

Sobreexpresión de la tetraspanina CD9-GFP como estrategia de seguimiento y caracterización de vesículas extracelulares derivadas de células humanas

Overexpression of the tetraspanin CD9-GFP as a strategy for tracking and characterizing extracellular vesicles derived from human cells

David Hernández¹ y Gustavo Salguero¹

Resumen

Las vesículas extracelulares (EV) son nanoestructuras cruciales en la comunicación celular y su estudio es de gran interés en la investigación biomédica. En este estudio se desarrolló una metodología para caracterizar las vesículas extracelulares mediante la sobreexpresión de la tetraspanina CD9 fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP) en fibroblastos humanos MRC-5. La eficiencia de la transducción lentiviral en las células MRC-5 superó el 95 %, lo que aseguró una alta expresión de CD9-GFP. La localización perinuclear de CD9-GFP sugiere su participación en la formación de EV y cuerpos multivesiculares (MVB). La cuantificación de transcriptos de CD9 y ALIX confirmó un aumento en la fluorescencia de las EV, lo que permitió su identificación y caracterización con citometría de flujo. Esta metodología facilita el seguimiento y la caracterización reproducible de EV humanas. Además, la expresión constitutiva de CD9-GFP reduce el ruido de fondo en las mediciones y simplifica la inmunocaptura de EV, potencialmente elimina la necesidad de un segundo anticuerpo para su visualización. En resumen, este estudio sienta las bases para investigaciones futuras sobre el papel de CD9 en la biogénesis de EV y su aplicabilidad en la investigación biomédica, lo que ofrece una herramienta valiosa para el estudio de estas nanoestructuras esenciales en la comunicación celular.

Créditos

Autores

¹ Unidad de Terapias Avanzadas, Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud (IDCBIS), Bogotá, Colombia.

Cómo citar:

Hernández, D. & Salguero, G. (2023). Sobreexpresión de la tetraspanina CD9-GFP como estrategia de seguimiento y caracterización de vesículas extracelulares derivadas de células humanas. *Ingeciencia*, 8, 90-100.

Palabras claves: vesículas extracelulares, citometría de flujo, tetraspanina, transducción lentiviral.

Abstract

EVs are crucial nanostructures in cellular communication, and their investigation holds significant interest in biomedical research. In this study, a methodology was developed to characterize extracellular vesicles (EVs) through the overexpression of tetraspanin CD9 fused with green fluorescent protein (GFP) in MRC-5 human fibroblasts. The efficiency of lentiviral transduction in MRC-5 cells exceeded 95%, ensuring high CD9-GFP expression. The perinuclear localization of CD9-GFP suggests its involvement in EV and multivesicular body (MVB) formation. Quantification of CD9 and ALIX transcripts confirmed an increase in EV fluorescence, enabling identification and characterization via flow cytometry. This methodology simplifies the reproducible tracking and characterization of human EVs. Furthermore, constitutive CD9-GFP expression reduces background noise in measurements and streamlines EV immunocapture, potentially eliminating the need for a second antibody for visualization. In summary, this study lays the foundation for future research on the role of CD9 in EV biogenesis and its applicability in biomedical research, providing a valuable tool for the study of these essential nanostructures in cellular communication.

Keywords: Extracellular Vesicles, Flow Cytometry, Tetraspanin, Lentiviral Transduction.

1. Introducción

Las vesículas extracelulares (EV) son nanoestructuras esféricas rodeadas de bicapas lipídicas que son liberadas por cualquier tipo celular y, además, desempeñan un papel fundamental en la comunicación celular. Desde su descubrimiento en la década de 1950, las EV han suscitado un creciente interés científico debido a su participación en una amplia variedad de procesos biológicos (Bazzan *et al.*, 2021). Estos procesos comprenden desde la regulación de la homeostasis celular hasta la influencia en desafíos patológicos como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y las enfermedades autoinmunes. Otra característica sobresaliente de las EV es su capacidad para transportar una amplia variedad de biomoléculas, incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos codificantes (ARNm), así como reguladores (micro-ARN) (Burnouf *et al.*, 2023;

Yáñez-Mó *et al.*, 2015). Lo anterior lo realiza de manera eficiente, protege el cargo de posible degradación enzimática y genera efectos en las células receptoras. Este atributo, junto con su baja inmunogenicidad, baja toxicidad y presencia en varios fluidos corporales humanos, ha suscitado un creciente interés en el campo biomédico, donde las EV se perfilan como candidatas prometedoras para actuar como nanotransportadores de biofármacos y vacunas (Fernández-Delgado *et al.*, 2020; Popowski *et al.*, 2022).

Las EV se dividen en tres categorías principales según su tamaño y biogénesis: exosomas, microvesículas (MV) y cuerpos apoptóticos. A pesar de los avances en la comprensión de los mecanismos moleculares y la formación de EV, la caracterización completa de las rutas de formación de los diversos subtipos de EV sigue siendo un área de investigación activa, donde aún persiste la falta de una caracterización completa de las rutas de formación de los diferentes subtipos de EV. En este contexto, el complejo de clasificación endosómica necesario para el transporte (ESCRT) y proteínas asociadas como ALIX (también conocida como PCD6IP) ha sido ampliamente estudiado debido a su papel esencial en varias etapas de la formación de exosomas y microvesículas (Ju *et al.*, 2021). Las tetraspaninas CD9, CD81 o CD63 son proteínas presentes en las membranas de las EV y son utilizadas como marcadores por diversas técnicas, incluida la citometría de flujo. Sin embargo, también se ha observado que estas tetraspaninas participan en la selección, inclusión, regulación y empaquetamiento de las biomoléculas al interior de las EV. En este proceso, las tetraspaninas, como CD9, desempeñan un papel crucial al formar un complejo con la sintetina, lo que facilita el reclutamiento de las proteínas de carga (Mathieu *et al.*, 2021). Por su naturaleza constitutiva en la estructura del componente vesicular, las CD9 tiene el potencial de usarse para optimizar el aislamiento y caracterización de EV para posteriores aplicaciones en biomedicina. Teniendo en cuenta que los rangos de tamaño de exosomas y las microvesículas pueden estar entre los 50 y los 1000 nanómetros, se requieren técnicas de microscopía electrónica de emisión o de barrido para observar su estructura, o técnicas como el análisis de seguimiento de partículas (*nano tracking analysis*) para determinar tamaño y concentración. Estas técnicas son costosas y no siempre están al alcance de la mayoría de los laboratorios, lo que dificulta establecer ensayos de medición de EV reproducibles entre los diferentes grupos de investigación que trabajan con microvesículas y exosomas. Por otro lado, la citometría de flujo es una técnica de laboratorio mucho más asequible, que permite caracterizar el tamaño, la cantidad y la concentración de EV utilizando la tetraspaninas como marcadores de superficies (Jia *et al.*, 2022; Tiwari *et al.*, 2021).

Este estudio se enfoca en el desarrollo de una metodología basada en la transducción de la proteína recombinante que codifica la tetraspanina CD9 fusionada a una proteína fluorescente verde (GFP) en fibroblastos humanos (CLM), MRC-5, con el propósito de enriquecer estas proteínas en las membranas de EV, lo que favorece su detección mediante citometría de flujo. Esta investigación tiene el potencial de influir

en la modulación del contenido de EV y el desarrollo de métodos optimizados para la identificación de EV.

2. Metodología

En el marco de esta investigación, se desarrolló una línea celular MRC-5 con una expresión constitutiva de la tetraspanina CD9. Esta modificación se llevó a cabo mediante el uso de un constructo de ADN recombinante, el cual codifica una proteína que fusiona la tetraspanina CD9 con una proteína verde fluorescente (GFP), lo que permitió una visualización y seguimiento efectivo durante la investigación. Esta proteína recombinante fue previamente clonada en un plásmido lentiviral para lograr una expresión continua de la proteína de interés. Por otra parte, las células MRC-5, adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC), se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su empleo y se cultivaron en un medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB) y un 1 % de penicilina/estreptomicina a 37 °C bajo una atmósfera de 5 % de CO₂. El cambio de medio se efectuó cada tres días y se realizaron pases celulares cuando se alcanzó una confluencia del 90 %.

En una etapa posterior, se generaron partículas lentivirales que contenían el constructo con la proteína recombinante CD9-GFP, utilizando células HEK293. Luego, se infectaron 100 000 células MRC-5 con 800 000 partículas lentivirales. Transcurridas 24 horas, se procedió al reemplazo del medio celular por uno fresco. La eficiencia de transducción se determinó mediante la medición del porcentaje de fluorescencia utilizando citometría de flujo. Cuando se logró una eficiencia de transducción superior al 80 %, se prosiguió con el aislamiento de las vesículas extracelulares (EV).

Para evaluar el efecto de la transducción del CD9-GFP en el incremento de la expresión de CD9, se llevó a cabo la cuantificación relativa de los transcriptos de ARNm que codifican la tetraspanina CD9. Este proceso implicó la extracción de ARN total de las células después de la transducción con las partículas. Para la extracción de ARN se empleó un kit comercial de extracción de ARN total basado en columnas de Invitrogen. La transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR) se llevaron a cabo utilizando el kit Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit de New England Biolabs Inc. Se diseñaron *primers* específicos para anillar en la región codificante del gen CD9. Además, se incluyó un gen constitutivo, como B2M, para la cuantificación relativa de la expresión génica mediante el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

En lo que respecta al aislamiento de las EV, se procedió al cambio del medio de cultivo de las células transducidas, el cual estaba privado de suero fetal bovino (SFB). Después de 48 horas, se cosecharon las vesículas extracelulares de los medios condicionados a través de una serie de centrifugaciones seriadas destinadas a eliminar restos celulares y enriquecer la suspensión vesicular. La medición de EV se llevó a cabo por citometría

de flujo utilizando un citómetro de espectro completo (Northern Lights, Cytek). Se realizó una medición directa tomando 400 μ l de cada una de las fracciones, microvesículas y exosomas, de las EV aisladas de las células MRC-5 transducidas con la proteína recombinante CD9-GFP y de las EV aisladas de células sin transducir. De igual forma, se realizó un ensayo de inmunocaptura con el kit ExoStepTM de Immunostep (Salamanca, España). Este kit contiene una solución con perlas fluoromarcadas en cuya superficie se inmovilizaron anticuerpos antitetraspaninas CD9. Estas perlas se incubaron con marcadores de tetraspaninas CD81 fluoromarcados durante 30 minutos a una temperatura de 4 °C. Finalmente, para la visualización y conteo de las EV y las microesferas se utilizó el software Spectroflo® y el análisis estadístico se efectuó con el paquete estadístico GraphPad®.

3. Resultados

Un incremento de la concentración de tetraspaninas en el interior de las células podría favorecer la formación de los microdominios lipídicos o balsas lipídicas en las membranas endosomal y plasmática descritas como paso necesario para la formación tanto de microvesículas como de los cuerpos multivesiculares que liberan los exosomas en la ruta independiente del complejo ESCRT. Para generar un aumento en la concentración de las tetraspaninas se hizo una línea celular que expresara de forma constitutiva alguna de las tetraspaninas. Se utilizó un constructo de ADN recombinante que codifica la tetraspanina CD9 fusionada con la proteína verde fluorescente GFP, lo que facilitó su cuantificación durante el proceso, ya sea por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Para evaluar la eficiencia de la transducción de las células MRC-5 con las partículas lentivirales portadoras de la proteína CD9-GFP se procedió a estimación de la población de células CD9-GFP positivas a las 48 horas de la transducción por citometría de flujo. En este análisis se añadió el marcador CD90 el cual es expresado por CLM para confirmar que las células transducidas que presentaba la fluorescencia en GFP correspondían a células CLM (ver figura 1).

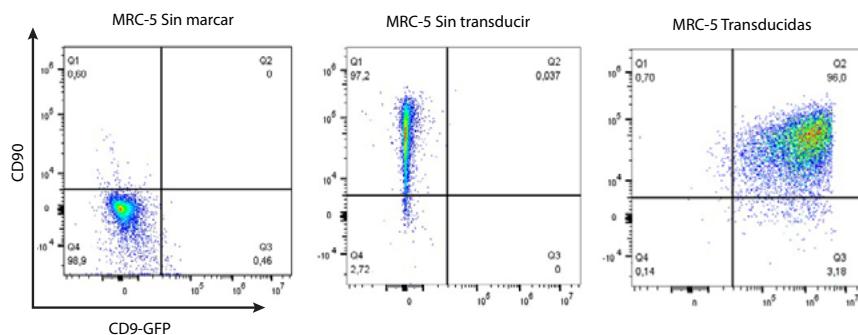


Figura 1. Análisis de citometría de flujo de las MRC-5 transducidas con CD9-GFP

La transducción presentó una eficiencia superior al 95 % en todas las réplicas. El siguiente paso consistió en la expansión de las células en 4 frascos T75 por tratamiento. Una vez alcanzada la confluencia del 70 %, se realizó un cambio de medio de cultivo retirando el SFB de este para dejar las células en un estado de privación de estimulantes del crecimiento por 48 horas. Esta condición de cultivo favorece a la generación de vesículas extracelulares por partes de las células. Las imágenes de microscopía de fluorescencia de las células transducidas posterior a las 48 horas indican que la expresión proteína CD9-GFP se concentró en el citoplasma y en algunas células se podía observar agregados de mayor intensidad de fluorescencia cercanos a la membrana plasmática, lo que podría corresponder a los cuerpos multivesiculares (MVB) enriquecidos con nuestra tetraspanina CD9. Las flechas rojas en la figura 2 señalan estos MVB cercanos a la membrana plasmática de las células con lo que se podría asumir que la inducción de la expresión de CD9 por nuestra transducción estaría favoreciendo la formación y liberación de exosomas.

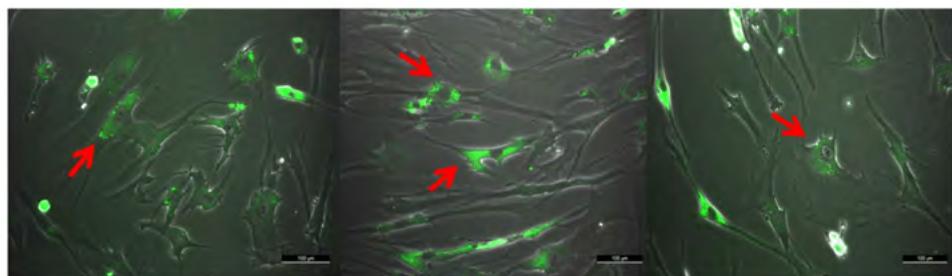


Figura 2. Imágenes de microscopía de fluorescencia de las MRC-5 transducidas con CD9-GFP

Los medios condicionados fueron colectados para recolectar las vesículas extracelulares. Las células fueron despegadas y congeladas para posteriores ensayos. Para confirmar que la transducción genera un efecto en el aumento de transcritos se procedió a realizar una cuantificación relativa de la expresión de CD9. Para esto se realizó la extracción de ARN total de una fracción de las células por kit comercial de columnas. Los extractos de ARN fueron cuantificados por absorbancia en un NanoDrop 2000 y se diluyeron a una concentración de 5 ng/ μ l de ARN de tal forma que en la reacción final de RT-qPCR tuvieran una concentración de 1 ng/ μ l en todos los tubos. Para la reacción de RT-qPCR se utilizó el kit Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit de New England Biolabs Inc en un termociclador ABI 7500. La cuantificación relativa de la expresión génica de CD9 se realizó mediante el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando el gen de la betamioglobulina (B2M) como gen *housekeeping* y ARN de células MRC-5 sin transducir como tratamiento de referencia. Los resultados de la RT-qPCR arrojaron que la transducción de la proteína de CD9-GFP generó un aumento en la expresión de transcritos, aunque no es estadísticamente significativa la diferencia generada (ver figura 3). Igualmente, se analizó la variación de la expresión del gen ALIX en las células transducidas con CD9 para determinar si existía relación directa entre ambas proteínas. Los resultados de la RT-qPCR mostraron un incremento en el *fold change* de

0,5 para ambos genes, sin tener tampoco una significancia estadística. La expresión de los genes CD9 y ALIX tendrían una correlación lineal en las muestras analizadas.

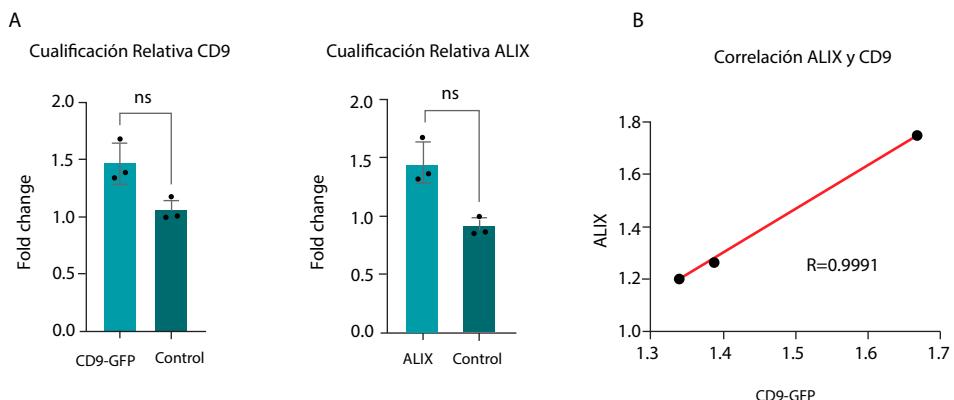


Figura 3. Cuantificación relativa de la expresión de los genes CD9 y ALIX y la correlación de su expresión

Los 40 ml de los medios condicionados fueron procesados mediante centrifugaciones seriadas para retirar los detritos celulares y cuerpos apoptóticos hasta obtener un *pellet* correspondiente a la fracción de microvesículas y exosomas. Ambas fracciones, de microvesículas y de exosomas, fueron resuspendidas en 1 ml de PBS doblemente filtrado y analizadas por citometría de flujo manteniendo fijo el volumen de adquisición en 50 μ l para cada una las muestras. Se realizó una primera adquisición del PBS filtrado, de las perlas de 1000 nm y 500 nm del kit de referencia Flow Cytometry Sub-micron Particle Size (Invitrogen) y de las fracciones de EV, microvesículas y exosomas, obtenidas de células MRC-5 transducidas con la tetraspanina CD9-GFP. Luego se volvió a realizar la adquisición de estas muestras, esta vez incrementando el valor de intensidad de fluorescencia necesario para pasar el umbral en el canal B1 durante la adquisición de los eventos. El canal B1 corresponde al punto máximo de emisión de fluorescencia del GFP, por tal motivo las EV enriquecidas con la proteína CD9-GFP pasarian ese valor de umbral de intensidad mientras que otras partículas en suspensión vesicular o ruido no serían adquiridas. Se observó que, a medida en que el umbral aumentaba, el número de eventos de fondo se reducía considerablemente y la visualización de las EV en un dotplot FSC vs. SSC mejoró tanto en la fracción de microvesículas como en la fracción de exosomas (ver figura 4).

Igualmente, la expresión constitutiva de la tetraspanina CD9 facilitó la identificación de EV por inmunocaptura. Las fracciones de microvesículas y exosomas colectadas se incubaron con las perlas del kit de inmunocaptura por toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizó una segunda marcación con las EV con el anticuerpo anti-CD81 y se realizó medición de perlas en el citómetro de flujo. La EV de colectas de las células transducidas se unen a las perlas y no requieren del segundo anticuerpo anti-CD81 para ser detectadas. La transducción de las células con el constructo CD9-GFP genera un enriquecimiento de la tetraspanina CD9, especialmente importante en la fracción

de microvesículas con respecto a las microvesículas obtenidas de células sin modificación (ver figura 5).

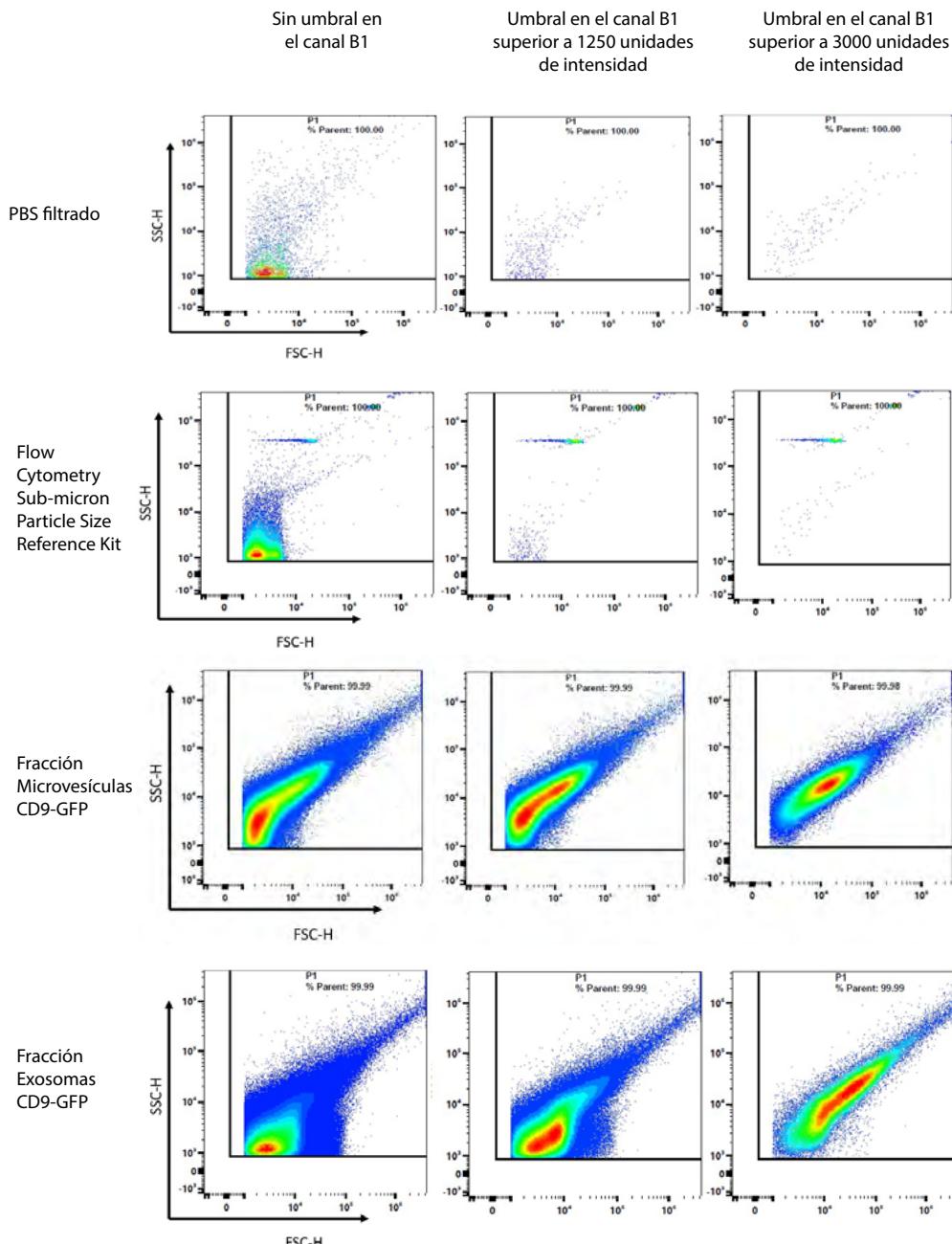


Figura 4. Análisis de citometría de flujo de las fracciones de EV con las diferentes estrategias de filtrado por umbral de intensidad

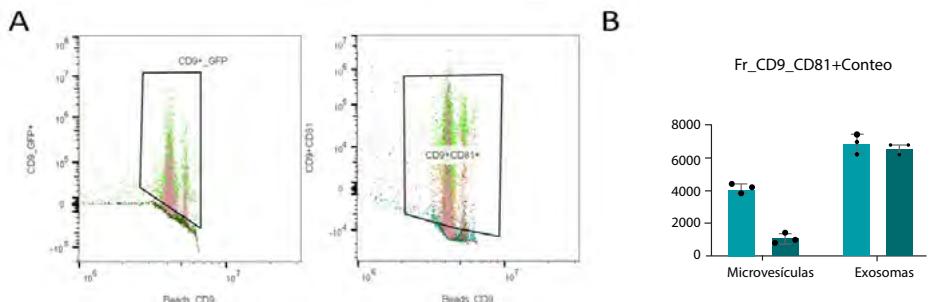


Figura 5. El ensayo de inmunocaptura utilizando perlas fluoro marcadas recubiertas en su superficie con anticuerpos anti-CD9

4. Conclusiones

La metodología propuesta en este estudio permite realizar el seguimiento y caracterización rápida de EV derivadas de células humanas mediante una tecnología asequible como es la citometría de flujo. La transducción lentiviral generó una alta eficiencia en la expresión de CD9 en células MRC-5, lo que generó un aumento de los transcriptos del gen. La tetraspanina CD9-GFP transducida se localizó en el citoplasma y se observaron agregados cercanos a la membrana plasmática que podrían corresponder a la formación de MVB, lo que indica que se acopló a los mecanismos de formación de EV acumulándose en las superficies de microvesículas y exosomas. Aunque para confirmar dicho enriquecimiento es necesario utilizar técnicas, los ensayos de inmuno-captura indican que este aumento es especialmente significativo en las microvesículas.

A pesar de las limitaciones que posee la citometría de flujo, teniendo en cuenta la escala nanométrica en la que se trabaja, para el estudio de EV, como puede ser la formación de agregados de EV que generan subestimaciones del conteo total o pérdida de EV de tamaños inferiores al límite de detección del equipo, la metodología de análisis de citometría de flujo propuesta solventa otras dificultades como el conteo conjunto de lipoproteínas o partículas virales que tienen un tamaño similar pero no expresan CD9 en su superficie y, por tanto, no podrían ser cuantificadas. Además, al utilizar EV de las mismas células como referentes, tienen un índice de refracción igual o más cercano, a diferencia de los índices de las microesferas de poliestireno o sílice que son usadas normalmente en este tipo de ensayos (van der Pol *et al.*, 2021).

Por tanto, el análisis aquí propuesto permite una medición y una visualización de microvesículas y exosomas más acertada y limpia de residuos vesiculares, lipoproteína o partículas virales que pueden enmascarar los datos. Las EV obtenidas de células transducidas con CD9-GFP servirán como referentes o estándares, en reemplazo de las microesferas o sílice hoy usadas, lo que permite la comparación de futuros ensayos con EV y sienta las bases para futuras investigaciones sobre el papel preciso de CD9 en la biogénesis de EV y su potencial aplicabilidad en investigación biomédica.

Referencias

- Bazzan, E., Tinè, M., Casara, A., Biondini, D., Semenzato, U., Cocconcelli, E., Balestro, E., Damin, M., Radu, C., Turato, G., Baraldo, S., Simioni, P., Spagnolo, P., Saetta, M., & Cosio, M. (2021). Critical review of the evolution of extracellular vesicles' knowledge: From 1946 to today. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126417>
- Burnouf, T., Chou, M., Lundy, D., Chuang, E., Tseng, C. & Goubran, H. (2023). Expanding applications of allogeneic platelets, platelet lysates, and platelet extracellular vesicles in cell therapy, regenerative medicine, and targeted drug delivery. *Journal of Biomedical Science*, 30(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00972-w>
- Fernández-Delgado, I., Calzada-Fraile, D. & Sánchez-Madrid, F. (2020). Immune regulation by dendritic cell extracellular vesicles in cancer immunotherapy and vaccines. *Cancers*, 12(12), 1–23. <https://doi.org/10.3390/cancers12123558>
- Jia, Y., Yu, L., Ma, T., Xu, W., Qian, H., Sun, Y. & Shi, H. (2022). Small extracellular vesicles isolation and separation: Current techniques, pending questions and clinical applications. *Theranostics*, 12(15), 6548–6575. <https://doi.org/10.7150/thno.74305>
- Ju, Y., Bai, H., Ren, L. & Zhang, L. (2021). The role of exosome and the ESCRT pathway on enveloped virus infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22169060>
- Mathieu, M., Névo, N., Jouve, M., Valenzuela, J., Maurin, M., Verweij, F., Palmulli, R., Lankar, D., Dingli, F., Loew, D., Rubinstein, E., Boncompain, G., Perez, F. & Théry, C. (2021). Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24384-2>
- van der Pol, E., van Leeuwen, T. & Yan, X. (2021). Misinterpretation of solid sphere equivalent refractive index measurements and smallest detectable diameters of extracellular vesicles by flow cytometry. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03015-2>
- Popowski, K., Moatti, A., Scull, G., Silkstone, D., Lutz, H., López, B., George, A., Belcher, E., Zhu, D., Mei, X., Cheng, X., Cislo, M., Ghodsi, A., Cai, Y., Huang, K., Li, J., Brown, A., Greenbaum, A., Dinh, P. & Cheng, K. (2022). Inhalable dry powder mRNA vaccines based on extracellular vesicles. *Matter*, 5(9), 2960–2974. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2022.06.012>
- Tiwari, S., Kumar, V., Randhawa, S. & Verma, S. (2021). Preparation and characterization of extracellular vesicles. *American Journal of Reproductive Immunology*, 85(2). <https://doi.org/10.1111/aji.13367>

Yáñez-Mó, M., Siljander, P., Andreu, Z., Zavec, A., Borràs, F., Buzas, E., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J., Ghobrial, I., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... de Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(15), 1–60.
<https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>