocitos humanos S1RL-1 (Signal Inhibitory Receptor on Leukocytes-1) (Steevels et al. 2012). Este gen tiene una secuencia de alrededor de 23.1 kb y se localiza en humanos en el cromosoma 19 (19q13.4) (Fig. 2). Más tarde, el grupo chino liderado por Han, describió que el transcrito primario de VSTM1 podía ser procesado de al menos 5 formas diferentes a las que nombró VSTM1-v1, -v2, -v3, -v4 y -v5 (Fig. 2).

VSTM1-v1 daba nombre a la proteína ya descrita por el grupo liderado por Meyaard, S1RL-1. Se trata de una proteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas y que tiene una secuencia de 236 aminoácidos, que son codificados por 9 exones. VSTM1-v1 se considera la secuencia canónica y su expresión se ha descrito en células mieloides, pero no en linfoides. Además, esta expresión se modula tras estimulación con agonistas de TLRs (Steevels et al. 2012). Esta proteína actúa como receptor inhibitor por medio de los dos ITIMs que presenta en su cola citoplasmática, que les permite inhibir la formación de ROS (Steevels et al. 2013), la desgranulación mediada por FcεR, así como la producción de citoquinas proinflamatorias en monocitos y neutrófilos estimulados (Steevels et al. 2012).

El transcrito de VSTM1-v2 carece del exón 7, que codifica una hélice transmembrana, y genera una proteína soluble de secreción de 205 aminoácidos. VSTM1-v2 se expresa principalmente en tejidos y células del sistema inmunitario y se le han atribuido funciones proinflamatorias, promoviendo *in vitro* la diferenciación y activación de células T CD4+ vírgenes a células TH17.

El transcrito de VSTM1-v3, que carece de los exones del 2 al 6, codificaría una proteína de 116 aminoácidos. Sin embargo, no hay evidencias de si el ARNm de VSTM1-v3 es correctamente traducido o de si la proteína, si existiese, fuera correctamente transportada a la membrana celular. VSTM1-v4 y v5 presentan un exón más que el transcrito de la isoforma canónica, que los dota de un codón de fin de la transcripción, lo que sugiere que estos ARNs no son codificantes y son destruidos mediante el mecanismo NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay).



**Figura 2.** Estructura génica y transcritos del gen *VSTM1*. (A) Estructura génica del gen *VSTM1* donde se muestra su localización cromosómica y sus once exones. (B) Se muestran los 5 transcritos descritos por Guo y colaboradores para *VSTM1* con su código de entrada en GenBank y el número de aminoácidos que tendrían las proteínas a las que codificarían.

Tras el estudio bibliográfico referente a *VSTM1*, se observó que cada uno de los autores utilizaba un código diferente para referirse a las secuencias génicas y proteicas de *VSTM1*. Mientras que el grupo liderado por Meyaard hacía referencia al transcrito de *SIRL-1* con el identificador del NCBI GI:145580633 (Steevels et al. 2012), el grupo de Han se refería a éste con el número de acceso de GenBank NM\_198481 (Guo et al. 2012). Además, para hablar de la secuencia proteica, Meyaard utilizaba el número de acceso de la base de datos Protein NP\_940883 (Steevels et al. 2012), mientras que Han utilizaba el código NM\_198481 depositado en esta misma base de datos (Guo et al. 2012). Con el fin de poder trabajar con la secuencia génica y proteica de *VSTM1* se decidió, en primer lugar, llevar a cabo un estudio bioinformático para aunar toda la información referente a las secuencias de *VSTM1* en las principales bases de datos biológicas.

### *Búsqueda in silico de secuencias génicas*

En GenBank se encontró una entrada para la secuencia génica de *VSTM1*. Esta secuencia está depositada bajo el código de acceso NC\_000019 y corresponde a una secuencia de ADN humano de 59128983 pares de bases.

Haciendo una búsqueda análoga en el visor Ensembl se vio que existían 9 entradas para el gen *VSTM1* (ENSG00000189068, ENSG00000267926, ENSG00000268252, ENSG00000268616, ENSG00000268974, ENSG00000269061, ENSG00000269270, ENSG00000269330, ENSG00000269357). Cada una de estas nueve entradas contenía una secuencia de ADN para este gen, las secuencias de seis transcritos diferentes y la de las 6 proteínas que éstos codifican. Mediante el alineamiento de estas secuencias se comprobó que las nueve diferentes entradas contenían la misma secuencia de ADN, la misma secuencia de transcritos y de proteínas.

Además, todas estas secuencias eran igual a la que se registraba en GenBank con el código NC\_000019.

### Búsqueda in silico de secuencia de transcritos

Se comprobó que las entradas de GenBank a la que el grupo de Meyaard y de Han se referían a la hora de hablar del transcrito de SIRT1 y de VSTM1-v1, respectivamente, eran la misma, siendo GI:145580633 el identificador de la entrada y NM\_198481 el número de acceso.

Además, en GenBank se encontraban 4 entradas más para ARNs mensajeros de VSTM1. Estas entradas se correspondían con la secuencia del transcrito para VSTM1-v2 (BC100943), v3 (FJ584319), v4 (FJ584320), y v5 (FJ882051) descritas por Guo y colaboradores (Guo et al. 2012).

Mediante alineamientos de secuencia quisimos conocer si estas secuencias coincidían con las depositadas en Ensembl. Tan solo una de ellas (ENST00000338372) mostró la misma secuencia que la depositada en GenBank (NM\_198481). Ver Tabla 2 para tener una información resumida.

**Tabla 2.** Secuencias de transcritos de *VSTM1* en bases de datos genéticas. Se muestran los códigos de todas las secuencias de transcritos del gen *VSTM1* descritos en las bases de datos GenBank y en el visor génico Ensembl. La columna identidad indica si las entradas de las secuencias de la misma fila coinciden en su totalidad (Sí) o no lo hacen (No). También se muestra qué códigos han sido descritos por el grupo de W. Han y por el de L. Meyaard.

GenBank (NCBI)		Ensembl (EMBL-EBI)	Identidad
W. Han	L. Meyaard		
NM_198481	GI:145580633	ENST00000338372	Sí
BC100943		ENST00000376626	No
FJ584319		ENST00000419106	No
FJ584320		ENST00000366170	No
FJ882051		ENST00000425006	No
		ENST00000447872	No

**Tabla 3.** Secuencias de proteínas de *VSTM1* en bases de datos genéticas. Se muestran los códigos de todas las secuencias de proteínas del gen *VSTM1* descritas en las bases de datos GenBank y en el visor génico Ensembl. La columna identidad indica si las entradas de las secuencias de la misma fila coinciden en su totalidad (Sí) o no lo hacen (No). También se muestra qué códigos han sido descritos por el grupo de W. Han y por el de L. Meyaard.

Protein (NCBI)		Ensembl (EMBL-EBI)	Uniprot (EMBL-EBI)	Identidad
W. Han	L. Meyaard			
ACU00108.1	NP_940883	ENSP00000343366	Q6UX27-1	Sí
ACU00110.1		ENSP00000365813	Q6UX27-2	Sí
ACU00111.1		ENSP00000409412		No
ACU00112.1		ENSP00000444153		No
ACZ51446.1		ENSP00000413006		No
		ENSP00000401926	Q6UX27-3	Sí

### Búsqueda in silico de secuencias proteicas

En la base de datos Protein existen seis entradas para VSTM1. Cinco de estas entradas fueron descritas por Han como las distintas isoformas de VSTM1: VSTM1-v1 (ACU00108), v2 (ACU00110), v3 (ACU00111), v4 (ACU00112), v5 (ACZ51446) (Guo et al., 2012). La otra entrada es la utilizada por el grupo de Meyaard para referirse a SIRT1 (NP\_940883).

En el visor Ensembl también existen 6 entradas para proteínas de VSTM1. Cada una de estas secuencias proviene de la traducción de la secuencia de ARNm correspondiente y tienen los códigos: ENSP00000343366, ENSP00000365813, ENSP00000409412, ENSP00000444153, ENSP00000413006, ENSP00000401926.

En UniprotKB/Swiss-Prot están depositadas tres secuencias revisadas que hacen referencia a tres isoformas de VSTM1: isoforma 1 (Q6UX27-1), 2 (Q6UX27-2) y 3 (Q6UX27-3).

Mediante alineamientos de secuencia comprobamos que ACU00108 y NP\_940883 de GenBank y Q6UX27-1 en UniProtKB/Swiss-Prot y ENSP00000343366 de Ensembl eran la misma secuencia. Sin embargo, se detectó un error en la notación de ACU00108. En la traducción del ARNm, un codón que codifica para serina se tradujo en glicina. También se comprobó que las entradas ACU00110, ENSP00000365813 y Q6UX27-2 describían la misma secuencia, así como lo hacían ENSP00000401926 y Q6UX27-3, sin existir un alineamiento total para las demás.

VSTM1-v1 cuenta, además, con un código CCDS (Consensus CDS), donde se reúne información sobre su secuencia génica y proteica: CCDS12872. Ver Tabla 3 para tener una información resumida.

### *Diseño de cebadores para amplificar VSTM1-v1 y v2 mediante PCR cuantitativa*

Tras comprobar en la bibliografía que las isoformas más expresadas en células del sistema inmune eran VSTM1-v1 y 2, se decidió centrar nuestro estudio en ellas. Para la amplificación de VSTM1-v1 y 2 se diseñó un único cebador inverso (VSTM-R) que hibridaba entre los exones 10 y 11, que se encuentran seguidos en los transcritos de ambas isoformas. Para VSTM1-v1 se diseñó un cebador directo (VSTM-F1) que hibridaba en el exón 7, no presente en el transcrito de la isoforma v2, cuyo cebador directo (VSTM-F2) hibridaba entre los exones 5 y 8, que se encuentran seguidos en el transcrito de esta isoforma. Las secuencias de los cebadores, así como el tamaño que tienen y su temperatura de fusión se muestran en la Tabla 1.

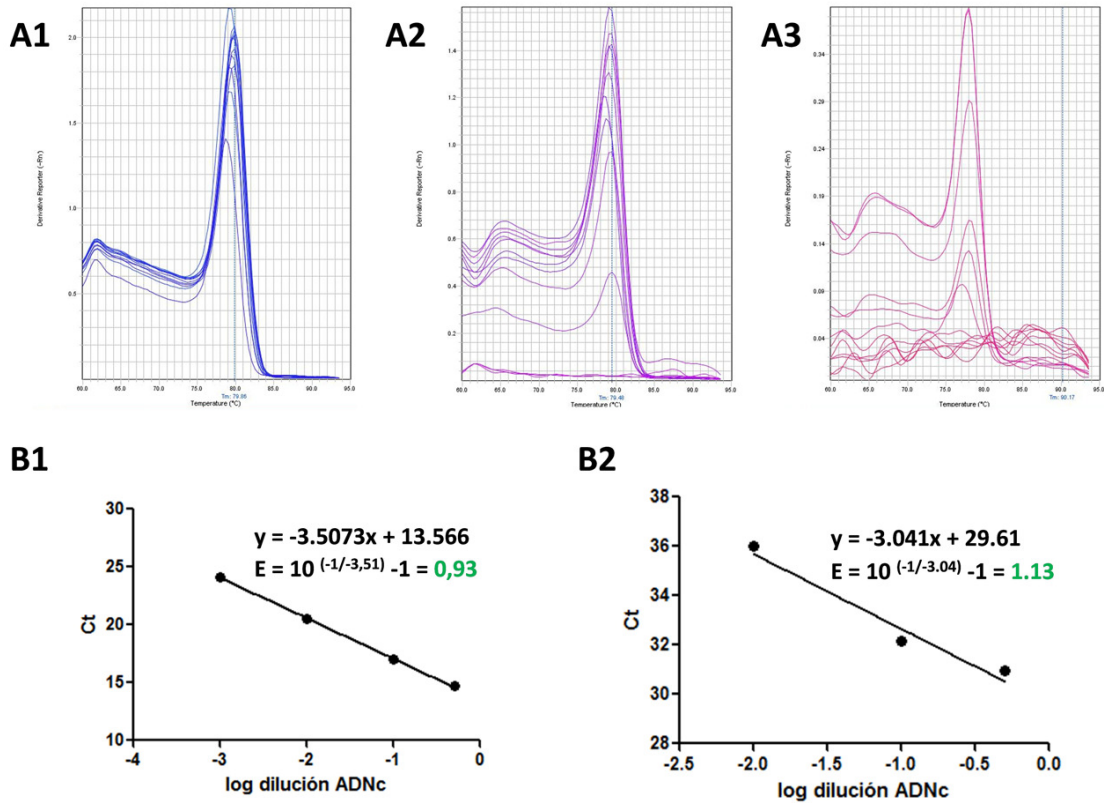
### *Validación del método de los $\Delta\Delta Ct$*

Para que el cálculo de los  $\Delta\Delta Ct$  sea válido, es necesario que las eficiencias de amplificación del gen diana y la del control endógeno sean similares. De esta forma descartamos que las diferencias en la expresión del gen sean debidas en realidad a diferencias en las eficiencias de los distintos procesos de PCR. El método que se utilizó para asegurar que la replicación de los amplicones tenía lugar con la misma eficiencia fue el de estudiar la variación de  $\Delta Ct$  con la dilución del ADNc muestra. Para ello se realizó una PCR cuantitativa partiendo de ADNc obtenido de M-DM de LA en condiciones basales a una dilución 1:2, 1:10, 1:100 y 1:1000, amplificando, por triplicado, a GAPDH, VSTM1-v1 y VSTM1-v2.

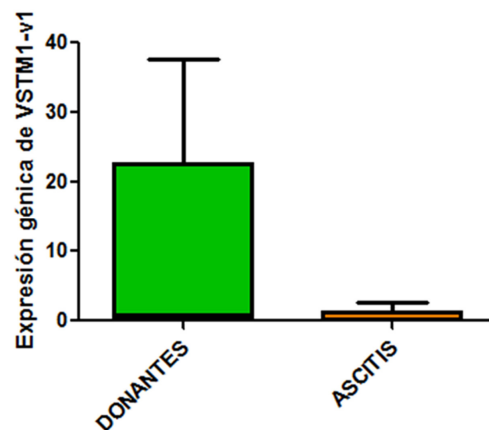
Los valores de  $\Delta Ct$ , obtenidos de la diferencia de los valores de Ct para el gen de interés (VSTM1-v1 o VSTM1-v2) y los valores de Ct para el control endógeno (GAPDH), se representaron frente al logaritmo de la dilución del ADNc. Para VSTM1-v1 el valor absoluto de la pendiente de la recta resultante, fue cercano a cero. Esto significa que las eficiencias del gen de interés y el control endógeno fueron similares (Fig. 3), y el cálculo de  $\Delta\Delta Ct$  para la cuantificación relativa del gen de interés pudo ser usado. Además, la curva de disociación de VSTM1-v1 mostró un solo pico a la temperatura esperada para el amplicón, lo que indicó que los cebadores que se diseñaron estaban amplificando específicamente el gen de interés. Sin embargo, para VSTM1-v2, solo se consiguieron obtener los valores de Ct para las muestras menos diluidas (1:2 y 1:10) y éstos fueron muy elevados (34,6 y 37,4, respectivamente), lo que indicaba que la expresión de VSTM1-v2 en nuestra población es muy baja, y menor a la de VSTM1-v1. La curva de disociación para VSTM1-v2 también mostró un solo pico a la temperatura esperada para el amplicón generado, pero debido a las Ct tan altas obtenidas con diluciones pequeñas, no fue posible validar el método para VSTM1-v2.

Para asegurar que mediante la PCR cuantitativa se estaba amplificando específicamente el transcrito que codifica para la isoforma v1, se corrió un gel de agarosa cargando una de las muestras provenientes de la amplificación por qPCR. Tras analizar el gel, se observó una sola banda para la muestra de VSTM1-v1 con el tamaño del amplicón esperado, lo que verificaba el funcionamiento de los cebadores que habíamos diseñado y que VSTM1-v1 se estaba amplificando específicamente.





**Figura 3.** Curvas de disociación y cálculo de eficiencia. Se muestran las curvas de disociación de la qPCR con diluciones 1:2, 1:10, 1:100 y 1:1000 de ADNc para GAPDH (A1), VSTM1-v1 (A2) y VSTM1-v2 (A3). También se muestran las rectas obtenidas al representar los valores de Ct para GAPDH (B1) y VSTM1-v1 (B2) tras realizar una qPCR con ADNc a dilución 1:2, 1:10, 1:100 y 1:1000. Los datos se ajustaron mediante regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados teniendo en cuenta triplicados en cada medida. Mediante la pendiente de las rectas se calculó la eficiencia de amplificación para cada gen.



**Figura 4.** Cinética de la expresión de VSTM1 en donantes. Se midió la expresión génica de VSTM1 en M-DM de sangre periférica de un donante sano en cultivo tras de 6 y 24 horas. La muestra de tiempo 6 horas es el dato de referencia, y se le asigna el valor 1. Se representa la media y el error estándar de la media.

### *Estudio de la cinética de expresión de VSTM1 en M-DM de sangre de donantes sanos en condiciones basales*

Se decidió estudiar la cinética de expresión de VSTM1 en nuestras muestras. Para ello se realizó una PCR cuantitativa utilizando el ADNc de M-DM de sangre de un donante sano tras 6 y 24 horas en cultivo.

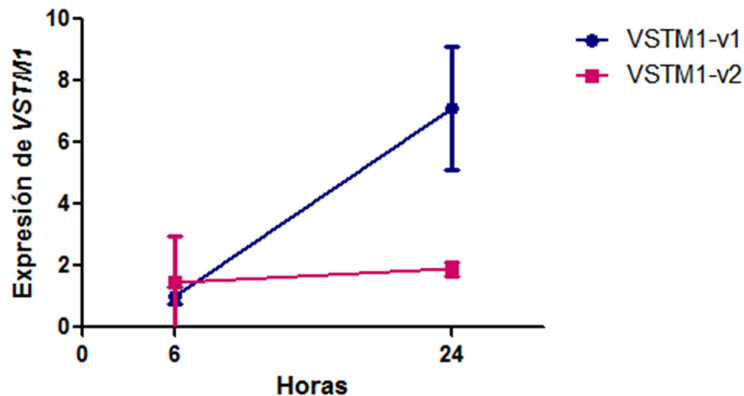
Los resultados de expresión génica, tanto de VSTM1-v1 como de VSTM1-v2, fueron representados en un diagrama de puntos. Se observó que, mientras que la expresión de VSTM1-v2 parecía no variar entre 6 y 24 horas, la de VSTM1-v1 era considerablemente mayor a las 24 horas de cultivo, aumentando con el grado de diferenciación de los macrófagos (Fig. 4).

### *Estudio de la expresión de VSTM1-v1 en M-DM de sangre periférica de donantes sanos y de la de pacientes con cirrosis hepática*

Debido a los bajos niveles de expresión de la isoforma VSTM1-v2 que se obtuvieron en las muestras, el estudio comparativo en las dos poblaciones se centró en la isoforma v1.

Se llevaron a cabo PCRs cuantitativas utilizando un total de tres muestras de donantes y otras tres de LA diferentes. Cada medida se realizó por triplicado, y los resultados fueron representados en un diagrama de cajas, analizándose estadísticamente las diferencias entre grupos mediante un test t de datos no pareados.

Como se muestra en la Figura 5, los resultados para las muestras de donantes se distribuyeron de manera muy heterogénea, dando lugar a una amplia caja en el diagrama. Los resultados de las muestras de pacientes con cirrosis, al contrario, se distribuyeron más homogéneamente mostrando valores más bajos de expresión. Los resultados, sin embargo, mostraron que no existen diferencias significativas en la expresión de VSTM1-v1 entre las dos poblaciones de M-DM ( $P=0,0799$ ). Es necesario ampliar el número de muestras para confirmar estos datos y descartar la existencia de diferencias entre ambos grupos.



**Figura 5.** Expresión génica de VSTM1-v1 en donantes y ascitis. Los datos representan la mediana y la distribución de los resultados para la expresión génica de VSTM1-v1 en M-DM de sangre periférica de donantes sanos (DONANTES) (N=3) y de LA de pacientes con cirrosis hepática (ASCITIS) (N=3) en cultivo durante 24 horas.

## Conclusiones

Tras nuestro estudio se ha logrado poner orden en las secuencias génicas y proteicas referentes a VSTM1 que nos ofrecen las distintas bases de datos biológicos. Concluimos que VSTM1 se expresa en M-DM de sangre periférica de donantes sanos y de LA de pacientes con cirrosis, y que además durante la diferenciación in vitro de los mismos, se redirige selectivamente la formación del

transcrito hacia aquel que da origen a la isoforma v1. Sin embargo, parecen no existir diferencias significativas en la expresión de VSTM1-v1 en las dos poblaciones estudiadas.

### **Agradecimientos**

Agradecemos a la Unidad de Trasplante Hepático del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia y al Centro de Hemodonación de la Región de Murcia la cesión de las muestras biológicas. Este estudio ha sido financiado por el proyecto 11926/PI/09 de la Fundación Séneca. Ana Tapia-Abellán es becaria de la Fundación Séneca (12302/FPI/09), Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, y Juan Francisco Rodríguez-Alcázar becario de colaboración de la Universidad de Murcia.

### **Referencias**

- Guo X, Zhang Y, Wang P, Li T, Fu W, Mo X, Shi T, et al. 2012. VSTM1-v2, a novel soluble glycoprotein, promotes the differentiation and activation of Th17 cells. *Cellular Immunology* 278 (1-2): 136–142.
- Livak KJ & Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25 (4): 402–408.
- Ravetch JV & Lanier LL. 2000. Immune inhibitory receptors. *Science* 290 (5489): 84–9.
- Steevels TAM & Meyaard L. 2011. Review Immune inhibitory receptors: Essential regulators of phagocyte function. *European Journal of Immunology* 41 (3):575-87.
- Steevels TAM, Lebbink RJ, Geertje HA, Coffey PJ & Meyaard L. 2012. Signal Inhibitory Receptor on Leukocytes-1 Is a Novel Functional Inhibitory Immune Receptor Expressed on Human Phagocytes. *Journal of Immunology* 184 (9):4741-8.
- Steevels TAM, Avondt KV & Westerlaken GHA. 2013. Signal inhibitory receptor on leukocytes-1 (SIRL-1) negatively regulates the oxidative burst in human phagocytes. *European Journal of Immunology* 43 (5):1297-308.
- Tapia-Abellán A, Martínez-Esparza M, Ruiz-Alcaraz AJ, Hernández-Caselles T, Martínez-Pascual C, Miras-López M, Such J, et al. 2012. The peritoneal macrophage inflammatory profile in cirrhosis depends on the alcoholic or hepatitis C viral etiology and is related to ERK phosphorylation. *BMC immunology* 13 (42):1186-1471.
- Vivier E & Dacron M. 1997. Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Viewpoint Immunology Today* 18 (6):286-291.