

EXPRESIÓN DE VLPs DEL VIRUS DE LA RABIA EN CÉLULAS BHK-21

Garay Ernesto

*Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Universidad Nacional del Litoral*

Área: Ciencias Biológicas
Sub-Área: Biotecnología
Grupo: X

PALABRAS CLAVE: **VACUNA, VIRUS-LIKE PARTICLES, RABIA**

INTRODUCCIÓN

La rabia es la infección viral aguda más severa en humanos, con una tasa de fatalidad de aproximadamente 100% una vez que aparecen los síntomas clínicos. El único tratamiento disponible es la administración de vacuna antirrábica en múltiples dosis (Jackson, 2013). Como alternativa a las vacunas a virus completos surgen las *Virus-like Particles* (VLPs) que son partículas autoensamblables que se asemejan en su estructura a la de los virus nativos pero que no contienen material genético y por lo tanto no poseen capacidad infectiva. Este sistema de producción no involucra el uso del virus activo en ningún momento, por lo que no requiere una infraestructura de bioseguridad elevada.

OBJETIVOS

Desarrollar VLPs para el virus de la rabia, mediante la expresión de la glicoproteína G de dicho virus en células animales como un candidato vacunal innovador y bioseguro.

METODOLOGÍA

Construcción de vectores de expresión para células eucariotas

Se ensamblaron partículas lentivirales de tercera generación por transfección transiente de células HEK293 con los vectores plasmídicos pRSV-REV, pMD.G, pMDLg/pRRE (Naldini y col., 1996; Dull y col., 1998) y pLV-GlycoG, plásmido que contiene la secuencia codificante de la glicoproteína G del virus de la rabia (RV).

Desarrollo de líneas celulares recombinantes

Se llevaron a cabo transducciones de cultivos en adherencia, utilizando los LVs producidos previamente. Para seleccionar las células recombinantes se llevó a cabo un protocolo de selección desarrollado en nuestro laboratorio (Prieto y col., 2011). Las células transducidas fueron incubadas, gradualmente, con cantidades crecientes del agente de selección.

Análisis de la expresión de glicoproteína G

Citometría de flujo: Se incubó una suspensión celular con un anticuerpo (Ac) monoclonal anti-glicoproteína G del RV y luego con Acs anti-*mouse* conjugado al

fluoróforo Alexafluor488. Posteriormente las células se analizaron con citómetro GUAVA, utilizando el software GUAVA ExpressPlus.

Microscopía de fluorescencia: Se cultivaron células durante 48 h y luego se fijaron con paraformaldehído. Posteriormente se incubaron con un Ac monoclonal anti-glicoproteína G de RV y a continuación con un Ac anti-*mouse* conjugado al fluoróforo Alexafluor488. Se realizó una tinción diferencial nuclear con Hoescht y las células se observaron en un microscopio de fluorescencia.

Caracterización de RV-VLPs

Análisis de la expresión de RV-VLPs por ELISA sándwich: La captura se realizó con un Ac policlonal anti-RV y se incubaron las muestras y estándar en diluciones seriadas al medio. Luego se incubó con un Ac policlonal anti-RV biotinilado y finalmente con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (AMDEX). Se reveló con H₂O₂ y o-fenilendiamina, leyendo las absorbancias en lector de placas *Multiskan*.
Purificación de RV-VLPs por centrifugación en gradiente de densidad: Se ultracentrifugó un volumen de sobrenadante de cultivo en colchón de sacarosa al 30% de iodixanol. Las VLPs obtenidas se analizaron por ultracentrifugación en gradiente discontinuo.

Western Blot: Las VLPs purificadas se prepararon con β-mercaptoetanol y se incubaron a 100°C. Se sembraron y corrieron en un gel de poliacrilamida al 10%, a 200 V. Se transfirió a una membrana de PVDF por electrotransferencia. Posteriormente, se bloqueó la membrana con solución de leche descremada al 5% incubando 16-18 h. Se incubó con Acs policlonales anti-RV y luego con inmunoglobulinas de cabra anti-Igs de conejo conjugadas a HRP. Se reveló por quimioluminiscencia.

Obtención de clones productores

El clonado de la línea BHK-G se realizó por el método de dilución límite (Freshney, 2000). Los pozos que presentaron un único clon se seleccionaron y amplificaron hasta llegar a obtener una cantidad suficiente de células para su criopreservación y análisis.

RESULTADOS

Construcción de un vector de expresión para células eucariotas

Se construyó un vector lentiviral (LV) de tercera generación como herramienta de transferencia de material genético. Para tal fin, se llevó a cabo una transfección transiente de células HEK293 con cuatro plásmidos: pRSV-REV, pMD.G, pMDL/pRRE y el vector de transferencia pLV-GlycoG. Los sobrenadantes celulares conteniendo los LV se cosecharon y almacenaron a -70°C hasta su posterior utilización.

Generación de líneas celulares productoras de RV-VLPs

Se transdujeron células BHK-21 con los LV obtenidos previamente. 96 horas post-transducción se comenzó con la presión selectiva con puromicina alcanzando una concentración de 200 µg/ml, denominándose la línea recombinante **BHK-G**. Posteriormente, para analizar la expresión de la glicoproteína G se realizó una citometría de flujo (Fig.1 A) y su localización subcelular fue confirmada por microscopía de fluorescencia. Se observa la correcta localización de la Glicoproteína G en la membrana de las células BHK-G (Fig.1 B y C).

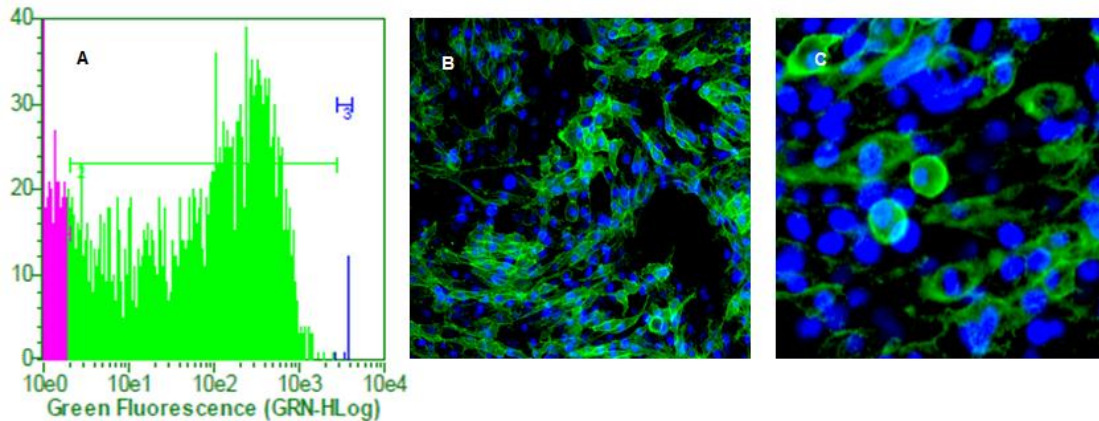


Figura 1. Análisis de la expresión de glicoproteína G. **A.** Citometría de flujo. Células BHK-G en suspensión se incubaron con un Ac monoclonal anti-RV y posteriormente con Ac policlonal anti-*mouse* conjugado al fluoróforo Alexafluor488. Se analizó en citómetro GUAVA con el software Guava ExpressPlus. MARKER 1: cél. negativas, MARKER 2: cél. positivas. **B y C.** Microscopía de fluorescencia. Fijadas las células BHK-G con PFA al 4% se incubaron en primera instancia con un Ac monoclonal anti-RV y luego con un Ac anti-*mouse* conjugado a Alexafluor488. Se realizó una tinción diferencial nuclear con Hoechst. **A.** BHK-G MERGED. **C.** Campo ampliado.

Caracterización de RV-VLPs

Para analizar si la línea celular BHK-G era capaz de producir VLPs que broten al sobrenadante de cultivo, se llevó a cabo un ELISA sándwich específico para la detección de la glicoproteína G. Como se observa en la Fig.2 A, se pudo detectar la presencia de VLPs en el sobrenadante de la línea BHK-G. Luego se realizó una purificación de las VLPs a partir de 300 ml de sobrenadante de cultivo y se ultracentrifugaron en colchón de sacarosa y luego en un gradiente de densidad para su purificación. Las bandas obtenidas en el gradiente, así como una muestra de sobrenadante sin purificar, se analizaron por *western blot* (Fig.2 C). Se observa la presencia de glicoproteína G tanto en la muestra de sobrenadante sin purificar como en la banda purificada por gradiente de densidad, y a su vez que dicha proteína posee el peso molecular esperado (62-65 KDa).

Clonado de la línea celular BHK-G y obtención de un clon productor

Con el objetivo de incrementar el nivel de producción de RV-VLPs, se llevó adelante el clonado de la línea LBHK-G. El clonado se realizó llevando a cabo la técnica de dilución límite (Freshney, 2000), cultivando la línea LBHK-G en placas de 96 pocillos a razón de una célula por pozo. De los clones obtenidos y analizados fueron seleccionados P4F6, P4E7, P2A5, P4C10, P2E8, P2B10 y P1D2 para analizar su productividad específica de RV-VLPs (Fig.3). Del resultado de este ensayo fue seleccionado el clon P2E8 debido a que presentó el mayor nivel de expresión entre todos los clones analizados, con un valor 24 veces mayor al de la línea BHK-G de origen.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se generaron vectores lentivirales de tercera generación que contienen la secuencia codificante de la glicoproteína G del RV, los que se utilizaron para transducir células de la línea BHK-21 generándose así la línea celular

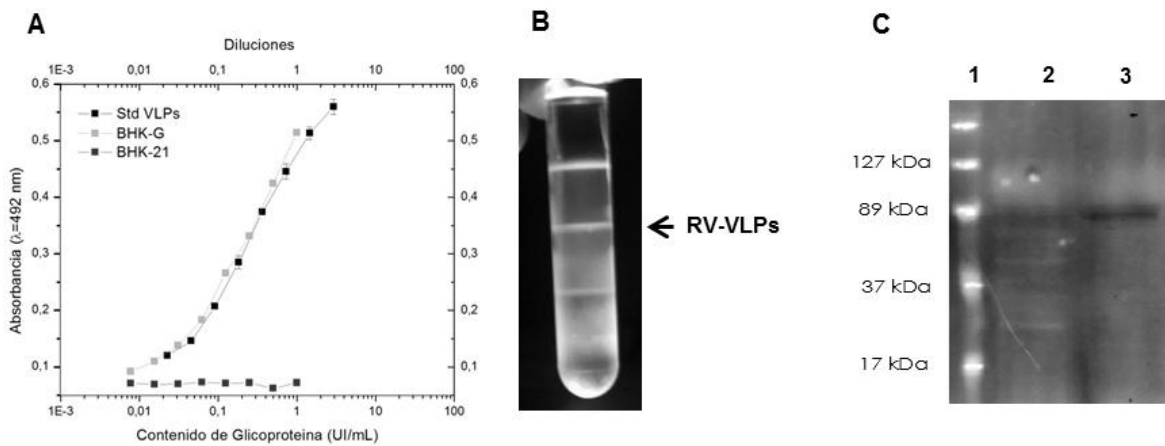


Figura 2. Detección y purificación de RV-VLPs en sobrenadante de cultivo. **A:** ELISA de sobrenadante de cultivo. **B:** Bandas obtenidas por centrifugación en gradiente de densidad. Se observa marcada la banda donde se localizan las VLPs. **C:** *Western blot*. Se separaron las proteínas por SDS-PAGE y se analizaron por *western blot*. Carril 1: Marcadores de PM. Carril 2: Sobrenadante de BHK-G. Carril 3: RV-VLPs purificadas.

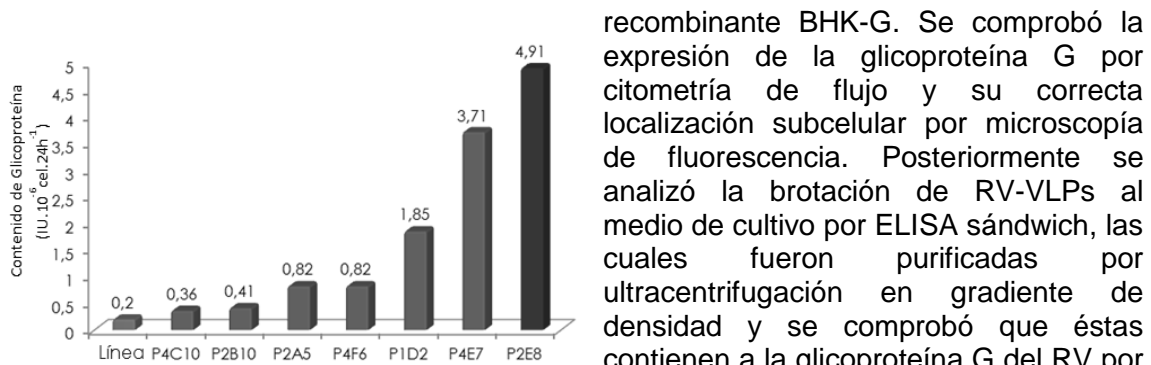


Figura 3. Productividad específica de RV-VLPs. Se cultivaron los clones a una misma densidad celular, transcurridas 24 horas de cultivo se retiró el sobrenadante y se analizó por ELISA sándwich.

recombinante BHK-G. Se comprobó la expresión de la glicoproteína G por citometría de flujo y su correcta localización subcelular por microscopía de fluorescencia. Posteriormente se analizó la brotación de RV-VLPs al medio de cultivo por ELISA sándwich, las cuales fueron purificadas por ultracentrifugación en gradiente de densidad y se comprobó que éstas contienen a la glicoproteína G del RV por *western blot*. Se clonó la línea BHK-G por el método de dilución límite y se obtuvo un clon productor con una productividad específica 24 veces mayor a la de la línea celular de origen. De todo esto se deduce que puede ser un

sistema de producción adecuado para la obtención de vacunas recombinantes bioseguras.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Crisci, E.; Bárcena, J. Y.; Montoya, M.,** 2012 Virus-like particles: the new frontier of vaccines for animal viral infections. *Vet Immunol Immunopathol.*, 148:211-25.
- Dull, T.; Zufferey, R.; Kelly, M.; Mandel, R. J.; Nguyen, M.; Trono, D. y Naldini, L.** 1998 A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* 72:8463-71.
- Freshney, R. I.** 2000 Cloning and selection. En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* 4ª edición (Ed.: Freshney, R. I.) Wiley-Liss, Nueva York, Estados Unidos. p. 195-213.
- Jackson, A.** 2013 Current and future approaches to the therapy of human rabies. *Antiviral Res.*, 99(1):61-7.
- Naldini, L.; Blomer, U.; Gallay, P.; Ory, D.; Mulligan, R.; Gage, F. H y col.** 1996 In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272:263-7.
- Prieto, C.; Fontana, D.; Etcheverrigaray, M. y Kratje,** 2011 A strategy to obtain recombinant cell lines with high expression levels. *Lentiviral vector-mediated transgenesis.* R. *BMC Proc.*, 5(8):7.