

UCH-FC  
Biotecnología  
L769  
C.1

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
ESCUELA DE PREGRADO  
FACULTAD DE CIENCIAS



**“SINTESIS Y DETECCION DE LAS GLICOPROTEINAS  
DEL VIRUS ANDES”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**MARÍA FERNANDA LISBONA PIZARRO**



Dr. Pablo Valenzuela Valdés  
**Director de Seminario de Título**

Dr. Mario Roseblatt Silver  
**Profesor Patrocinante**

Santiago de Chile, 2007



## “SINTESIS Y DETECCION DE LAS GLICOPROTEINAS DEL VIRUS ANDES”

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**MARÍA FERNANDA LISBONA PIZARRO**

Dr. Pablo Valenzuela Valdés  
**Director de Seminario de Título**

Handwritten signature of Pablo Valenzuela Valdés in blue ink over a horizontal line.

Dr. Mario Rosemblatt Silver  
**Profesor Patrocinante**

Handwritten signature of Mario Rosemblatt Silver in black ink over a horizontal line.

**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

Dra. Claudia Stange  
**Presidente Comisión**

Handwritten signature of Claudia Stange in black ink over a horizontal line.

Dr. Francisco Chávez Espinosa

Handwritten signature of Francisco Chávez Espinosa in blue ink over a horizontal line.

Santiago de Chile, \_\_\_\_\_ 2007





*A mi mamá con cariño.*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Facultad de Ciencias, a sus profesores y compañeros ya que no solo me entregaron una excelente enseñanza en el ámbito científico, sino que además lindos momentos que no olvidare.

También quiero agradecer a Fundación Ciencia para la Vida por darme la oportunidad de realizar mi memoria de tesis en un lugar no solo rico en conocimientos si no también en calidad humana.

Al Dr. Pablo Valenzuela y Mario Rosemblatt agradezco el tiempo invertido en revisiones de esta memoria, discusión de resultados, consejos y simplemente el agrado de hacer una tesis a cargo de personas que para mi son un ejemplo a seguir.

Especialmente a Nicole Tischler por enseñarme y corregir atentamente mis errores. Alentarme día a día a hacer los experimentos, por su dedicación y paciencia hasta el día de hoy.

A Ilse Muller, Verónica Burzio, Vania Arredondo, Alejandra Valdivia, Rodrigo Martínez, Marcela Santander, Juanita Bustamante, Tatiana Delgado y a Rodo ya que sin su ayuda esta memoria tampoco habría sido posible.

Al Dr. Luis Burzio por hacerme ver con su actitud frente a la ciencia que un resultado fallido o no esperado no es un problema sino más bien un desafío.

A la comisión revisora de esta tesis por su aguda revisión, sus consejos, tiempo y buena disposición.

Y por ultimo, a mi familia por su apoyo, cariño incondicional no solo en esta tesis sino en todos los aspectos de mi vida.

## RESUMEN

El síndrome cardiopulmonar por virus Hanta, descubierto en 1995 en Chile, es producido por el virus Andes el cual pertenece al género *Hantavirus* de la familia *Bunyaviridae*. Este virus se caracteriza por ser el más virulento dentro de este género, con un índice de mortalidad en humanos infectados de alrededor de un 30%. La principal vía de transmisión a los humanos ocurre por inhalación de aerosoles de heces, orina o saliva de roedores portadores del virus.

El genoma del virus Andes está formado por tres hebras independientes de ARN de sentido negativo denominadas de acuerdo a su tamaño L, M, S por grande, medio y pequeño, respectivamente. Los estudios de esta memoria se enfocaron en el segmento M del genoma viral, el cual codifica para la proteína precursora de las glicoproteínas 1 y 2. Estas proteínas están insertas en la envoltura lipídica del virus e interactúan con los receptores celulares permitiendo la unión del virus a la célula hospedera.

Se ha reportado que los virus Hanta que causan el síndrome cardiopulmonar interaccionan con las integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 3$ . De la interacción entre las glicoproteínas y estos receptores se ha sugerido que depende el desarrollo o no de la enfermedad.

En este trabajo, segmentos de proteínas G1 y G2 del virus Andes aislado CHI-7913 se expresaron en *E. coli* como proteínas de fusión a tioredoxina de *E. coli*. La proteína G1 fue expresada como proteína de fusión en dos segmentos, uno de la región amino denominado G1 $\alpha$  de aproximadamente 62 kDa y otro de la región carboxilo denominado G1 $\beta$  de aproximadamente 58 kDa. Ambas proteínas están superpuestas en 15 aminoácidos.

Se intentó producir la proteína G1 completa *in vitro*, obteniéndose una proteína de tamaño parcial de 30 kDa, la cual es reconocida por anticuerpos monoclonales contra la proteína G1.

La proteína G2 se expresó también en dos mitades, una región amino de 45 kDa y una región carboxilo de 58 kDa respectivamente. Estas proteínas están superpuestas en 37 aminoácidos.

Las proteínas recombinantes obtenidas fueron utilizadas para desarrollar anticuerpos monoclonales, los cuales reaccionaron específicamente con las proteínas recombinantes en ensayos de *Immunoblot*.

Los anticuerpos obtenidos contra G2 fueron analizados por su unión al virus en células Vero E6 infectadas con el virus Andes. Se identificaron 13 anticuerpos que se unen al virus, 11 contra G2 $\alpha$  y 2 contra G2 $\beta$ . Estos anticuerpos son herramientas poderosas que podrán ser usadas en el futuro para estudiar los mecanismos de infección viral y para fines diagnósticos y terapéuticos.

## SUMMARY

The hantaviral cardiopulmonary syndrome, discovered in 1995 in Chile, is produced by the Andes virus, which belongs to the *Hantavirus* genus of the *Bunyaviridae* family. This virus is known to be the most virulent of this genus, with a human mortality rate of around 30%. Transmission of this pathogen in humans is mainly through inhalation of aerosols from feces, urine and saliva of rodents bearing the virus.

The Andes virus genome is composed of three independent negative-polarity single-strand RNA molecules, termed L (large), M (medium) and S (small). The studies carried out in this thesis focus on the M segment, which codifies for the precursor of glycoproteins 1 and 2. These membrane proteins are inserted in the viral envelope and interact with cellular receptors, allowing the attachment of the virus to the host cells.

It has been reported that Hantaviruses causing the pulmonary syndrome interact with  $\beta 1$  and  $\beta 3$  integrin receptors depending on the development or not of the disease, respectively.

In this work, segments of the G1 and G2 proteins from the Andes virus isolate CHI-7913 were expressed in *E. coli* as fusions proteins with *E. coli* thioredoxin. G1 was expressed in two separate segments fused to thioredoxin, one from the amino, termed G1 $\alpha$ , of approximately 62 kDa and the other one from the carboxy, termed G1 $\beta$ , of approximately 58 kDa. These proteins overlap by 15 amino acids.

When expressing the complete G1 protein *in vitro*, only a partial fragment of 30 kDa was obtained, this was recognized by monoclonal antibodies against G1.

The G2 protein was also expressed in two halves, an amino-terminal region of approximately 45 kDa and a carboxy region of 58 kDa. These proteins overlap by 37 amino acids.

The recombinant proteins obtained were used for the development of monoclonal antibodies, which reacted specifically with the recombinant proteins by Immunoblot analyses. The antibodies obtained against G2 were assayed by their binding to the virus in Andes virus-infected Vero E6 cells. Thirteen antibodies were identified that interacted with the virus, 11 against G2 $\alpha$  and 2 against G2 $\beta$ . These antibodies are powerful tools for future studies on the mechanism of viral infection and furthermore may be useful for diagnostic and therapeutic applications.

## TABLA DE CONTENIDOS

	Página
<b>I. INTRODUCCION</b>	1
1. Historia	1
2. Agente infeccioso y ciclo viral.	2
3. Patogénesis y patología	4
4. Reservorio	5
5. Infección en humanos	
A. Modo de transmisión a humanos	6
B. Período de incubación y transmisibilidad	6
C. Epidemiología	6
6. Diagnóstico y tratamiento	7
7. Importancia de la glicoproteínas	8
<b>II. OBJETIVOS</b>	
A. Objetivo general	10
B. Objetivos específicos	10

<b>III. MATERIALES Y METODOS</b>	
<b>1. Animales</b>	11
<b>2. Células</b>	11
<b>3. Reactivos</b>	13
<b>4. Oligonucleótidos</b>	13
<b>5. Vectores</b>	15
<b>6. Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b>	16
<b>7. Clonamiento de fragmentos amplificados por PCR en los vectores pGEM-T, pET 32a (+) y pIVEX 2.4c</b>	17
A. Digestión del plásmido pET32a(+)y pIVEX 2.4c con enzimas de restricción	17
B. Ligación de fragmentos de ADN a vectores	18
C. Preparación de células de <i>E. coli</i> competentes	18
D. Transformación de células competentes y selección de colonias	19
E. Purificación del ADN plasmidial	20
F. Análisis de ADN por electroforesis en geles de agarosa	20
G. Digestión con endonucleasas de restricción	21
H. Purificación de los fragmentos de ADN desde los geles de agarosa	21
I. Secuenciación del ADN	22
<b>8. Producción <i>in vitro</i> de proteínas recombinantes</b>	22
<b>9. Preparación de las proteínas recombinantes en <i>E. coli</i></b>	23
A. Inducción de la síntesis de proteínas	23
B. Determinación de la concentración de proteínas	24
C. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes	24
D. Purificación de las proteínas recombinantes	25

10. Inmunización de ratones con las proteínas recombinantes y obtención de anticuerpos monoclonales	26
11. Análisis de la respuesta inmune mediante ELISA	27
12. Análisis de proteínas por la técnica de <i>Inmunoblot</i>	28
13. Inmunofluorescencia	29

<b>IV. RESULTADOS</b>	
1. Diseño y construcción de plasmidios que codifican las proteínas G1 y G2 fusionadas a Trx.	31
2. Síntesis de las proteínas G1 y G2 recombinantes y detección por anticuerpos anti-Trx.	34
3. Purificación de las proteínas G1 y G2.	39
4. Caracterización de las glicoproteínas G1 y G2 recombinantes.	
A. Con sueros de pacientes	41
B. Con anticuerpos monoclonales y policlonales anti-péptidos	42
5. Preparación de anticuerpos monoclonales contra las proteínas G1 y G2.	43
6. Caracterización de los anticuerpos monoclonales contra las proteínas G1 y G2.	
A. <i>Inmunoblot</i> .	44
B. Unión al virus	47
<b>V. DISCUSION</b>	49
<b>VI. REFERENCIAS</b>	57
<b>VII. ANEXO</b>	61

## INDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> Fotografía del roedor <i>Oligoryzomys longicaudatus</i> , reservorio del virus Andes.	5
<b>Figura 2:</b> Vectores de expresión.	15
<b>Figura 3:</b> Electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos correspondientes a los dominios amino (G1 $\alpha$ y G1 $\beta$ ) y carboxilo(G2 $\alpha$ y G2 $\beta$ ) por PCR a partir de los clones de G1 y G2.	31
<b>Figura 4:</b> Electroforesis en geles de agarosa de los productos de la digestión de los plasmidios derivados del vector pGEM-T con las enzimas de restricción <i>NotI</i> y <i>Sall</i> .	32
<b>Figura 5:</b> Análisis por electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos resultantes de la digestión de las construcciones pET-32a(+)/G1 $\alpha$ , pET-32a(+)/G1 $\beta$ , pET-32a(+)/G2 $\alpha$ , pET-32a(+)/G2 $\beta$ digeridos con las enzimas de restricción <i>NotI</i> y <i>Sall</i> y pIVEX 2.4c/G1c con <i>XhoI</i> y <i>NotI</i> .	33
<b>Figura 6:</b> Expresión de G1 $\alpha$ y G1 $\beta$ , utilizando distintas cepas de <i>E. coli</i> .	35
<b>Figura 7:</b> Expresión de la proteína G1 <i>in vitro</i> : vector, purificación e <i>Immunoblot</i> .	37
<b>Figura 8:</b> Clonamiento, expresión y purificación de las proteínas G1 $\alpha$ , G1 $\beta$ , G2 $\alpha$ y G2 $\beta$ .	38
<b>Figura 9:</b> Electroforesis en geles de proteínas de extractos bacterianos en distintas etapas de la purificación.	39
<b>Figura 10:</b> Análisis por <i>Immunoblot</i> de G2 $\beta$ con sueros de 6 diferentes pacientes infectados por Hanta.	41
<b>Figura 11:</b> <i>Immunoblot</i> de G2 $\alpha$ con suero policlonal de conejo.	42
<b>Figura 12:</b> <i>Immunoblot</i> de G1 $\alpha$ y G1 $\beta$ con anticuerpos monoclonales contra péptidos de G1.	43
<b>Figura 13:</b> <i>Immunoblot</i> de G2 $\alpha$ y G2 $\beta$ con anticuerpos monoclonales.	46

<b>Figura 14:</b> Caracterización anticuerpos parentales contra G2 $\beta$ .	47
<b>Figura 15:</b> Inmunofluorescencias de células Vero E6 infectadas con el virus AND-CHI 7913 con anticuerpos monoclonales contra G2 $\alpha$ y G2 $\beta$ .	48

### INDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1:</b> Cepas bacterianas usadas con sus respectivas características.	11
<b>Tabla 2:</b> Secuencias de los partidores para amplificar las glicoproteínas completas y fragmentadas con los sitios de restricción para ser clonados en los vectores de expresión.	14
<b>Tabla 3:</b> Vectores con sus respectivas características.	15

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANDV	Virus Andes
Amp	Ampicilina
Ampr	Resistencia a Ampicilina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina 5' trifosfato
BrEt	Bromuro de etidio
CIAP	Fosfatasa alcalina
dNTP	Deoxirribonucleotido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DO	Densidad óptica
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
FAL	Fosfatasa alcalina
FITC	Fluoresceina Isotiocianato
g	Fuerza de gravedad
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil tio- $\beta$ -D-galactósido
kDa	Kilodalton
LB Medio	Luria-Bertani
nt	nucleotidos
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
rpm	Revoluciones por minuto
RNasa	Ribonucleasa
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
RTS	Rapid Translation System
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
Trx	Tioredoxina de <i>E. coli</i>
U	Unidad enzimática
V	Voltio
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **Historia**

La enfermedad por Hantavirus fue descrita como fiebre hemorrágica durante la guerra de Corea en la década de los 50, sin embargo el agente causal fue descubierto en 1976 y denominado virus Hantaan, por el nombre de un río de Corea del Sur donde se capturó el roedor portador del virus (Baró y cols., 1999). Posteriormente, en Asia y Europa fueron identificados virus similares causantes de cuadros febriles acompañados de manifestaciones hemorrágicas y compromiso renal, lo que en la actualidad se engloba bajo el término de fiebre hemorrágica con síndrome renal. Una infección viral diferente fue detectada en Norteamérica en el año 1993, donde ocurrieron una serie de muertes inexplicables en la población indígena producidas por una neumopatía fulminante denominada como síndrome pulmonar por Hantavirus (Schmaljohn y Hjelle, 1997). La investigación del agente etiológico fue rápida debido a un seguimiento epidemiológico y de laboratorio, lo que resultó en la identificación de una especie de virus Hanta desconocida hasta entonces denominada virus Sin Nombre.

El Hantavirus fue reconocido en Chile como enfermedad emergente en 1995, con la identificación del primer caso de Síndrome Pulmonar en una mujer residente en Cochamó, X Región. Sin embargo, investigaciones muestran casos retrospectivos desde 1975 (Baró y cols., 1999).

## **Agente infeccioso y ciclo viral**

El virus Hanta identificado como principal agente causal de esta enfermedad en Chile y Argentina se denomina virus Andes. Este virus se clasifica dentro de la familia *Bunyaviridae*, género *Hantavirus*. A diferencia de los demás géneros dentro de esta familia (*Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* y *Tospovirus*) que son transmitidos por artrópodos, el virus Andes es transmitido por roedores, con los cuales se cree que ha coevolucionado (Plyusnin y cols., 1996).

El virus Andes se aisló al inocular células Vero E6 con el suero de un niño de 10 años infectado asintomático antes de que generara IgM e IgG, lo cual facilitó el proceso al no encontrarse neutralizado el virus. Éste fue el primer aislamiento realizado a partir de un humano antes de la aparición de los síntomas (Galeno y cols., 2002). El genoma de este aislado ha sido recientemente secuenciado en su totalidad (Tischler y cols., 2003).

El virus es esférico y envuelto, de 80 a 140 nm de diámetro, con proyecciones glicoproteicas embebidas en la bicapa lipídica de la envoltura. Su genoma está compuesto por tres hebras independientes de ARN de sentido negativo asociadas a nucleoproteína y que se encuentran cerradas en forma no covalente a través de extremos 5'-3' complementarios. Estas hebras son denominadas del inglés L, M, S (grande, medio y pequeño) que codifican respectivamente una proteína L que da origen a la polimerasa dependiente de ARN que replica en el citoplasma el material nuclear, M un precursor de glicoproteína y S la proteína de la nucleocápside o nucleoproteína (Elliot y cols, 1990). El precursor de las glicoproteínas es procesado cotraduccionalmente por una peptidasa en dos proteínas de superficie G1 y G2, por corte en un pentapéptido conservado WAASA (Löber y cols., 2001).

Los principales antígenos presentes en humanos son la nucleoproteína y las glicoproteínas G1 y G2. La inmunofluorescencia de células infectadas usando anticuerpos contra nucleoproteína muestra un patrón punteado por todo el citoplasma. Anticuerpos contra glicoproteínas muestran un patrón de punteado perinuclear típico de proteínas que se acumulan en el Aparato de Golgi (Spiropoulou, 2000).

Las proteínas G1 y G2, forman parte de la envoltura del virus e interactúan con los receptores celulares permitiendo la entrada a la célula hospedera. Esta interacción ha sido relacionada al desarrollo de la enfermedad.

Para la entrada del virus a la célula, se ha postulado que Prospect Hill y Tula usan  $\beta 1$  integrina para entrar a la célula pero no desarrollan la enfermedad. Por otro lado, las especies Sin Nombre, Hantaan, Seoul y Puumala usan las  $\beta 3$  integrina como receptor celular para entrar a la célula desarrollando la enfermedad (Gavrilovskaya y cols., 1998). Además, mediante ensayos de competición se postuló que una proteína de superficie de 30 kDa actuaría también como receptor para el virus Hantaan (Kim y cols., 2002).

La entrada a la célula de este virus ocurre a través de la endocitosis dependiente de clatrina. Dentro del endosoma se produce la fusión de la envoltura viral con la membrana vesicular a un pH intracelular bajo (Jin y cols., 2001), lo que posibilita la internalización de la nucleocápside del virus. El virus se multiplica en el citoplasma de las células infectadas. El ARN viral se puede replicar en un ARN de polaridad positiva que sirve de templado para producir más ARN viral. Una vez que ocurre la transcripción del ARN viral al ARN mensajero se produce la traducción de éste. Las glicoproteínas son dirigidas al retículo endoplásmico rugoso y posteriormente al Aparato de Golgi. Se

crea que los viriones se forman a través de la asociación de la nucleocápside con glicoproteínas embebidas en estas membranas. Los viriones nacientes entonces son transportados en vesículas secretorias a la membrana plasmática y son liberados por exocitosis.

Este mecanismo de infección se desconoce como el posible receptor celular, para el caso del virus Andes.

### **Patogénesis y patología**

El Hantavirus infecta a animales de laboratorio como ratón y primate, pero el mejor modelo de estudio para el virus Andes es el hámster Sirio adulto ya que este desarrolla la enfermedad de una manera muy similar al hombre (Hooper y cols., 2001).

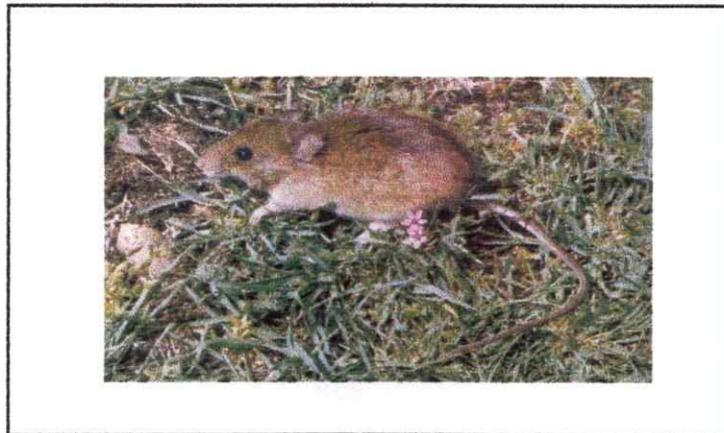
Los mecanismos de la patología por el síndrome pulmonar por Hantavirus son pobremente conocidos. Tanto *in vivo* (Zaki y cols., 1995) como *in vitro* (Sundstrom y cols., 2001) no se observa directamente un daño citopático en las células infectadas.

Ha sido sugerido que el mecanismo inmunopatológico envuelve a los linfocitos citotóxicos (Ennis y cols., 1997). Tejidos de pulmón obtenidos por necropsia desde pacientes con síndrome pulmonar por Hantavirus contienen abundantes cantidades de células CD4+ y CD8+ y un alto número de células productoras de citoquinas (Zaki y cols., 1995). Varias de las citoquinas detectadas en el tejido pulmonar, incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-2 y IFN- $\gamma$ , son producidas por las células T y pueden mediar el daño capilar. Además, evidencias preliminares sugieren que la infección por el virus Sin nombre HLA-B\*3501 estaría asociado con el desarrollo severo del síndrome pulmonar,

implicando las células T CD8+ (Koster y cols., 2001). Estas observaciones llevan a plantear que aspectos cuantitativos y/o cualitativos de la respuesta específica de las células T contra Hantavirus contribuyen a la patología del síndrome pulmonar.

### **Reservorio**

Se ha demostrado que el ratón colilargo (*Oligoryzomys longicaudatus*), es el principal reservorio del virus Andes y se ubica entre la III a XII región. Este virus ha sido detectado en otras especies en Chile como son *Abrothrix longipilis*, *Abrothrix olivaceus*, *P. Darwini* y *Rattus Rattus*. (Eduardo Palma comunicación personal, Sportorno y cols., 2000). En este roedor el virus ocasiona una infección crónica persistente y asintomática (López, 1996).



**Figura 1.** Fotografía del roedor *Oligoryzomys longicaudatus*, reservorio del virus Andes.

## **Infección en humanos**

### **A. Modo de transmisión a humanos**

La vía de infección más importante es la inhalación de aerosoles provenientes de las heces, orina y saliva de roedores portadores. La transmisión de persona a persona se documentó epidemiológicamente y con técnicas de virología molecular en un brote de síndrome pulmonar por Hantavirus en Argentina en 1996 (Padula y cols., 1998; Wells y cols., 1997).

### **B. Período de incubación y transmisibilidad.**

De acuerdo a estudios nacionales, el período de incubación por virus Andes es en promedio de 18 días, con un rango de 8 a 34 días. El período de transmisibilidad es desconocido. Por estudios recientes realizados en el Instituto de Salud Pública permitieron determinar que los días de mayor viremia serían los días previos al inicio de los síntomas.

### **C. Epidemiología**

En Chile la enfermedad es endémica, con una presentación del tipo estacional (primavera-verano), concentrando el 70% de los casos entre noviembre y abril. La magnitud de los brotes es variable alcanzándose las tasas más altas de incidencia hasta el momento en los años 2001 y 2002. Al 9 de noviembre del 2006, el total de casos reportados era de 493.

Se han registrado casos de infección desde la V a la IX región, los que frecuentemente se presentan como brotes regionales. La mayor frecuencia de los casos se ha presentado en la VII, VII, X y XI región. Sin embargo, el riesgo de enfermar existe en toda el área de distribución del reservorio.

La letalidad hasta noviembre del 2006 alcanzó el 37%.

### **Diagnóstico y tratamiento**

En la actualidad los métodos de diagnóstico utilizados en Chile y realizados en el Instituto de Salud Pública en conjunto con laboratorios de la Universidad Austral y la Pontificia Universidad Católica de Chile, se basan en ensayos serológicos tipo ELISA de IgG e IgM, usando antígenos derivados de virus Sin Nombre, Laguna Negra y Andes. Los dos primeros fueron donados por el Centro de Control de enfermedades (CDC) en los Estados Unidos y en el caso de Andes, por el Instituto Malbrán en Argentina. (Galeno, 2000; Ministerio de Salud, 2001; Szot, 2002).

La unión del anticuerpo del paciente y la proteína del virus también puede visualizarse en otros formatos como son *Inmunoblot* o inmunofluorescencia. El uso de las técnicas de biología molecular para el diagnóstico tiene actualmente un uso en investigación. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ARN viral no ha sido validada para su uso clínico por lo que no reemplaza al diagnóstico serológico pero es de utilidad cuando no se dispone de una muestra de sangre y debe realizarse en muestras de tejidos.

En el ámbito del tratamiento no existe uno efectivo para superar el síndrome pulmonar por virus Hanta. Los tratamientos son de apoyo tales como la sedación para disminuir el trabajo respiratorio, la administración de drogas vasoactivas, ventilación etc., mientras se desarrolla la respuesta inmune del paciente. En cuanto a tratamientos orientados a controlar los efectos patogénicos del virus o la respuesta inmunológica se proponen el uso de metilprednisolona durante la fase aguda y del antiviral ribavirina.

Ya que los virus Hanta y Puumala son los mayores agentes etiológicos de la fiebre hemorrágica con síndrome renal en el continente Euro-Asiático, se ha diseñado una vacuna inactivada con formalina contra el virus Hanta que se denomina Hantavax®, y está disponible en Corea desde 1990 (Chó y cols, 1997). Por otra parte, en China se han desarrollado vacunas para virus Hantaan y Seoul.

En el caso del virus Andes, estudios realizados en el Instituto de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la Armada de los Estados Unidos han probado con éxito el uso de una vacuna experimental para el tratamiento contra el virus Hanta. En sus ensayos, se vacunaron monos (*Macacus rhesus*) con un plásmido con el segmento M del virus Andes y Hantaan. Los anticuerpos generados por la vacuna fueron capaces de neutralizar a ambos virus y el refuerzo de la vacuna aplicado después de un año aumento la respuesta y la reactividad cruzada entre estos virus. (Hooper y cols., 2006).

### **Importancia de la síntesis de las glicoproteínas**

La alta mortalidad de la enfermedad producida por el virus Hanta, su modo de transmisión y el creciente aumento de contagio en actividades recreacionales, hace que en un país que pretende incentivar el turismo, el estudio del virus adquiera relevancia. Las características anteriormente mencionadas, además de su amplia distribución mundial y su potencial uso como arma bioterrorista, hacen del estudio del virus Hanta, una necesidad.

Los productos génicos del segmento M que son las proteínas G1 y G2 han sido implicadas en muchas de las propiedades biológicas importantes de los virus incluyendo

la virulencia, la neutralización, la hemoaglutinación y la fusión celular, las que constituyen un interesante y poderoso blanco de trabajo.

Las glicoproteínas al formar parte de la envoltura como proteínas de transmembrana interaccionan con receptores celulares para su entrada. Se postula que la patogenicidad del virus Hanta estaría asociada a la interacción de estas glicoproteínas con integrinas  $\beta 3$  receptores celulares del virus (Gavrilovskaya y cols., 1998).

Estas glicoproteínas, son las más variables del virus y es por ello que permiten la tipificación de distintas cepas del virus Hanta, ya que al tener mayor homología antigénica con las variantes de una determinada área geográfica, mayor será la sensibilidad del test para esa zona geográfica.

A partir de la producción de glicoproteínas recombinantes se pueden producir anticuerpos monoclonales, herramientas para estudiar el ciclo replicativo o para el desarrollo de inmunoterapias, como puede ser por ejemplo un suero neutralizante, la detección de proteínas virales o del virus propiamente tal.

## II OBJETIVOS

### Objetivo general

Diseño y obtención de glicoproteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales contra el virus Andes que podrán servir para fines diagnósticos y terapéuticos.

### Objetivos específicos

- El aislamiento, clonación y expresión en *E. coli* de los genes que codifican para las glicoproteínas del virus Andes CHI-7913 o dominios particulares de estas proteínas.
- La purificación de las proteínas recombinantes obtenidas en *E. coli*.
- La preparación de anticuerpos monoclonales contra las proteínas recombinantes.
- El estudio de la unión de los anticuerpos monoclonales a las partículas virales.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Animales

Los ratones Balb/c utilizados en este trabajo fueron obtenidos del vivero de BiosChile.

#### 2. Células

Las cepas bacterianas utilizadas que se describen brevemente a continuación fueron adquiridas comercialmente de Novagen.

Tabla 1: cepas bacterianas usadas con sus respectivas características.

Cepa	Características	Resultado
AD494(DE3)pLysS	<p>La cepa es una mutante para el gen de la tioredoxina reductasa (trxB).</p> <p>Esta cepa porta el gen para la ARN polimerasa del bacteriófago T7 bajo el promotor lac UV5 por lo que es denominada DE3</p> <p>pLysS contiene la lisozima del fago T7</p>	<p>Condición que facilita el correcto plegamiento de las proteínas porque aumenta la formación de puentes de disulfuro en el citoplasma</p> <p>Reduce la expresión basal de genes blanco y por lo tanto estabiliza plásmidos que expresan proteínas tóxicas en <i>E. coli</i>.</p>
BL21(DE3)	<p>Cepa ampliamente usada por su deficiencia en las proteasas lon y ompT.</p> <p>Porta el gen para la ARN polimerasa de T7 bajo el promotor lac UV5.</p>	
NovaBlue (DE3)	<p>Cepa usada por su alta eficiencia de transformación.</p>	

	<p>Capacidad de selección con el plásmido adecuado en colonias azules y blancas. Mutaciones en rec A y endA</p> <p>Porta el gen para la ARN polimerasa del fago T7 bajo el promotor lac UV5.</p>	<p>Resultan en un alto rendimiento y calidad en la purificación de plásmidos.</p>
Rosetta(DE3)pLysS	<p>Cepa que posee un plásmido resistente a cloranfenicol que lleva genes para la lisozima del fago T7 que y codifica tRNAs para codones poco utilizados en <i>E. coli</i> (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA).</p> <p>Porta el gen para la RNA polimerasa del fago T7 bajo el promotor lac UV5.</p>	<p>Aumenta la expresión de proteínas que de otra manera estaría limitada por el uso de codones</p>
Tuner (DE3)pLysS	<p>Cepa tiene una mutación en la permeasa (lacY) que permite la entrada uniforme de IPTG en la población celular.</p> <p>Porta el gen para la RNA polimerasa del fago T7 bajo el promotor lac UV5 y la lisozima del fago T7.</p>	<p>Produce un nivel de inducción homogéneo dependiente de la concentración de IPTG.</p>

Las muestras con células infectadas con virus Andes para realizar las inmunofluorescencias fueron provistas por el Instituto de Salud Pública. Estas muestras consisten en portaobjetos con células Vero E6 (fibroblastos normales de riñón de mono

verde de África) infectadas con virus Andes CHI-7913, fijadas y permeabilizadas en una solución 10% acetona, 90% metanol.

### **3. Reactivos**

Las sales, ácidos, bases, detergentes, antibióticos, glucosa, bromuro de etidio y solventes utilizados de grado analítico o de biología molecular, se obtuvieron en Merck y Sigma. Las enzimas de restricción, Taq ADN polimerasa, T4 ADN ligasa, fosfatasa alcalina de ternero, X-GAL, IPTG, ADN estándar, dATP, dGTP, dCTP, dTTP se obtuvieron de Invitrogen, New England Biolabs y Promega, respectivamente. Los sistemas de purificación de productos de PCR, de purificación de ADN plasmidial y de extracción de ADN desde geles se obtuvieron de Qiagen. La triptona, extracto de levadura y agar se adquirieron en Difco Laboratorios. La agarosa se obtuvo de GibcoBRL y FMC Corporation. El sistema de expresión *in vitro* RTS 500 se obtuvo de Roche. El reactivo Micro BCA para cuantificar proteínas y sustrato para quimioluminiscencia se obtuvo en Pierce. Las películas fotográficas de radiografía se obtuvieron de Kodak. El anticuerpo anti IgG de ratón hecho en cabra se obtuvo en Kirkegaard & Perry Laboratorios (KPL).

### **4. Oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos usados para amplificar las glicoproteínas G1 y G2 como también sus regiones superpuestas amino ( $\alpha$ ) y carboxilo ( $\beta$ ) se diseñaron en base a la secuencia genómica conocida del virus Andes CHI-7913 (Tischler y cols., 2003).

Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR varían entre 33 y 42 bases y su temperatura de hibridación se calculó de acuerdo a la fórmula  $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$ . Las secuencias de los partidores y el valor de la  $T_m$  se muestran en la Tabla 2. La notación forw indica que es un partidor en el sentido directo y rev indica que es un partidor en el sentido inverso. En azul se destacan los sitios de restricción *Sall* de los partidores en el sentido directo, y en rojo se destacan los sitios de restricción *NotI* y *XhoI* de los partidores para el sentido inverso.

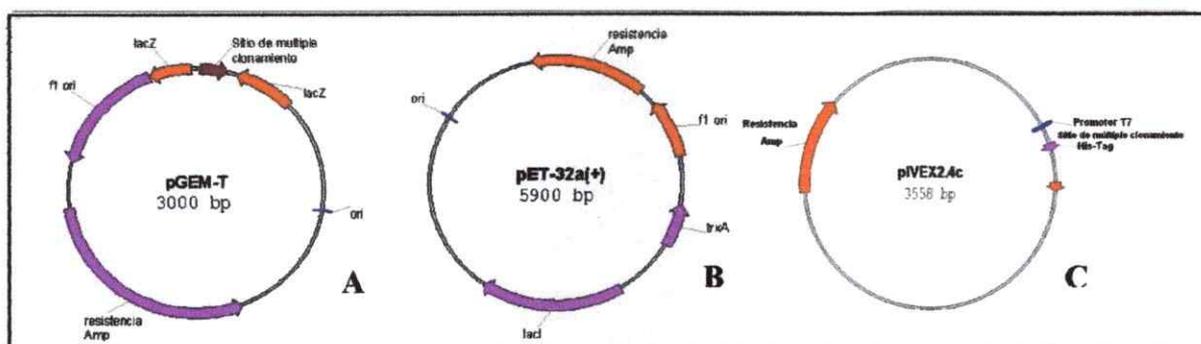
**Tabla 2.** Secuencias de los partidores para amplificar las glicoproteínas completas y fragmentadas con los sitios de restricción para ser clonados en los vectores de expresión.

Secuencia oligonucleótido	Sitio de restricción	Producto PCR	Vector de expresión
G1 Forw: 5'-CAAAGTCGACGCGGCCGAGTTTAAAAATGGAAGGGTGGT-3' forw. $T_m:90^{\circ}\text{C}$ G1 Rev:5'-ACTCCTCGAGTCTAGATTATGCACTTGGCGCCCAAATAACAAT-3 rev. $T_m:92^{\circ}\text{C}$	<i>Sall</i> <i>XhoI</i>	G1	pIVEX2.4c
G1 $\alpha$ Forw: 5'-CAGAGTCGACAAATGGAAGGGTGGTATCTGGT-3' $T_m:66^{\circ}\text{C}$ G1 $\alpha$ Rev: 5'-CAAGTTCGACTCATACACTGTGATTAGATTCAGG-3' $T_m:66^{\circ}\text{C}$	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	G1 $\alpha$	pET32a(+)
G1 $\beta$ Forw:5'-GACGGTCGACTAATGTTTGTGTTTCCCCAGGTATA-3' $T_m:68^{\circ}\text{C}$ G1 $\beta$ Rev:5'-ACTCCTCGAGTCTAGATTATGCACTTGGCGCCCAAATAACAAT-3' $T_m:92^{\circ}\text{C}$	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	G1 $\beta$	pET32a(+)
G2 $\alpha$ Forw: 5'-GAAGTTCGACAAATGGCCGCAAGTGCAGAGACTCCA-3' $T_m:80^{\circ}\text{C}$ G2 $\alpha$ Rev: 5'-CAGTCTCGACTAGCACCAATTGTTAAGGATGAC-3' $T_m:68^{\circ}\text{C}$	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	G2 $\alpha$	pET32a(+)
G2 $\beta$ Forw: 5'-ATCCGTCGACTAATGCCATCTGTGAAGGTTTGTATA-3' $T_m:70^{\circ}\text{C}$ G2 $\beta$ Rev: 5'-AGGACTCGAGCGCGCCGCTTAGACAGTTTCTTGTGCC-3' $T_m:56^{\circ}\text{C}$	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	G2 $\beta$	pET32a(+)

El vector pGEM-T, especialmente diseñado para clonar productos de PCR se obtuvo de Promega. Este plasmidio posee una timidina en el extremo 5' de cada una de las hebras en el sitio de inserción lo que facilita la ligación a segmentos de ADN obtenidos por PCR con Taq polimerasa, la cual agrega una adenina en el extremo 3' de cada hebra. Además se utilizó el vector pET32a (+), obtenido de Novagen, para expresar las proteínas recombinantes en *E. coli*. Este vector produce proteínas recombinantes

fusionadas a la tioredoxina de *E. coli* y a un péptido de polihistidinas que facilita su posterior purificación e identificación. Finalmente se utilizó el vector pIVEX 2.4c para la expresión *in vitro*, obtenido de Roche. Los esquemas de estos plásmidos se presentan en la Figura 2.

## 5. Vectores de expresión



**Figura 2.** Vectores de expresión: **A:** pGEM-T, **B:** pET-32a (+), **C:** pIVEX 2.4c.

**Tabla 3:** Vectores con sus respectivas características.

Vector	Características
pGEM-T	Posee un sitio múltiple de clonamiento para productos de PCR; <i>Amp</i> , gen de resistencia a ampicilina; <i>fl ori</i> , origen de replicación del fago f1 para producir ADN de hebra simple; <i>ori</i> , origen de replicación y <i>lacZ</i> , región codificante para la β-galactosidasa interrumpida por el sitio de clonamiento.
pET32a(+)	Contiene un <i>ori</i> , origen de replicación bacteriano derivado de pBR322; <i>Amp</i> , resistencia a ampicilina; <i>fl</i> , origen de replicación del fago f1; <i>lac I</i> represor del operón lac; promotor de T7; <i>Trx A</i> , gen de tioredoxina A de <i>E. coli</i> ; sitio de corte con enteroquinasa y un péptido de polihistidinas.
pIVEX2.4c	Contiene un gen de resistencia a ampicilina ( $Amp^r$ ), sitio de clonamiento, origen de replicación, sitio de unión al ribosoma, promotor del fago T7 y una cola de histidina fusionado en el N-terminal.

## **6. Amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las regiones codificantes de las glicoproteínas virales ocupadas como templado fueron obtenidas mediante RT-PCR a partir de clones del aislado ANDV CHI-7913 (Tischler y cols., 2003).

La reacción de PCR se llevó a cabo en tubos Eppendorf autoclavados de 500  $\mu$ l en los que se agregaron los siguientes componentes: 5  $\mu$ l de tampón PCR 10X sin  $Mg^{+2}$ , 1,5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  50 mM, 4  $\mu$ l de mezcla de dNTP 2,5 mM, 1  $\mu$ l de una solución 30  $\mu$ M de cada uno de los oligonucleótidos partidores, 50-200 ng de ADN templado, 0,5  $\mu$ l de Taq ADN polimerasa 5 U/ $\mu$ l y se completó a un volumen final de 50  $\mu$ l con agua desionizada estéril.

La mezcla de reacción se incubó en un termociclador (modelo PTC-200 MJ Research) con el siguiente programa: una etapa inicial de desnaturación de 5 min a 95°C; 30 ciclos de denaturación de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C para apareamiento y 1 min a 72°C para elongación. Finalmente se realizó una etapa de extensión durante 10 min a 72°C e incubación permanente a 4°C hasta la purificación. La purificación de los productos de PCR se realizó mediante el kit Qiaquick de Qiagen de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante, el cual usa una membrana de sílica que adsorbe el DNA en un tampón de unión especializado; el protocolo separa oligonucleótidos de hasta 40 bases de productos de DNA de mayor tamaño lo cual lo convierte en un sistema útil para remover los partidores y los nucleótidos empleados en la reacción.

En los casos en que el DNA amplificado no se ocupó a la brevedad para evitar la posible degradación de la adenina de sus extremos se procedió a unir desoxiadeninatrifosfato en estos extremos mediante una reacción con 0,5 U finales de Taq ADN polimerasa, 0,2

mM dATP, 2 mM de  $Mg^{+2}$ , tampón PCR 10X y 10  $\mu$ g aproximadamente de producto de PCR incubándose todo esto por 30 min a 70°C.

## **7. Clonamiento de fragmentos amplificados por PCR en los vectores pGEM-T, pET 32a (+) y pIVEX 2.4c**

### A. Digestión de los plásmidos pET32a(+) y pIVEX 2.4c con enzimas de restricción

Para linearizar el plásmido aproximadamente 500 ng del vector fueron sometidos a digestión con endonucleasas que en el caso del pGEM-T y pET32a(+) fueron *Not* I y *Sal* I y en el caso de pIVEX 2.4c fueron *Xho* I y *Sal* I. Como la secuencia de corte de *Xho* I y *Sal* I es muy parecida para ligar en la orientación adecuada se eligió en la mayoría de los casos cortar con *Not* I en vez de con *Xho* I. Se incubó 90 min por cada enzima partiendo por la que necesita menor fuerza iónica. Una vez completado el tiempo de digestión se trató con fosfatasa alcalina CIAP para remover los fosfatos 5' evitando así la religación de los plásmidos. Para esto, a los 120  $\mu$ l de mezcla se le agregaron 2  $\mu$ l de fosfatasa alcalina (1U/ $\mu$ l), 30  $\mu$ l de tampón 10X CIAP (0.5 M Tris HCl, 1 mM EDTA pH 8.5) y 148  $\mu$ l de agua mili Q y se incubó 1 hora a 37°C. Luego de este tiempo la fosfatasa alcalina se inactiva agregando EDTA a una concentración final de 10 mM y se incubó a 75°C por 15 min. El producto de esta reacción se purificó mediante el kit Quiaquick Qiagen con lo que se logra remover el fragmento contenido entre las dos enzimas de restricción. El ADN se extrajo con 1 volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y luego con 1 volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). El ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto frío con acetato de sodio (1:10) y se

guardó a -20°C durante la noche. Al día siguiente, se centrifugó 10 min a velocidad máxima y se descartó el sobrenadante. Una vez evaporado el exceso de etanol, el precipitado se disolvió en 30 µl de tampón TE. La concentración de ADN se estimó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

#### B. Ligación de fragmentos de ADN a vectores

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR o los fragmentos obtenidos por digestión con enzimas de restricción se ligaron a los distintos vectores de clonamiento o expresión. La reacción de ligación se realizó en 10 µl con 1 U de ligasa T4 Gibco en el tampón de ligación correspondiente, manteniendo una relación molar de al menos 1:10 de vector/inserto y dentro del rango de 1:3 a 3:1 (vector: inserto) para el vector pGEM-T. La mezcla de reacción se incubó por 16 h a 14°C.

#### C. Preparación de células *E. coli* competentes

Se inocularon 3 ml de medio Luria Bertani 1X (1 g de Triptona, 500 mg de extracto de levadura, 500 mg de NaCl autoclavado sin antibiótico) con 250 µl de suspensión de bacterias. Luego se incubó a 37°C con agitación de 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria. Posteriormente 50 ml de medio LB 1X se inocularon con 1,5 ml de este cultivo. La mezcla se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm hasta obtener una densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 0,6-0,8, lo que demora aproximadamente de 2 a 3 horas dependiendo de la cepa. Una vez alcanzada la densidad óptica indicada, el cultivo se transfirió a dos tubos cónicos de 50 ml y se centrifugó a 3500 por 10 min a 4°C para sedimentar las bacterias y eliminar el sobrenadante.

Las células se resuspendieron en 25 ml de solución NaCl 10 mM frío, se centrifugaron en las mismas condiciones anteriores y el precipitado se resuspendió en 25 ml de CaCl<sub>2</sub> 75 mM frío. Las células se dejaron reposar en hielo durante 30 min, se volvieron a centrifugar y luego a resuspender en 3 ml de CaCl<sub>2</sub> 75 mM frío. A partir de este instante, las células se consideran competentes, sin embargo, el grado de competencia aumenta si se incuban durante 3 horas adicionales en hielo. Las células competentes fueron alícuotadas en tubos Eppendorf de 1,5 ml en presencia de 14 % de glicerol y se congelaron en una mezcla de etanol hielo seco para ser posteriormente guardadas a -80°C.

#### D. Transformación de células competentes y selección de colonias

Un volumen de 100 µL (1 x 10<sup>8</sup> células competentes/ml) (Novablue o BL21) y 10 µl del producto de ligación o 10 ng del ADN plasmidial purificado se incubaron a 4°C por 30 min. Luego se sometió a las bacterias a un shock térmico de 1 min a 42 °C y se dejó reposar 3 min en hielo. Se agregaron 800 µl de medio SOC (20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0,5 g de NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de glucosa en un litro) estéril y se incubó con agitación durante 1 h a 37 °C. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 900 x g por 2 min y las bacterias se resuspendieron en aproximadamente 100 µl del mismo medio de cultivo. Esta suspensión se sembró en placas de agar al 1% con ampicilina 100 µg/ml) y se incubaron a 37 °C durante la noche. Al día siguiente se seleccionaron colonias de cada placa y se dejaron crecer en 5 ml de medio LB con ampicilina 100 µg/ml durante la noche con agitación a 37°C. Se picaron colonias por  $\alpha$ -complementación cuando la transformación se realizó con el vector pGEM-T, picando

en este caso las colonias blancas que se dejaron creciendo en 4 ml de LB 1X ampicilina 100 µg/ml durante la noche con agitación a 37°C. Para esto, las placas se prepararon agregando sobre su superficie 100 µl de IPTG 100 mM y 20 µl de X-gal 50 mg/ml.

Para la selección de las colonias positivas también se utilizó PCR de extractos directos de colonias. Para esto las colonias se pican y se dejan crecer en LB 1X ampicilina 100 µg/ml. Luego del cultivo en fase estacionaria se sacó una pequeña alícuota, la que se calentó a 100°C por 10 min en el termociclador (modelo PTC-200 MJ Research), se le agregó la misma mezcla de PCR y se ocupó el mismo programa citado anteriormente.

#### E. Purificación de ADN plasmidial

El ADN plasmidial se purificó mediante el kit Qiaprep de Qiagen, utilizando el protocolo recomendado por el fabricante. Este se basa en la lisis alcalina de las bacterias que son posteriormente neutralizadas y ajustadas con una alta concentración salina que permite la adsorción selectiva de ADN en sílica y su elusión en baja concentración de sal.

#### F. Análisis de ADN por electroforesis en geles de agarosa

El análisis de los productos de ADN derivados ya sea de la amplificación por PCR, de las digestiones con enzimas de restricción, de las purificaciones de ADN plasmidial, de las preparaciones de ADN genómico y de plasmidios linearizados, se realizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % en TAE (Tris 40 mM, EDTA 2 mM, NaCH<sub>3</sub>COOH 20 mM pH 8) y BrEt [0,3 µg/mL]. Para esto, las muestras se prepararon con 1:10 del volumen de una solución de carga que contiene azul de bromofenol 0,42 % y glicerol 50%. Como patrón de tamaño de ADN se utilizó 1 µg de una mezcla de

estándar de fago  $\lambda$  y  $\Phi$  digeridos con Hind III y Hae III, que contiene fragmentos desde 23.130 pb hasta 72 pb. Las bandas de ADN en el gel se visualizaron con luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara digital. En los casos de digestiones preparativas, para purificar un fragmento a partir de su extracción del gel se utilizó una agarosa preparativa de mayor pureza Seakem GTC agarose (Biowhittaker Molecular Applications).

#### G. Digestión con endonucleasas de restricción

Para comprobar la presencia de los genes clonados en los respectivos plasmidios, el ADN plasmidial se sometió a digestión con las enzimas de restricción específicas para las secuencias que bordean los genes en cada vector y el producto se analizó por electroforesis en geles de agarosa. En este caso las enzimas utilizadas fueron *Not* I, *Sal* I y *Xho* I. La digestión se realizó en 20  $\mu$ l totales y se agregaron aproximadamente 100 ng de ADN plasmidial y 5 U/ $\mu$ l de la enzima de restricción en su correspondiente tampón de reacción. La mezcla se incubó 1 h a 37°C para cada enzima. Para la digestión preparativa se utilizó 3  $\mu$ g de ADN plasmidial en un volumen final de 100  $\mu$ L. Las digestiones se incubaron por 3 horas a 37°C.

#### H. Purificación de los fragmentos de ADN desde geles de agarosa

Los fragmentos de ADN resultantes de las digestiones con enzimas de restricción se analizaron por electroforesis en geles de agarosa preparativa al 1%. El segmento del gel, correspondiente al fragmento de ADN de interés, se cortó y separó del resto del gel y luego se purificó mediante el kit Quiaquick Gel Extraction (Qiagen) de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante.

## I. Secuenciación del ADN

Las muestras purificadas de ADN se secuenciaron utilizando el Kit comercial Bigdye 2.0 fabricado por Perkin Elmer y un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para esto se utilizaron partidores específicos para las secuencias que bordean el inserto como los partidores pUC/M13 Fw y pUC/M13 Rv propios del vector pGEM-T. En algunas ocasiones se utilizaron también los partidores propios de cada gen.

## **8. Producción *in vitro* de proteínas recombinantes**

Este procedimiento se desarrolló siguiendo las instrucciones del fabricante y se utilizó el sistema de expresión *in vitro* RTS 500 de Roche. Para esto se ocuparon 1 ml de solución de reacción y aproximadamente 30 µg de DNA del pIVEX 2.4c con el inserto de la glicoproteína G1 completa.

La reacción *in vitro* es acoplada, el DNA es primero transcrito desde el vector templado pIVEX 2.4c/G1c en ARNm por la RNA polimerasa del fago T7 seguido por la traducción del ARNm por la maquinaria ribosomal presente en el lisado de *E. coli*. Se tomaron alícuotas de la solución de reacción a los tiempos 0, 5, 20 y 24 horas. Las muestras fueron posteriormente analizadas por electroforesis en geles de acrilamida e *Immunoblot*.

## 9. Preparación de las proteínas recombinantes en *E. coli*

### A. Inducción de la síntesis de proteínas y preparación de muestras

La expresión de las proteínas recombinantes se realizó en células de *E. coli* BL21, transformadas con pET32a/G2 $\alpha$  y pET32a/G2 $\beta$ . En el caso del estudio de inducción de G1 $\alpha$  y G1 $\beta$  se utilizaron las cepas bacterianas de *E. coli* AD494(DE3)pLysS, BL21(DE3), Tuner(DE3)pLysS, Rosetta(DE3)pLysS, previamente transformadas con pET32a/G1 $\alpha$  y pET32a/G1 $\beta$ .

Para inducir la expresión de las proteínas, se inoculó el medio LB-Amp (ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con cultivo fresco de la cepa de *E. coli* BL21 crecida durante la noche, y se incubaron a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 a 0,6 a una longitud de onda de 600 nm. Luego se tomó 1 ml correspondiente al tiempo 0 de inducción y al resto del cultivo se le agregó IPTG a una concentración final de 1 mM. Posteriormente, se tomaron alícuotas a las 3 h. Las alícuotas se centrifugaron y el precipitado se resuspendió en TBS (50m M Tris, 1M NaCl pH 8) con 1 mM de PMSF. Esta mezcla se sonicó en frío tres veces durante 15 seg a intensidad media hasta disolver el precipitado. Luego de sonicar, la suspensión se centrifugó a 13.000 g durante 10 min separándose la fracción proteica soluble (sobrenadante) de las proteínas insolubles y restos celulares (pella). Estas fracciones fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes. El volumen de muestra que se cargó se determinó en base a la densidad óptica y en el caso del estudio de inducción de los fragmentos G1 $\alpha$  y G1 $\beta$  se cargó la misma cantidad de proteína total para cada una de las cepas.

### B. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó con el kit Micro BCA protein assay (Pierce). La detección se hizo en placas de ELISA utilizando 200  $\mu$ l de reactivos del kit y 10  $\mu$ l de muestra, agregando también muestras de BSA de concentración conocida para obtener una curva de calibración desde 0,05 a 0,8 mg/ml. La placa se incubó a 37°C por 30 min y luego se leyó en un lector de ELISA ELX 800 (Biotek Instruments Inc) a 490 nm.

### C. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes

Las muestras a analizar se prepararon mezclándolas con 1 volumen de tampón de corrida 2X que contiene 62,5 mM Tris (pH 6,8), 2% SDS, 10% glicerol, 0,02% azul de bromofenol y 50 mM  $\beta$ -mercaptoetanol. En el caso de las fracciones proteicas insolubles, éstas se resuspendieron directamente en el tampón de corrida. Las muestras se calentaron a 100°C durante 5 min antes de cargar los geles. Los geles de poliacrilamida se prepararon de acuerdo a Laemmli (1970). El gel concentrador es al 4,5% de acrilamida: bisacrilamida (30:1) en Tris 0,125 mM (pH 6,8), SDS 0,1%, TEMED 0,1% y persulfato de amonio al 0,13%. El gel separador se preparó al 12,5% de acrilamida: bisacrilamida (30:1), en Tris 0,375 mM (pH 8,8), SDS 0,1%, TEMED 0,25% y persulfato de amonio al 0,037 %. El tampón de corrida corresponde a Tris-glicina (Tris-base 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0,1%, pH 8,3). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 a 110V hasta que el frente de corrida cayó del gel. Posteriormente el gel se tiñó con una solución que contiene azul de Coomassie 0,5%, metanol 45% y ácido acético 10%, durante aproximadamente 30 min con agitación, y se

destiñó con la misma solución sin colorante. Los geles se secaron en un secador modelo 543 Gel Dryer (Bio-Rad) a 85°C durante 45min en condiciones de vacío. Como patrón de tamaños moleculares se utilizó el estándar de proteínas Invitrogen BenchMark Prestained Protein Ladder que incluye tamaños de proteínas de 8,4 kDa hasta 176,5 kDa.

#### D. Purificación de las proteínas recombinantes

El cultivo proveniente de las tres horas de inducción con IPTG se centrifugó a 14.000 rpm a 4°C durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente el precipitado fue resuspendido en tampón TBS (50m M Tris, 1M NaCl, pH 8) con 1 mM de PMSF. Esta mezcla se sonicó en tubos sobre hielo como mínimo 3 veces durante 15 s hasta homogeneizar la solución manteniendo los tubos en hielo y luego se centrifugó nuevamente. Si la proteína de interés queda en el sobrenadante se considera soluble, en cambio si queda en el precipitado se considera insoluble. Las proteínas recombinantes purificadas resultaron ser insolubles por lo que se sometieron a dos lavados con tampón TBS 0,5% Tritón X100 y luego en urea de 1 a 6 M.

Para purificar las proteínas de interés de la mezcla de expresión *in vitro*, tanto la proteína de 30 kDa de G1 como la esperada de 72 kDa correspondiente a la proteína completa codificada por G1, se utilizó 1 ml proveniente de la solución de reacción y 500 µl de suspensión que se recolectó al lavar el compartimiento de reacción. Se centrifugaron por 10 min a 14.000 rpm, luego la suspensión de 1 ml se lavó 2 veces con 1 ml de cada tampón y la suspensión de 500 µl con 500 µl de cada tampón. Los tampones en orden de utilización fueron tampón Tris, urea 2M, urea 4M, urea 6M en tampón Tris y tampón Tris. En el caso de las proteínas insolubles en urea después del

último lavado con Tris, los precipitados fueron resuspendidos en 50 y 200  $\mu$ l de SDS al 0,3% respectivamente y luego calentados por 10 min las muestras a 70°C. La suspensión se agitó manualmente y se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min. El sobrenadante se guardó a -20°C. A el precipitado residual se le aplicó el mismo procedimiento con 2,3% de SDS y el sobrenadante se guardó a -20°C.

#### **10. Inmunización de ratones con las proteínas recombinantes y obtención de anticuerpos monoclonales**

Se inmunizaron 3 ratones Balb/c con cada proteína inyectándolos intraperitonealmente con aproximadamente 50  $\mu$ g a 80  $\mu$ g de proteína obtenida a partir de los segmentos amino y carboxilo de G1 y G2 en 200  $\mu$ l de una emulsión con el adyuvante de Freund completo para aumentar la respuesta en la primera inyección y en las inyecciones posteriores a los días 14 y 28 con el adyuvante de Freund incompleto. Diez días después de la última inyección se hizo una sangría para determinar el título de los anticuerpos mediante ELISA. De esta manera se determinó cuales de los ratones presenta la mejor respuesta inmune humoral. Para realizar la fusión y producir los anticuerpos monoclonales se utilizó el protocolo de Köhler y Milstein, (1975).

Estos ratones se sacrificaron y el bazo extraído y puesto en una solución GKN (8g NaCl, 0.4g KCl, 1.77g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0.69g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 2g glucosa, 0.01g rojo fenol; pH 7.1 por litro, esterilizada por filtración) para extraer los linfocitos. En una proporción  $10^8$  a  $5 \times 10^7$  se mezclaron posteriormente los linfocitos esplénicos con células mieloides de la línea no secretora NSO/2. Para la fusión se usó PEG 4000 al 50% en

GKN Erhlich y cols, (1982). Finalmente los hibridomas obtenidos fueron puestos en medio HAT (hipoxantina  $10^{-4}$ , aminopterina  $4 \times 10^{-5}$  y timidina  $6 \times 10^{-5}$ ) y distribuidos en placas de poliestireno de a 100  $\mu$ l.

El procedimiento se realizó en colaboración con Adolfo Jamett y Juanita Bustamante de BiosChile IGSA.

### **11. Análisis de la respuesta inmune mediante ELISA**

La reacción se realizó en placas de 96 pocillos con fondo plano recubiertos con pegotina. Para esto a cada pozo se agregó una solución 3  $\mu$ g/ml de pegotina en ácido acético 0,1%, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, se descartó el contenido de los pozos dejando secar 1 hora a 37°C. Las placas se cubrieron y guardaron a 4°C para posteriormente ser activadas con 50  $\mu$ l por pozo de una solución de la proteínas recombinantes producidas en esta tesis 10  $\mu$ g/ml diluida en PBS y mantenidas por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de este tiempo el contenido fue eliminado de los pozos y la placa secada para ser luego bloqueada con 50  $\mu$ l de caseína-sacarosa al 2% diluida en PBS e incubada por una hora a temperatura ambiente. Los sueros ensayados fueron diluidos seriadamente en la mitad en caseína sacarosa partiendo en la primera columna con una relación de 1:4 (25  $\mu$ l de anticuerpo con 75  $\mu$ l de caseína-sacarosa al 2%). La placa se incubó 1 hora a 37°C y se lavó 3 veces con 350  $\mu$ l de una solución de PBS con Tween 20 0,02% durante 5 min. Como segundo anticuerpo se utilizaron 50  $\mu$ l por pozo de anti IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina desarrollado en cabra (KPL) diluido 1:1000 en la solución de bloqueo caseína-sacarosa 2% y se incubó por 30 min.

Luego se realizaron 4 lavados de 5 min con PBS con Tween 20 al 0,02% a temperatura ambiente. Para revelar se agregaron 50  $\mu$ l de una solución de parafenilfosfato 1 mg/ml diluido en tampón FAL (100 mM NaCl, 100 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 9.5) y se incubó 30 min. Para detener la reacción, se utilizaron 50  $\mu$ l de NaOH 3N por pozo. Una vez detenida la reacción la placa se leyó en el lector de ELISA ELX 800 de Biotek Instruments Inc a 405nm.

## **12. Análisis de proteínas por la técnica de *Immunoblot***

Para la detección de las proteínas recombinantes purificadas o de las proteínas presentes en los extractos celulares se utilizaron los sueros policlonales y los anticuerpos monoclonales obtenidos contra las glicoproteínas recombinantes. Las proteínas se sometieron a una electroforesis en condiciones desnaturantes en un gel de poliacrilamida al 12,5% y luego se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45  $\mu$ m, durante 1 h a 100 V en tampón de transferencia (Tris-base 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0,1%, metanol al 20%, pH 8). La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0,02% durante 1 hora. Luego se incubó con el primer anticuerpo. Si éste es policlonal de conejo se utilizó a una dilución de 1:100. Si se trata de un anticuerpo monoclonal se utilizó a una dilución de 1:1.000, en el caso de los sueros humanos éstos fueron utilizados a una dilución 1:200. En ambos casos se diluyeron en leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0,02% y la mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Antes de agregar el segundo anticuerpo, la membrana fue lavada 3 veces por 10 min con TBS Tween 20 al 0,02%.

Como segundo anticuerpo se utilizó respectivamente anti-inmunoglobulina humana conjugada a peroxidasa desarrollada en conejo, a una dilución de 1:2.000 o anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa desarrollada en cabra, a una dilución de 1:5.000. Las diluciones se realizaron en leche descremada al 2,5% en TBS-Tween 0,01%. La incubación se realizó por 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Luego la membrana se lavó 3 veces por 10 min con TBS-Tween al 0,02%.

Para el revelado se usaron 2 sustratos, el primero con una mayor sensibilidad fue el sustrato de peroxidasa para quimioluminiscencia del kit Super signal® West Pico chemiluminiscent de Pierce según las indicaciones recomendadas por el fabricante. En un cuarto oscuro se incubó la membrana con sustrato durante 5 min y luego se expuso a la placa autoradiográfica durante 1 a 10 min según fue necesario. Posteriormente la placa se reveló utilizando revelador fotográfico Kodak, se lavó con agua y luego se fijó con solución fijadora Kodak. El segundo sustrato fue el precipitante 4-cloro-1-naftol, donde se agregó 30 ml de TBS 1X en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por cada 18 mg del sustrato diluido en 6 ml de metanol y se incubó con agitación a temperatura ambiente hasta la aparición de bandas.

### **13. Inmunofluorescencia**

Se utilizaron portaobjetos con células Vero E6 infectadas y no infectadas. Estos se incubaron 1 hora con anticuerpos monoclonales anti G2 $\alpha$  y G2 $\beta$ , en una dilución 1:100 en caseína sacarosa al 2% (caseína 2%, sacarosa 2% en PBS) y los sobrenadantes de hibridomas sin dilución, ambos a temperatura ambiente. Después, se lavó 3 veces con

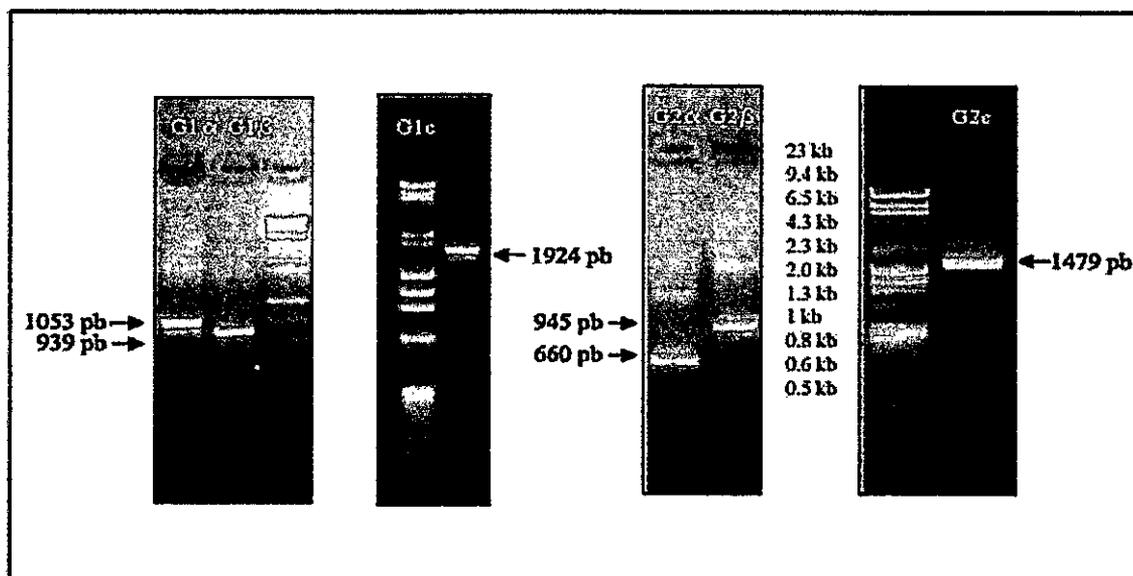
PBS y se incubó con anti IgG de ratón Fc específico conjugado con FITC en caseína sacarosa al 2% por 20 min a 37°C. Posteriormente, se lavó 2 veces con PBS y luego con H<sub>2</sub>O y finalmente se agregó DABCO (2.5% DABCO en glicerol 90%).

## RESULTADOS

### 1. Diseño y construcción de plasmidios que codifican las proteínas G1 y G2 fusionadas a Trx.

La secuencia de las zonas codificadoras de G1 y G2, incluyendo sus extremos amino ( $\alpha$ ) y carboxilo ( $\beta$ ), fueron obtenidos de la secuencia de cDNA del segmento M del aislado ANDV CHI-7913 que ha sido previamente aislado y clonado en este laboratorio (Tischler y cols., 2003).

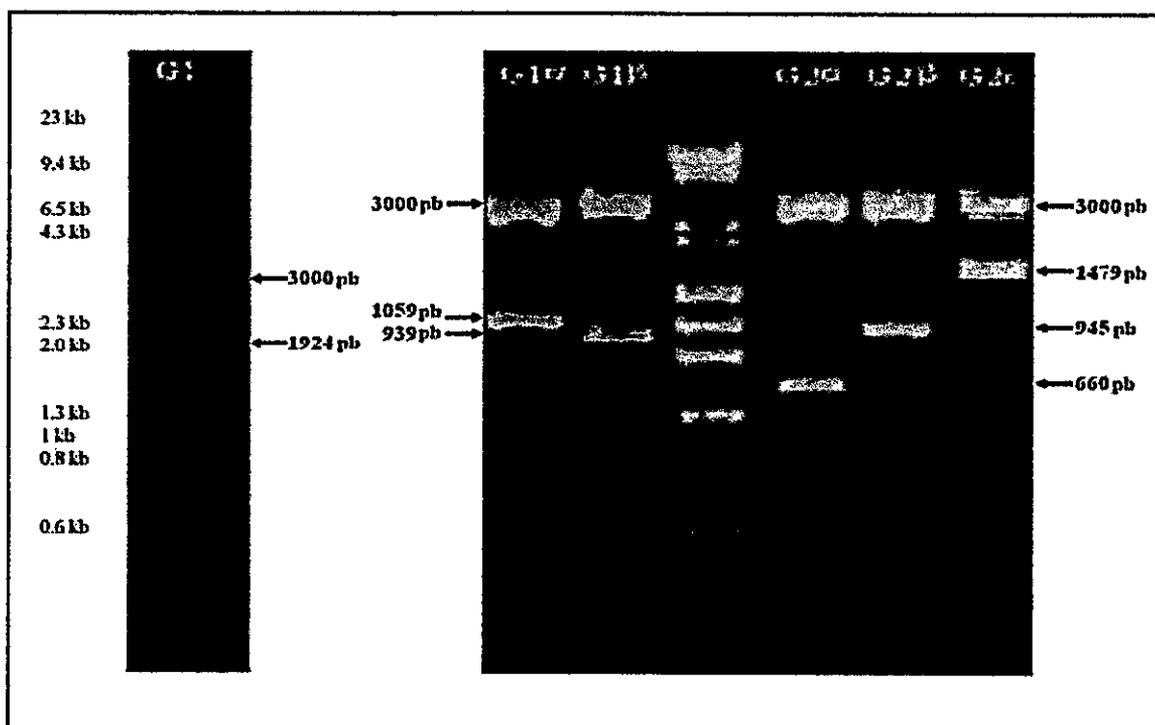
Mediante el uso de PCR y partidores específicos incluyendo sitios de restricción (ver Tabla 1) se obtuvo la amplificación de las regiones codificadoras de las glicoproteínas completas y también de cada una en dos fragmentos.



**FIGURA 3.** Electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos correspondientes a los dominios amino (G1 $\alpha$  y G2 $\alpha$ ) y carboxilo (G1 $\beta$  y G2 $\beta$ ) obtenidos por PCR a partir de los clones de G1 y G2.

Donde G1c posee 1924 pb, G1 $\alpha$  posee 1059 pb, G1 $\beta$  939 pb, G2c 1479 pb, G2 $\alpha$  660 pb y G2 $\beta$  945 pb.

Los productos de PCR (G1 $\alpha$ , G1 $\beta$ , G1c, G2 $\alpha$ , G2 $\beta$  y G2c) fueron ligados en el vector pGEM-T, dando origen a los plásmidos pGEM-T/G1c, pGEM-T/G1 $\alpha$ , pGEM-T/G1 $\beta$ , pGEM-T/G2c, pGEM-T/G2 $\alpha$  y pGEM-T/G2 $\beta$ . El clonamiento fue analizado por electroforesis en geles luego de digestión con nucleasas de restricción. Los resultados se muestran en la Figura 4.



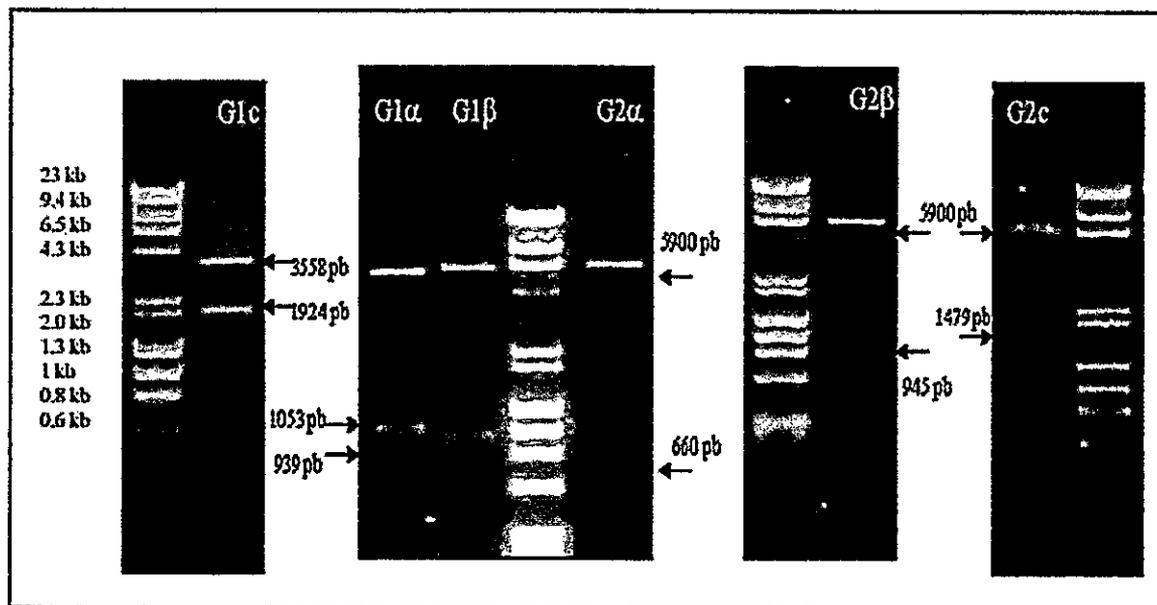
**FIGURA 4.** Electroforesis en geles de agarosa de los productos de la digestión de los plásmidos derivados del vector pGEM-T con las enzimas de restricción *NotI* y *Sall*.

Donde G1 $\alpha$  posee 1059 pb, G1 $\beta$  939 pb, G1c 1924 pb, G2 $\alpha$  660 pb, G2 $\beta$  945 pb y G2c 1479 pb.

La secuencia de cada una de las regiones codificadoras de las glicoproteínas obtenida fue verificada por secuenciación automática con los partidores M13. Al compararla con la secuencia publicada en la base de datos de NCBI *Gene Bank* del ANDV CHI-7913

(n°AY 228238) se concluyó que no habían cambios nucleotídicos. Posteriormente, se prosiguió a ligar los fragmentos digeridos con *Not* I y *Sal* I en el vector de expresión pET32a(+) digerido con las mismas enzimas para G1 $\alpha$  (1059 pb), G1 $\beta$  (939 pb), G2 $\alpha$  (660 pb), G2 $\beta$  (945 pb) y G2c (1479 pb) . Los resultados del análisis de los plasmidios resultantes luego de la transformación de *E.coli* se muestran en la Figura 5.

En el caso de G1c la digestión preparativa se hizo con *Not* I y *Xho* I para obtener el inserto y clonarlo en el vector de expresión *in vitro* pIVEX 2.4c digerido con estas mismas enzimas. El constructo digerido se muestra en la Figura 5.



**FIGURA 5.** Análisis por electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos resultantes de la digestión de las construcciones pET-32a (+)/G1 $\alpha$ , pET-32a (+)/G1 $\beta$ , pET-32a (+)/G2 $\alpha$ , pET-32a (+)/G2 $\beta$ , pET-32a (+)/G2c digeridos con las enzimas de restricción *Not* I y *Sal* I y pIVEX 2.4c/G1c con las enzimas *Xho* I y *Not* I.

El tamaño de los vectores de expresión son 5900 nt para pET-32a (+) y 3558 nt para pIVEX 2.4c. El tamaño de los fragmentos liberados por digestión es G1c 1924 nt, G1 $\alpha$  1059 nt, G1 $\beta$  939 nt, G2c 1479 nt, G2 $\alpha$  660 nt y G2 $\beta$  945 nt.

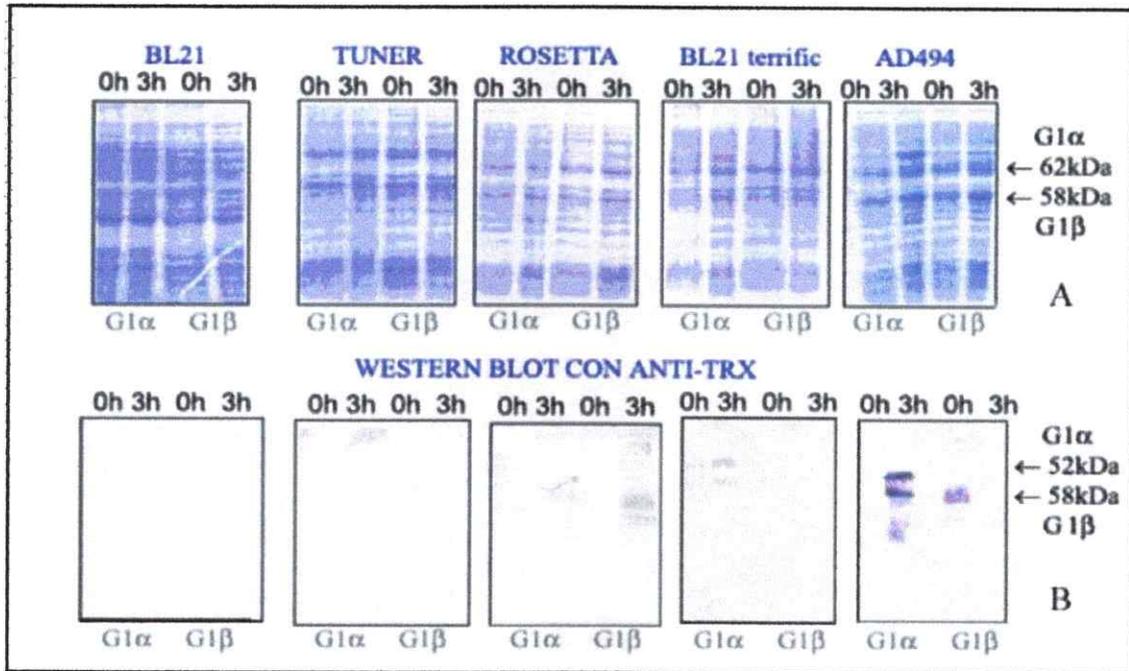
## 2. Síntesis de las proteínas G1 y G2 recombinantes y detección por anticuerpos anti-Trx.

Para la expresión, de G1 se utilizaron los fragmentos N-terminal de 1059 pb (Met1-Val353) llamado G1 $\alpha$  y C-terminal de 939 pb (Phe338-Val651) llamado G1 $\beta$ , ambos superpuestos en 45 pares de bases. Estos fragmentos clonados en pET-32a(+) dieron origen a los constructos pET-32a(+)/G1 $\alpha$  y pET-32a(+)/G1 $\beta$  los cuales se utilizaron para transformar la cepa bacteriana BL21 (DE3). La expresión de estos genes se indujo por 3 horas con IPTG. No se visualizó un aumento de síntesis de un producto proteico en un gel de acrilamida al 12,5%, teñido con azul de Coomassie (Figura 6).

Anticuerpos monoclonales dirigidos contra péptidos sintetizados previamente en el laboratorio contenidos dentro de la secuencia de G1 y contra la proteína de fusión Trx no fueron capaces de detectar expresión de proteínas en ensayos de *Immunoblot*. Debido a esto se estudió la síntesis de estos constructos en otras cepas de *E. coli* tales como AD494 (DE3)pLysS, Tuner (DE3)pLysS y Rosetta (DE3)pLysS.

Transformantes obtenidos a partir de estas cepas fueron crecidas e inducidas por 3 horas con medio fresco con los antibióticos correspondientes. Mediante electroforesis en geles teñidos con azul de Coomassie y *Immunoblot* revelado con anticuerpo anti-Trx se detectó la expresión de las proteínas G1 $\alpha$  y G1 $\beta$  de 62 kDa y 58 kDa en las cepas Rosetta, BL21 realizando la inducción con el medio *Terrific* y en la cepa AD494 (Figura 6). Para el estudio de G1 $\alpha$  y  $\beta$  se transfirieron a las membranas replicas de los geles teñidos con azul de Coomassie de las inducciones en las distintas cepas bacterianas de las cuales se cargó 25  $\mu$ g de proteína total y se usó anticuerpo contra la proteína de fusión Trx,

apreciándose que con la cepa AD494 la expresión es más eficiente (Figura 6) (Lisbona, F y cols., 2003).



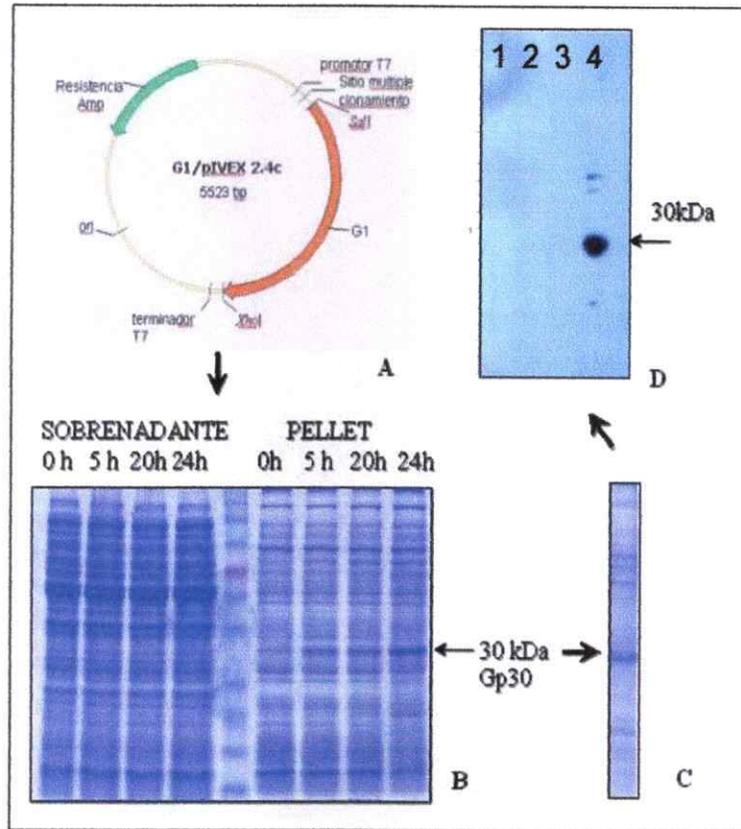
**Figura 6.** Expresión de G1α y G1β, utilizando distintas cepas de *E. coli*.

El estudio se realizó con 25 μg de proteína total. A. Electroforesis en geles de acrilamida de las inducciones de las distintas cepas de *E. coli* teñidos con azul de Coomassie. B. Inmunoblot con anticuerpo anti-Trx de las inducciones de las distintas cepas de *E. coli* transformadas.

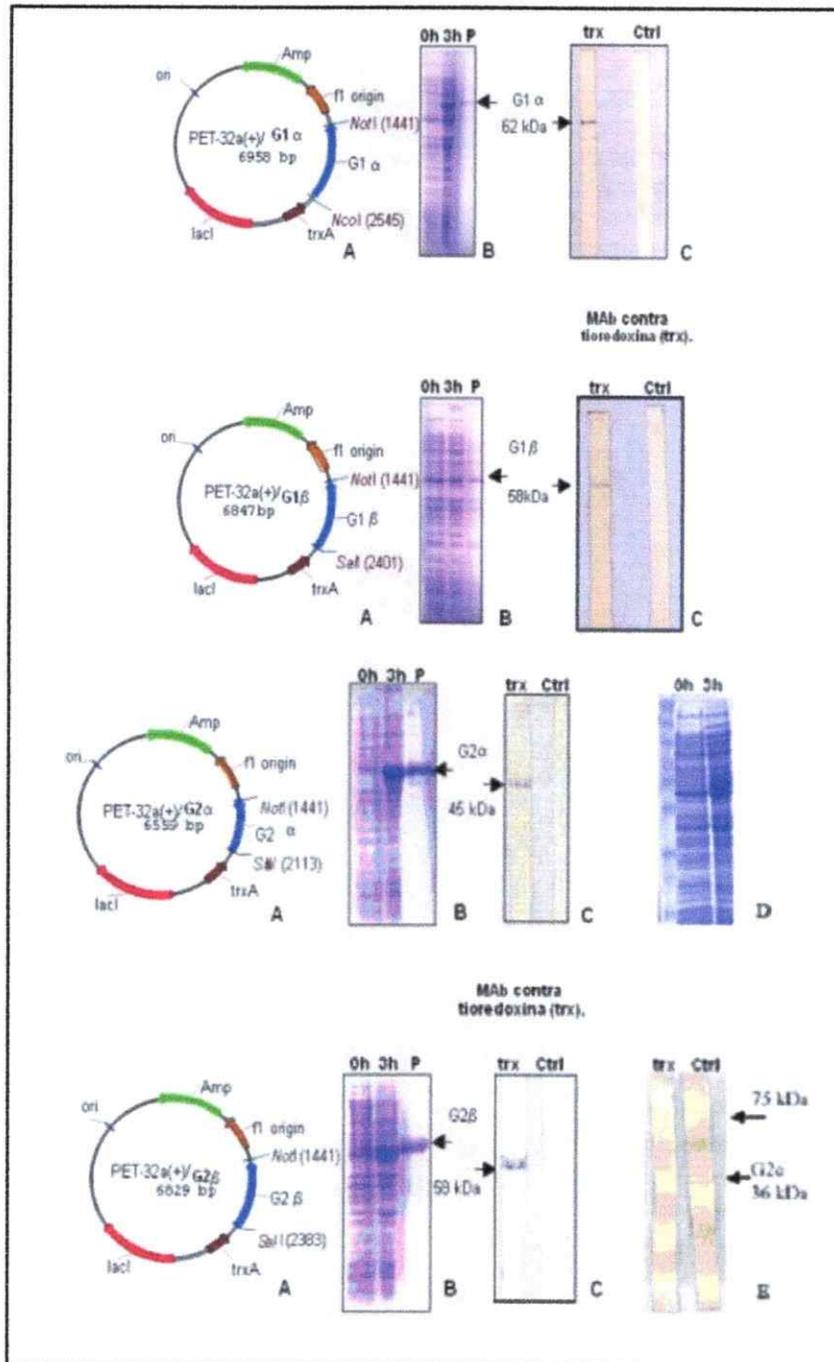
Para la obtención de G1 completo se empleó el sistema de expresión *in vitro* RTS 500 de Roche. Para esto se utilizó el fragmento G1 completo, clonado en el vector pIVEX 2.4c (Figura 7A) como se describe en Materiales y Métodos. El sistema se incubó por 24 horas a 30°C. Se tomaron alícuotas a los tiempos 0, 5, 20 y 24 horas para observar el progreso de la reacción y se cargaron alícuotas en un gel de poliacrilamida. Los resultados se muestran en la Figura 7B. Desde el tiempo 5 horas existe un aumento de la

expresión de un péptido de 30 kDa correspondiente a 253 aminoácidos de la parte N-terminal en lugar de la proteína esperada de 72 kDa. Para comprobar que durante la expresión *in vitro* que el péptido de 30 kDa (Gp30) corresponde a un trozo de la glicoproteína 1 se realizó un inmunoblot con anticuerpos monoclonales contra péptidos de G1, dando positivo con el anticuerpo monoclonal 1C12 que esta dirigido contra aminoácidos del 11-30 de G1.

Para la expresión de G2 se utilizaron los fragmentos N-terminal de 660 pb (Ala<sup>1</sup>-Cys<sup>219</sup>) denominado G2 $\alpha$  y C-terminal de 945pb llamado G2 $\beta$  (Pro<sup>182</sup>-Val<sup>491</sup>), ambos superpuestos en 111 pb. Estos fragmentos clonados en pET-32a (+) dieron origen a los constructos pET-32a (+)/G2 $\alpha$  y pET-32a (+)/G2 $\beta$  (Figura 8A). Los cuales se utilizaron para transformar la cepa *E. coli* BL21(DE3). Las bacterias transformadas resultantes se indujeron por 3h y se obtuvo una alta expresión de productos de tamaños esperados de 45kDa y 58 kDa respectivamente, como se puede observar en los geles de Coomassie (Figura 8B). Estas proteínas fueron reconocidas por anticuerpos anti Trx en *Inmunoblot* (Figura 8C).



**FIGURA 7.** Expresión de la proteína G1 *in vitro*: vector, purificación y *Inmunoblot*. **A** vector de expresión *in vitro* pIVEX 2.4c, **B** distribución de Gp30 en el sobrenadante y precipitado a los tiempos 0, 5, 20 y 24 horas, **C** purificado Gp30, **D** inmunoblot con anticuerpos monoclonales anti péptidos de G1: 1) anti péptido G1.11 (aa 194-223) 4F8/D6, 2) anti péptido G1.12 (aa 285-314) 1D6/D3 3) anti péptido G1.13 (aa 311-340) 5F2/F5, 4) anti péptido G1.8 (aa 11-30) 1C2/C3.

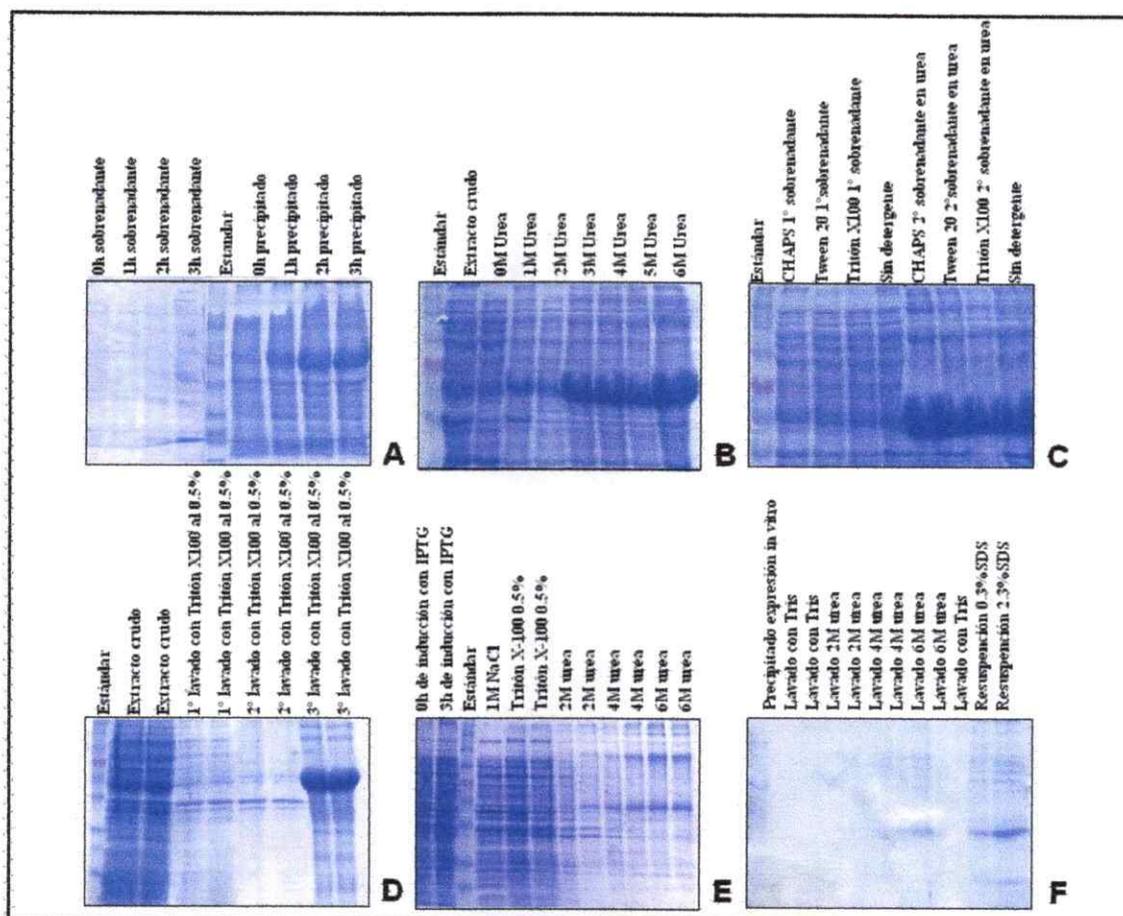


**FIGURA 8.** Clonamiento, expresión y purificación de las proteínas G1 $\alpha$ , G1 $\beta$ , G2 $\alpha$  y G2 $\beta$ .

**A.** Esquema de los fragmentos  $\alpha$  y  $\beta$  de las glicoproteínas 1 y 2 del virus AND CHI-7913 en el vector de expresión pET 32a (+). **B.** Esquema de la expresión en *E. coli* (3h), purificación parcial (P). **C.** Reactividad de *Immunoblot* con anticuerpo anti-Trx de las glicoproteínas recombinantes G1 $\alpha$ , G1 $\beta$ , G2 $\alpha$  y G2 $\beta$ . **D.** Esquema de la expresión de G2c en *E. coli* a tiempo 0 h y 3h. **E.** Reactividad de *Immunoblot* con anticuerpo anti-Trx de las glicoproteínas recombinantes G2c.

### 3. Purificación de las proteínas G1 y G2

Con la finalidad de purificar las proteínas expresadas, se determinó si las proteínas se encontraban en la fracción celular insoluble (pella) o en la fracción soluble (sobrenadante). Este análisis se muestra ejemplificado en la Figura 9. Los resultados indican que las proteínas se encuentran mayormente insolubles.



**FIGURA 9.** Electroforesis en gels de proteínas de extractos bacterianos en distintas etapas de purificación.

**A)** Distribución de la proteína en pella y sobrenadante (carril de 1 a 4 distribución de 0 a 3 horas en el sobrenadante, 6 a 9: distribución de 0 a 3 horas en el precipitado), **B)** Estudio de solubilidad (1: Standard, 2: extracto crudo, 3 a 9: disolución en urea de 0 a 6M) **C)** Estudio de prelavado (2: CHAPS 1° sobrenadante, 3: Tween 20 1° sobrenadante, 4: Tritón-X100 al 0,5% 1° sobrenadante, 5: sin detergente 1° sobrenadante 6: 2° sobrenadante en urea 6M luego de lavar con CHAPS, 7: 2° sobrenadante en urea 6M luego de lavar con Tween 20, 8: 2° sobrenadante en

urea 6M luego de lavar con Tritón-X100 al 0,5%, 9: sin detergente 2° sobrenadante), D) Purificación de G2 $\beta$  (2 y 3: extracto crudo, 4 y 5: 1° lavado con Tritón-X100 al 0.5%, 6 y 7: 2° lavado con Tritón-X100 al 0.5%, 8 y 9: 3° lavado con Tritón-X100 al 0,5%). E) Ejemplo de purificación de G1 $\beta$  (1: 0 horas de inducción con IPTG y 2: 3 horas de inducción con IPTG, 4: 1M NaCl, 5 y 6 Tritón-X100 0.5%, 7 y 8: 2M urea, 9 y 10: 4M urea, 11 y 12: 6M urea F purificación de Gp30 (1: pella expresión *in vitro*, 2 y 3: lavado con Tris, 4 y 5: lavado 2M urea, 6 y 7: lavado 4M urea, 8 y 9: lavado M urea, 10 y 11: lavado con Tris, 12: resuspensión 0,3 % SDS, 13: resuspensión 2,3 % SDS).

Como paso siguiente se procedió a estudiar métodos de solubilización. El precipitado se resuspendió en concentraciones crecientes desde 0 a 6M de urea. Los resultados se muestran en la Figura 9B. Las cuatro proteínas se disuelven en una mayor concentración de urea que en este caso corresponde a urea 6M. También se realizó un estudio del efecto de un prelavado de los precipitados con los detergentes CHAPS, Tween-20 y Tritón-X100 a una concentración del 0,5%, con el objeto de limpiar la proteína de interés de otras proteínas que son más solubles en el detergente como aquellas unidas a restos de membrana. Una vez lavadas los precipitados fueron resuspendidas en urea 6M. El mejor prelavado se obtuvo con detergente Tritón-X100 (Figura 9C).

Para el protocolo se establecieron como mínimo 2 lavados con Tritón-X100 antes de la resuspensión en urea 6M (Figura 9D).

A modo de ejemplo, en la Figura 9E se presenta un gel de acrilamida al 12.5%, teñido con azul de Coomassie de los distintos pasos utilizados en la purificación de G1 $\beta$ .

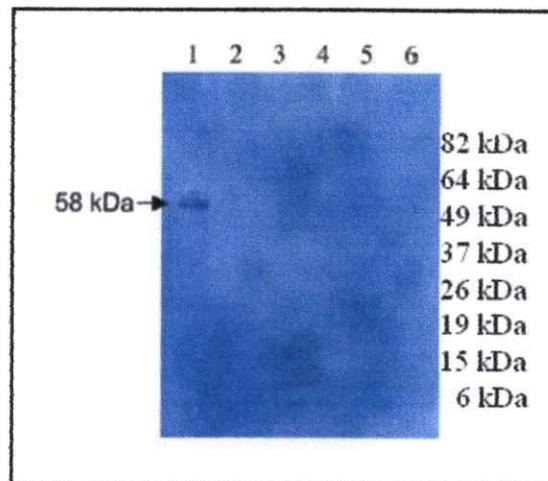
En el caso de la expresión *in vitro*, la proteína de 30 kDa correspondiente a G1 se solubilizó en 2,3% SDS en PBS y se separó por electroforesis en un gel de acrilamida al 12,5%, del cual se cortaron las bandas de interés. Estas bandas recortadas de la proteína

obtenida de 30 kDa junto con la proteína esperada cortando en el rango de (50-72 kDa) se utilizaron en la preparación de anticuerpos monoclonales.

#### 4. Caracterización de las proteínas G1 y G2 recombinantes.

##### A) Con sueros de pacientes.

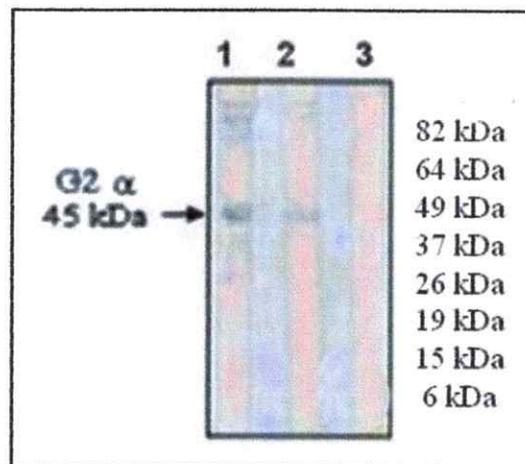
La primera proteína recombinante en producirse fue G2 $\beta$  y solamente se realizó inmunoblot con sueros de pacientes para esta proteína, siendo reactivo solo en el suero de un paciente (Figura 10). Paralelamente, en el laboratorio se realizó ELISA contra las glicoproteínas producidas en esta tesis con sueros humanos y de ratones infectados, para ver su reactividad. Reaccionaron solo algunos con las mitades amino G2 $\alpha$  y carboxilo G2 $\beta$  de la glicoproteína 2 y ninguno con la mitades amino G1 $\alpha$  y carboxilo G1 $\beta$  de la glicoproteína 1 (Tischler y cols., 2003).



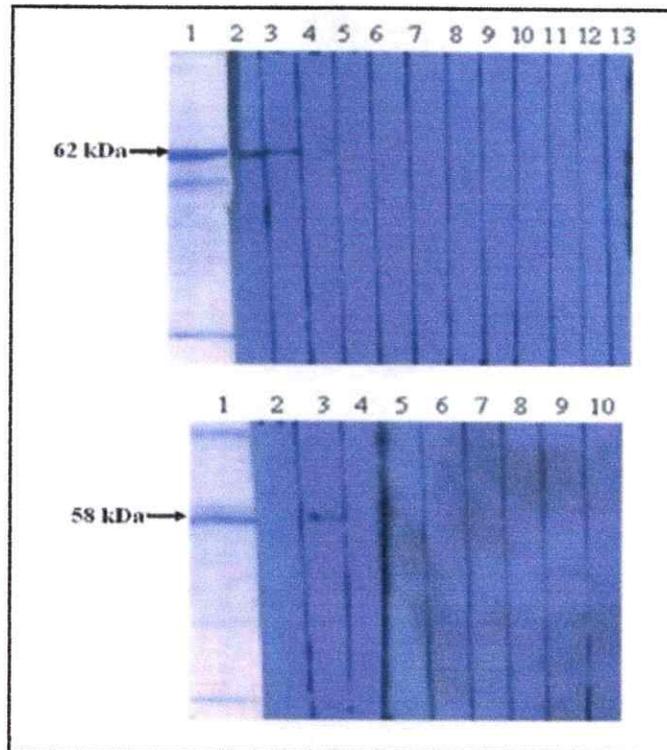
**FIGURA 10.** Análisis por *Inmunoblot* de G2 $\beta$  con sueros de 6 diferentes pacientes infectados con Hanta.

### B) Con anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales anti péptidos

Para G2 $\alpha$  se realizó un *Inmunoblot* con anticuerpos anti-Trx y con suero policlonal de conejo anti péptido (aa25-51) llamado G2.6. Se ocuparon también anticuerpos contra péptidos de G1, dando 2 (16,7%) positivos de 12 para G1 $\alpha$  : anti péptido G1 (aa 58-87) llamado 3C7/B10, anti péptido G1 (aa 58-87) llamado 3G3/D11 y 1 (14,7%) positivo de 7 para G1 $\beta$ : anti péptido G1.6 (aa 411-424) llamado 4E5/H10 (Figura 12A y B).



**FIGURA 11.** *Inmunoblot* de G2 $\alpha$  con suero policlonal de conejo anti G2 $\alpha$ . (1:suero policlonal de conejo, 2: Trx, 3: irrelevante no reconoce el epítoto).



**FIGURA 12.** *Inmunoblot* de G1 $\alpha$  y G1 $\beta$  Con anticuerpos monoclonales contra péptidos de G1. **A)** *Inmunoblot* de G1 $\alpha$  con anticuerpos monoclonales contra péptidos de G1, **1:** purificado de G1 $\alpha$  tinción Coomasie, **2:** anti G1(aa 58-87)3C7/B10, **3:** anti G1 (aa 58-87) 3G3/D11, **4:** anti G1(aa 58-87) 3F3/H2, **5:** anti G1.8 (aa 11-30) 1C12/C3, **6:** anti G1.9 (aa 127-146) 2B12/D6, **7:** anti G1.11 (aa 194-223) 4F8/D6, **8:** anti G1.12 (aa 285-314) 1D6/C3, **9:** anti G1.12 (aa 285-314) 2F12/B2, **10:** anti G1.13 (aa 311-340) 9B2/G10, **11:** anti G1.13 (aa 311-340) 9B2/B11, **12:** anti G1.13(aa 311-340) 5F2/F5, **13:**G1p30 E5/B9. **B)** *Inmunoblot* de G1 $\beta$  con anticuerpos monoclonales contra péptidos de G1, **1:** purificado de G1 tinción Coomassie, **2:** anti G1.6 (aa 411-424) 1D10/F12, **3:** anti G1.6 (aa 411-424) 4E5/H10, **4:** anti G1.7 (aa 603-223) 5D8/D3, **5:** irrelevante, **6:** anti G1.7 (aa 603-615) 6B10, **7:** anti G1.7 (aa 603-615) 3C6, **8:** anti G1.7 (aa 603-615) 4D12, **9:** anti G1.7 (aa 603-615) D11.

### 5. Preparación de anticuerpos monoclonales contra las proteínas G1 y G2.

Con el propósito de generar anticuerpos monoclonales se inmunizaron 3 ratones Balb/c por cada proteína recombinante con 3 dosis de antígeno de aproximadamente 50  $\mu$ g de proteína G1 $\alpha$ , G1 $\beta$ , G2  $\alpha$  y 80  $\mu$ g de G2 $\beta$  cada 15 días. Para G1c se realizó la inmunización con 400  $\mu$ g en 4 trozos de gel para el polipéptido G1p30, también se

inmunizó con 200 µg de las proteínas que abarcan de 50-72 kDa en cuatro trozos de gel de acrilamida al 12,5% de un espesor de 1,5 mm al igual que para el péptido de 30 kDa. Pasados 10 días de la tercera inmunización, el suero de los ratones inmunizados se analizó por Elisa con el fin de determinar con cual de los ratones seguir para la fusión. En el caso de las varias proteínas de G1c obtenidas de la expresión *in vitro* se observó en la respuesta terciaria que las proteínas entre 50-72 kDa no producen respuesta pareciéndose al suero preinmune por lo que se continuó con el proceso solo con los ratones que fueron inmunizados con la proteína de 30 kDa (Anexo).

## **6. Caracterización de los anticuerpos monoclonales contra las proteínas G1 y G2.**

### ***A. Inmunoblot***

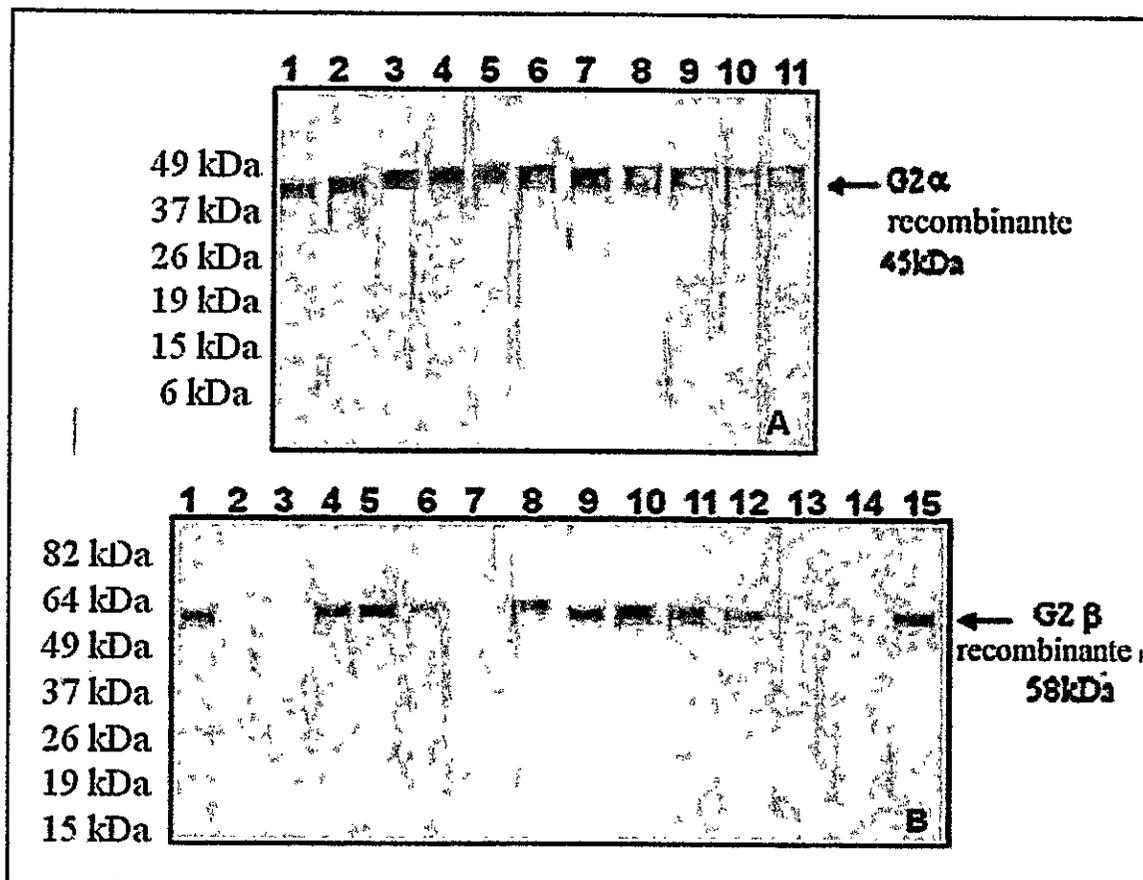
Se realizó un *Inmunoblot* de G2 $\alpha$  con 11 líquidos ascíticos dando todos positivos (100%) (Figura 13A).

Para el caso de G2 $\beta$  recombinante sin digerir con sobrenadantes de ascíticos y esto fue revelado por el método colorimétrico con 10 anticuerpos monoclonales positivos de 15 (66,7%): 1) 3A8/G3, 4) 3H5/F9, 5) 5A8/H7, 6) 5A10/E5, 8) 5D8/H11, 9) 5G4/F9, 10) 6C5/D12, 11) 6D6/H3, 12) 6H1/H9, 15) 7H4/A6 (Figura 13B).

Para la caracterización de los anticuerpos parentales contra G2 $\beta$ , la glicoproteína G2 $\beta$  recombinante fue digerida con enteroquinasa para separar la proteína de fusión Trx y de esta manera verificar si los sobrenadantes de hibridomas reaccionan con el fragmento glicoproteico de interés o con Trx, aunque durante el proceso de producción de los anticuerpos monoclonales ya se había descontado los anticuerpos reactivos con Trx

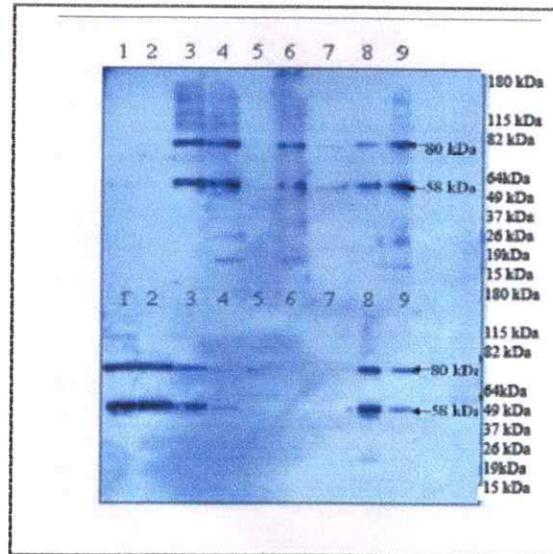
pero solo en ELISA. La visualización de las bandas proteicas se realizó por quimioluminiscencia ya que este método es más sensible que el método de revelado colorimétrico.

Como se puede observar en la Figura 14, 12 de 18 (66,7%) sobrenadantes de hibridomas contra G2 $\beta$  reaccionaron con una banda de 58 kDa correspondiente a la proteína G2 $\beta$  sin el segmento de fusión, 10 (55,5%) de ellos con mayor intensidad y 2 (11,1%) de ellos con menor intensidad. Esto pudo observarse en la película de revelado del inmunoblot de G2 $\beta$  digerido donde se ve una banda de aproximadamente 80 kDa que corresponde a G2 $\beta$  más la proteína de fusión de 22 kDa y otra más abajo de 58 kDa que es la proteína G2 $\beta$  sin la proteína de fusión. Uno de los sobrenadantes mostró una banda solo a los 80 kDa lo que nos podría indicar que esta reconociendo un sector de la proteína comprendido en la unión de la proteína y el Trx, ya que no reacciona con G2 $\beta$  y Trx solos. En los cinco (27,8%) sobrenadantes de hibridomas restantes no se observó reactividad con bandas, con lo que no se puede descartar que reconocen G2 $\beta$  sin el segmento de fusión. (Figura 14).



**FIGURA 13.** *Immunoblot* de G2α y G2β con anticuerpos monoclonales.

**A** *Immunoblot* de G2α con anticuerpos monoclonales contra G2α (1: 1B5/E9, 2: 2H4/F6, 3: 3H4/G8, 4: 5D11/G7, 5: 6B2/B12, 6: 6C6/D5, 7: 6C9/F6, 8: 6H7/E4, 9: 8A2/E10, 10: 8E1/G3, 11: 9A/6C11). **B** *Immunoblot* de G2β con anticuerpos monoclonales contra G2β.(1: 3A8/G3, 2: 3D3/H1, 3: 3F10/H8, 4: 3H5/F9, 5: 5A8/H7, 6: 5A10/E5, 7: 5B5/H4, 8: 5D8/H11, 9: 5G4/F9, 10: 6C5/D12, 11: 6D6/H3, 12: 6H1/H9, 13: 7A9/H4, 14: 7D7/F4, 15: 7H4/A6).



**Figura 14.** Caracterización anticuerpos parentales contra G2 $\beta$ .

*Immunoblot* de G2 $\beta$  digerido con enteroquinasa con sobrenadantes de hibridoma (arriba anticuerpos: 1: 3A8, 2: 3D3, 3: 3F10, 4: 3H5, 5: 4C3, 6: 5A8, 7: 5A10, 8: 5B5, 9: 5D8; abajo: 1: 5G4, 2: 6C5, 3: 6D6, 4: 6H1, 5: 7A9, 6: 7A11, 7: 7D7, 8: 7H4, 9: 8B12). 80kDa corresponde a la proteína de fusión de G2 $\beta$ -Trx y 58kDa corresponde a la proteína G2 $\beta$ .

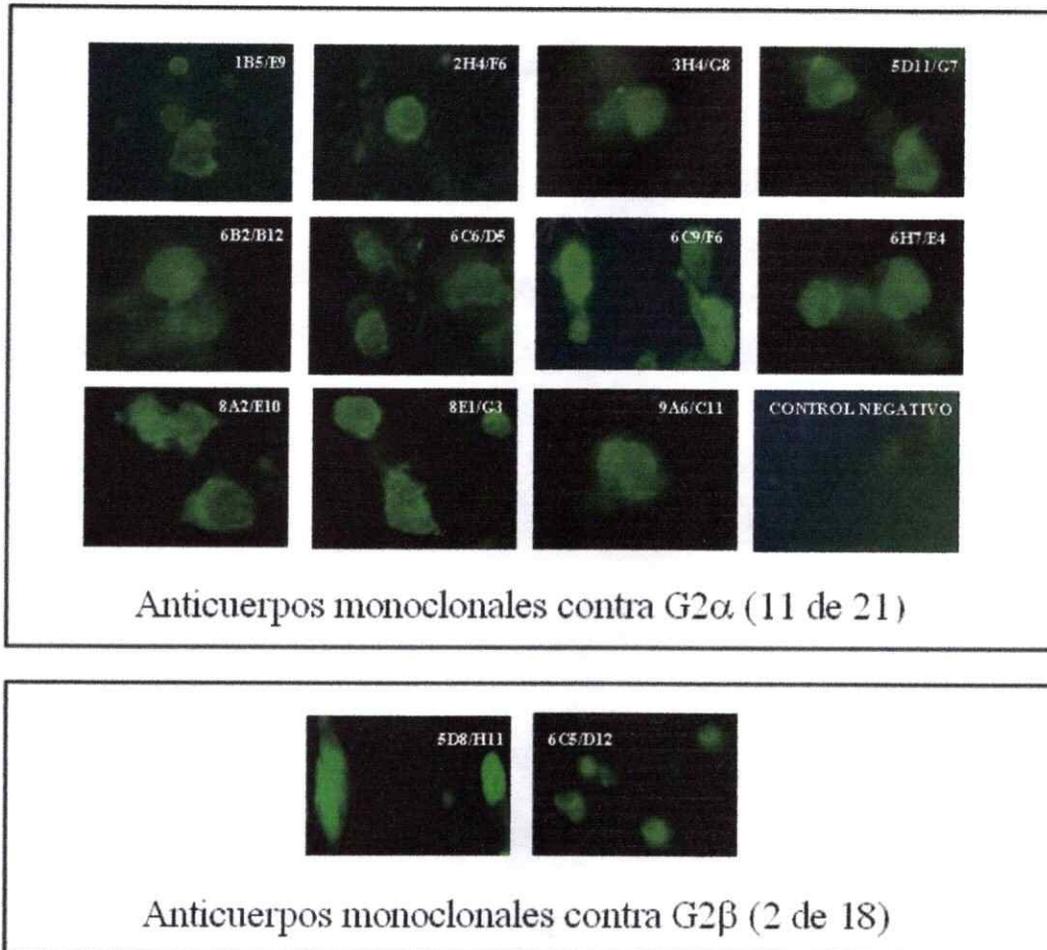
## B. Unión al virus

Con la finalidad de seleccionar los hibridomas a reclonar se realizó un estudio de la capacidad de los anticuerpos a unirse al virus. Para ello, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en portaobjetos con las células Vero E6 infectadas con AND CHI-7913 y las células no infectadas mediante microscopia de fluorescencia.

De 21 hibridomas contra G2 $\alpha$  fusionado con Trx, 15 mostraron reactividad con el virus. Estos 15 fueron reclonados obteniéndose finalmente 11 anticuerpos monoclonales que se unen al virus: 1B5/E9, 2H4/F6, 3H4/G8, 5D11/G7, 6B2/B12, 6C6/D5, 6C9/F6, 6H7/E4, 8A2/E10, 8E1/G3 y 9A6/C11 (Figura 15).

En el caso de los 18 hibridomas contra G2 $\beta$  todos fueron reclonados aun cuando por inmunofluorescencia se determinó que solo 2 (11,1%) de ellos se unen al virus. Estos

anticuerpos monoclonales obtenidos que se unen al virus son: 5D8/H11 y 6C5/D12 (Figura 15).



**FIGURA 15.** Inmunofluorescencias de células Vero E6 infectadas con el virus ANDV CHI-7913 con anticuerpos monoclonales contra G2 $\alpha$  y G2 $\beta$ .

De la letra A a la K inmunofluorescencia realizada con anticuerpos monoclonales contra G2 $\alpha$ , L control negativo de células Vero E6 no infectadas, letras M y N inmunofluorescencia realizadas con anticuerpos monoclonales contra G2 $\beta$  A) 1B5/E9, B) 2H4/F6, C) 3H4/G8, D) 5D11/G7, E) 6B2/B12, F) 6C6/D5, G) 6C9/F6, H) 6H7/E4, I) 8A2/E10, J) 8E1/G3, K) 9A6/C11, L) control negativo, M) 5D8/H11 y N) 6C5/D12.

## DISCUSIÓN

El virus Andes es considerado uno de los virus Hanta más patogénicos, no solo por su índice de mortalidad, sino también por sus posibles vías de transmisión. Padula y cols., (1998) han presentado evidencia molecular de un caso de transmisión persona a persona del virus Andes en Argentina, siendo éste el primer caso en el mundo. La severidad de la enfermedad producida por el virus Andes, la rapidez con que evoluciona, la insuficiencia respiratoria y su alta letalidad, hacen ver la necesidad urgente de estudiar este virus en vías de desarrollar tratamientos y detección rápida ya que hasta la fecha no se cuenta con medicamentos eficaces ni tampoco con un método de detección rápido.

Las glicoproteínas del virus Hanta son importantes debido a la función que cumplen durante los procesos de reconocimiento del receptor celular y por su función en la entrada a la célula luego de la fusión con membranas celulares Ogino y cols., (2004). Se ha sugerido que su unión a los receptores específicos determina el tipo de tejido a ser infectado. Es así como las beta 3 integrinas han sido postuladas como receptores para las glicoproteínas de los virus Hanta patogénicos expresadas principalmente en células endoteliales Gavrilovskaya y cols., (1999).

Es por ello que ha sido de nuestro interés generar glicoproteínas mediante el sistema de expresión en *E. coli*. Este es un método económico, ampliamente conocido y eficaz. El hecho que esta bacteria no produce modificaciones postraduccionales, en este caso glicosilaciones, no es de fundamental importancia puesto que se pensó en trabajar en base a epítomos lineales sobre los cuales se generaría anticuerpos monoclonales. Además, las glicosilaciones que pueden ser producidas en levaduras u otro organismo son distintas a la producida en mamíferos. Paralelamente en el laboratorio se trabajó en

la síntesis de glicoproteínas en levadura y en células de insecto mediante baculovirus recombinantes.

En este trabajo, uno de los objetivos fue aislar, clonar y expresar los genes que codifican para las glicoproteínas del virus Andes CHI-7913 en *E. coli*. Este objetivo se logró plenamente al expresar los fragmentos amino y carboxilo de G1 y G2, los cuales representan la secuencia completa de ambos genes. Una vez sintetizadas las proteínas recombinantes, estas fueron purificadas y se generaron anticuerpos monoclonales contra ellas, cumpliéndose con esto el segundo objetivo. Finalmente los anticuerpos monoclonales fueron caracterizados por inmunoblot y como último objetivo los anticuerpos contra G2 $\alpha$  y G2 $\beta$  también fueron analizados por su capacidad de unión al virus, obteniéndose resultados positivos (Figura 15).

Para cumplir los objetivos propuestos se seleccionaron las regiones genómicas que codifican para las glicoproteínas G1 y G2 de la envoltura del virus Hanta con el objeto de ser utilizados para la síntesis de las proteínas recombinantes correspondientes. Antecedentes previos sugerían que la sobreproducción de las glicoproteínas G1 y G2 completas es ineficiente en bacterias, experiencia también descrita por otros Hjelle y cols. (1997); (Sergio Pichuantes Chiron Corp., comunicación personal). Basado en esta información, ambas glicoproteínas fueron sintetizadas en los segmentos amino y carboxilo con regiones superpuestas para abarcar los posibles epítomos contenidos en la zona de unión de las proteínas. En el caso de G1 estas dos regiones se trataron de expresar en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) induciendo incluso en el medio más nutritivo *Terrific*, logrando una baja síntesis (Figura 6). Consecuentemente, se realizó un estudio

de inducción utilizando distintas cepas de *E. coli*. En este estudio fue posible por *Immunoblot* determinar la eficiencia de las distintas cepas utilizadas ya que se compararon cantidades iguales de proteína total (25 µg).

Esto significa que en la cepa con la cual se detecta la mayor cantidad de síntesis de G1  $\alpha$  y G1 $\beta$  correspondientes a las bandas de 62 kDa y a 58 kDa, respectivamente. Tiene mayor cantidad de la proteína recombinante por cantidad de proteína total (Figura 6). Los resultados de este estudio indicaron que la mejor expresión se logro al expresar G1 $\alpha$  y G1 $\beta$  en la cepa AD494, deficiente en la enzima tioredoxina reductasa. El ambiente en este medio de cultivo es más oxidante lo que facilita la formación de puentes disulfuro entre las proteínas que se acumulan en el citoplasma. Las glicoproteínas de virus Hanta poseen un alto contenido (5,2%) de cisteínas conservadas Antic y cols., (1992) y la formación de puentes disulfuro estabilizan las proteínas recombinantes producidas.

Debido a las dificultades presentadas al expresar los dominios amino y carboxilo de G1 en *E. coli* se realizó la expresión de G1 completo *in vitro*. Al tomar alícuotas para observar el progreso de la síntesis de G1 se apreció desde el tiempo 5 horas el aumento de una proteína de 30 kDa, en lugar de la proteína esperada de 72 kDa (Figura 7). Este menor tamaño puede deberse a la terminación prematura de la traducción posiblemente por la formación de una estructura terciaria del ARNm. Se descartan otras posibilidades tales como degradación proteolítica por la presencia de proteasas en el medio de expresión o sitios de terminación internos por la revisión exhaustiva de la secuencia.

Se considera que el péptido de 30 kDa corresponde a un segmento amino de G1 debido a la reactividad de anticuerpos monoclonales contra un péptido contenido en G1, dando

positivo con el anticuerpo monoclonal 1C12/C3 que reconoce los aminoácidos comprendidos entre residuos 11 y 30 de G1 (Figura 7 D).

Para la glicoproteína 2 las regiones amino y carboxilo fueron expresadas en mayor cantidad y con mayor facilidad que para la glicoproteína 1, lo que puede atribuirse a la menor cantidad de glicosilaciones putativas en comparación con G1 Tischler y cols., (2003). Las glicoproteínas de virus Andes se producen normalmente en eucariontes. El hecho de expresar glicoproteínas en *E. coli* donde no se produce glicosilación resultaría en la inestabilidad de G1 $\alpha$  y G1 $\beta$  recombinantes ya que las glicosilaciones influyen en el plegamiento y solubilidad de las glicoproteínas Koseki, T y cols.,(2006).

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó en base a lavados con detergente y resuspensión en urea sin necesidad de someterlas a otros procedimientos de purificación, ya que a este nivel las proteínas presentaron un grado de pureza apto para generar y seleccionar los anticuerpos monoclonales. Para la expresión *in vitro*, el protocolo seguido fue distinto porque la solubilización fue realizada con SDS. Debido a las pequeñas cantidades obtenidas, se inyectaron las proteínas a los ratones luego de ser cortadas desde un gel de acrilamida (Figura 8).

En la caracterización de las glicoproteínas recombinantes purificadas se realizaron en todos los casos *Immunoblot* con un anticuerpo contra la proteína de fusión Trx. Como resultado dió una banda correspondiente a la proteína en cuestión más los 22 kDa de la proteína de fusión, verificándose que el tamaño correspondía a la proteína de interés (Figuras 7 y 8).

En el caso de G1 para sus regiones amino y carboxilo estos además fueron caracterizados por su reactividad en *Inmunoblot* con anticuerpos dirigidos contra 8 distintos péptidos contenidos en G1 anteriormente preparados en el laboratorio. Como resultado, solo los anticuerpos dirigidos contra uno de los 6 péptidos (G1 aa 58-87) contenidos en la región amino de G1 y solo anticuerpos dirigidos contra 1 de los 2 péptidos (G1.6 aa 411-424) contenidos en la región carboxilo de G1 reconocieron G1 $\beta$  recombinante (Figura 12). Los anticuerpos contra péptidos de G1 utilizados fueron independientemente analizados en el laboratorio por su capacidad de unión al virus no dando buenos resultados. Esto puede deberse a que no existen estos epítomos en forma lineal en la superficie de la envoltura viral y por lo tanto los anticuerpos generados a partir de ellos no se unen al virus.

Para caracterizar la proteína recombinante G2 $\alpha$  se realizó inmunoblot con un suero policlonal de conejo contra el péptido G2.6 (aa 25-51) y se detectó una banda del tamaño esperado.

Para la región carboxilo de G2 (G2 $\beta$ ) se realizó inmunoblot con sueros de paciente infectados con el virus Andes siendo reactivo sólo uno de los seis sueros examinados. Esto puede atribuirse a que los anticuerpos contenidos en el suero son dirigidos contra las proteínas nativas y por lo tanto no reconocen las proteínas recombinantes en el *Inmunoblot*.

El objetivo de generar anticuerpos monoclonales contra las glicoproteínas recombinantes se cumplió. Tanto para las regiones amino y carboxilo de G1 y G2 como para Gp30 de G1 obtenido en la expresión *in vitro*. Se generaron anticuerpos monoclonales que fueron

seleccionados por ELISA contra el inmunógeno correspondiente. En todos los casos, la reacción contra Trx fue descartada.

Los péptidos contenidos entre 50 kDa y 72 kDa obtenidos en la expresión *in vitro* de G1 completo no produjeron respuesta inmune en los ratones lo que puede deberse a que la proteína esperada dentro de ese rango no existía o bien estaba en cantidades muy bajas para causar una respuesta inmune.

Para analizar la capacidad de los anticuerpos monoclonales en reconocer los respectivos inmunógenos en forma desnaturalada se realizaron ensayos de *Inmunoblot*. De los 11 anticuerpos monoclonales obtenidos contra la región amino de G2 todos reconocieron el antígeno desnaturalado. No así para G2 $\beta$ , donde 5 anticuerpos negativos (3D3/H1, 3F10/H8, 5B5/H4, 7A9/H4, 7D7/F4) de 15 que no reaccionaron en *Inmunoblot* sugiriendo que podría reconocer una estructura conformacional de la proteína y no una estructura lineal.

Para discriminar si los anticuerpos sintetizados contra G2 $\beta$  reaccionan con el fragmento de interés y no contra la proteína de fusión se realizaron *Inmunoblots* de la proteína G2 $\beta$  digerida con enteroquinasa. Doce de 18 sobrenadantes (parentales) (66,7%) reconocieron a la proteína de 58 kDa sin el segmento de fusión más la banda de 80 kDa que corresponde a G2 $\beta$  más la proteína de fusión de 22 kDa. Uno (5,6%) de los sobrenadantes (7A9) mostró una banda solo a los 80 kDa lo que podría indicar que esta reconociendo un segmento de la proteína comprendido en la unión de la proteína y el Trx, ya que tampoco reacciona contra Trx solo. Cinco (27,8%) de los sobrenadantes no reaccionaron con ninguna banda (3A8, 3D3, 4C3, 7A11, 7D7). En base a estos

reconociendo un segmento de la proteína comprendido en la unión de la proteína y el Trx, ya que tampoco reacciona contra Trx solo. Cinco (27,8%) de los sobrenadantes no reaccionaron con ninguna banda (3A8, 3D3, 4C3, 7A11, 7D7). En base a estos resultados se concluye que estos anticuerpos no reconocen el antígeno desnaturalado. Esta idea se refuerza con los resultados del *Immunoblot* de la proteína sin digerir realizada con los líquidos ascíticos dando 5 (33,3%) negativos (3D3/H1, 3F10/H8, 5B5/H4, 7A9/H4, 7D7/F4) de un total de 15. En el caso de los anticuerpos monoclonales 3D3/H1 y 7D7/F4 el resultado del *Immunoblot* de la proteína sin digerir concuerda con el *Immunoblot* de la proteína digerida realizado con los sobrenadantes de los hibridomas parentales ya que estos también fueron negativos. Los demás hibridomas reclonados que no reconocen el inmunógeno en *Immunoblot* (3F10/H8, 5B5/H4, 7A9/H4) provienen de hibridomas policlonales parentales que fueron reactivos con el inmunógeno en *Immunoblot*. Esto se puede explicar con la posibilidad que al ser reclonadas se seleccionó hibridomas sin esta característica partir de las hibridomas policlonales. (Figura 13). En el caso del anticuerpo monoclonal 3A8/G3 este reacciona con el inmunógeno en *Immunoblot* aunque el hibridoma parental no mostró reactividad alguna (Figura 13 y 14). Esto podría explicarse en base a que probablemente hubo poco anticuerpo secretado en el sobrenadante del hibridoma parental, insuficientes para detectar su reactividad por *Immunoblot*.

Finalmente, se determinó la capacidad de unión al virus de los anticuerpos monoclonales contra ambas regiones de G2 en ensayos de inmunofluorescencia indirecta de células Vero E6 infectadas. Como resultado se encontró que 11 de 21 (52,4%) anticuerpos contra G2 $\alpha$  y 2 (11,1%) de los 18 anticuerpos contra G2 $\beta$  fueron capaces de reconocer el virus. Este hecho comprueba que existen zonas lineales dentro

de las glicoproteínas nativas del virus y valida el uso de *E. coli* para la síntesis de estas proteínas y generación de antígenos.

Como proyecciones de este trabajo está la posibilidad de utilizar los anticuerpos monoclonales con fines terapéuticos y de diagnóstico. Se puede destacar la posibilidad de que estos anticuerpos generados con capacidad de unirse al virus, puedan neutralizarlo. Otras aplicaciones de estos anticuerpos monoclonales pueden consistir en ensayos de captura, estudios epitópicos que permitirían determinar las regiones inmunodominantes de las glicoproteínas.

## VI. REFERENCIAS

- Antic, D., Wright, K., Kang, C (1992) Maturation of Hantavirus proteins G1 and G2. *Virology* 189:324-328.
- Baró, M., Vergara, J., Navarrete, M. (1999). Hantavirus en Chile: revisión y análisis de casos desde 1975. *Rev. Med. Chile* 127:1513-1523.
- Cho, H., Howard, C (1997) Antibody responses in humans to an activated Hantavirus vaccine Hantavax®. *Vaccine* 17:2569-2575.
- Elliot, R., (1990) Molecular biology of the Bunyaviridae. *J. Gen. Virol.* 71:501-522.
- Ennis, F.A., Cruz, J., Spiropoulou, C.F., Walte, D., Peter, C.J., Nichol, S., Kariwa, H., Foster, F. (1997). Hantavirus pulmonary syndrome: CD8+ and CD4+ cytotoxic T lymphocytes to epitopes on Sin Nombre virus nucleocapsid protein isolated during acute illness *Virology*, 238:380-390.
- Fields, B.N., Knipe, D.M., Howlet, P.M. (1996). *Fields Virology* 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Galeno, H., Villagra, E., Fernandez, J., Ramírez, E., Mora, J. Infección por Hantavirus en humanos: Experiencia del Laboratorio de Referencia para Enfermedades Infecciosas Emergentes *Rev. Chil. Infect.* 3:216-219.
- Galeno, H., Villagra, E., Fernandez, J., Ramírez, E., Mora, J., (2000). Técnicas diagnósticas de infección humana por Hantavirus. *Rev. Chil. Infect.* 3:211-215.
- Galeno, H., Mora, J, Villagra, E., Fernandez, J., Hernández J, Mertz G, Ramírez E. (2002). Aislamiento de Hantavirus (virus Andes) en Chile. *Rev. Chil. Infect.* 19:182-183..
- Gavrilovskaya, I.N., Brown, E.J., Ginsberg, M.H., Mackow, E.R. (1999). Cellular entry of Hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by  $\beta 3$  integrins *J. Virol.* 73:3951-3959.
- Gavrilovskaya, I.N., Shepley, M., Shaw, R., Ginsberg, M., Mackow, E.R. (1998).  $\beta 3$  Integrins mediate the cellular entry of Hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:7074-7079.
- Hjelle, B., Jenison, S., Torrez-Martinez, N., Herring, B., Quan, S., Polito, A., Pichuanes, S., Yamada, T., Morris, C., Elgh, F., W Lee, H., Artsob, H., y Dinello, R (1997). Rapid and specific detection of Sin Nombre virus antibodies in patients with

hantavirus pulmonary syndrome by a strip immunoblot assay suitable for field diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 35: 600-608.

Hooper, J.W., Larsen, T., Custer, D.M., Schmaljohn, C.S (2001). A lethal disease model for Hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 289:6-14.

Hooper, J.W., Custer, D., Smith, J. Hantaan (2006) Andes virus DNA vaccine elicits a broadly cross-reactive neutralizing antibody response in non human primates. *Virology*.347:208-16.

Jin, M., Park, J., Lee, S, Park, B., Shin, J., Song, K., Anh, T., Hwang, S, Ahn, B., Ahn, K. (2001). Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis *Virology*. 294: 60-69.

Kim, T., Choi, Y., Cheong, H., Choe, J. (2002). Identification of a cell surface 30kDa protein as a candidate receptor for Hantaan virus *J. Gen. Virol.* 83: 767-773.

Köhler, G., Miltein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of a predefined specificity. *Nature* 256:459-497.

Koseki, T., Takahashi, K., Handa, T., Yamane, Y., Fushinobu, S., Hashizume, K. (2006). N-Linked Oligosaccharides of *Aspergillus awamori* Feruloyl Esterase Are Important for Thermostability and Catalysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 2476-2480

Koster, F., Vigil, J., Olson, D., Terajima, M., Ennis, F., Moehenkamp, C., Williams, T (2001). Class I, II and III HLA alleles associated with severe hanta virus cardiopulmonary syndrome in the southwest USAM. *J Trop Med.* 65:152.

Lisbona, F., Tischler, N., Roseblatt, M., Valenzuela, P. (2003). Síntesis de las glicoproteínas de virus Andes en *E. coli*. *Biol. Res.* 43:23-26.

Löber, C., Anheier, B., Lindow, S, Klenk, H.D., Feldmann, H., (2001). The Hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA. *Virology* 289: 224-229.

Lopez, N., Padula, P., Rossi, C., Lazaro, ME., Franze-Fernandez, M. (1996). Genetic identification of a new Hantavirus causing severe pulmonary syndrome in Argentina. *Virology*. 220:223-226.

Ministerio de Salud, (2001). Medidas de prevención, control, diagnóstico y vigilancia epidemiológica de la infección por Hantavirus 792, circular n° 4F/45

Ministerio de Salud, (2006). Situación Epidemiológica de Hantavirus, situación a octubre del 2006.

Mori, M., Rothman, A.L., Kurane, I., Montoya, J., Nolte, K., Norman, J., Waite, D., Koster, F., and Ennis, F.(1999).High levels of cytokine-producing cells in the lung tissues of patients, with fatal Hantavirus pulmonary syndrome. *J. Infect. Dis.* 179:295–302.

Mustonen, J., Partanen, J., Kanerva, M., Pietila, K; Vapalahti, O; Pasternack, A; Vaheiri, A. (1996). Genetic susceptibility to severe course of nephropathia epidemica caused by Puumala Hantavirus *Kidney Int.* 49:217–221.

Mustonen, J., Partanen, J., Kanerva, M., Pietila, K; Vapalahti, O; Pasternack, A; Vaheiri, A. (1998).Association of HLA B27 with benign clinical course of nephropathia epidemica caused by Puumala Hantavirus *Scand. J. Immunol.* 47:277–279.

Ogino, M., Yoshimatsu, K., Ebihara, H., Araki, K., Lee, B., Okumura, M. y Arikawa, J. (2004 ).Cell Fusion Activities of Hantaan Virus Envelope Glycoproteins *J. Virol.* 78. 10776-10782,

Padula, P.J., Edelstein, A., Miguel, S.D., et al. (1998). Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: Molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology.* 241:323–330.

Plyusnin, A., Vapalahti, O., Vaheiri, A. (1996). Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J. Virol.* 77: 2677-2687.

Sambrook, Fritsch, Maniatis. *Molecular cloning, a laboratory manual* (1989). Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory press, 500 sunny side Blvd., Woodbury, NY.

Schmaljohn, C., Hjelle, B. (1997). Hantaviruses: A global disease problem [Review]. *Emerg. Infect. Dis.* 3:95–104.

Servicio Agrícola y Ganadero (2001). *Roedores, Rapaces y Carnívoros de Aysen*, 3: 40-42.

Sportorno, A., Palma, R., Valladares, J. (2000). Biología de los roedores reservorios de Hantavirus en Chile. *Rev. Chil. Infect.* 17, 197-210.

Spiropoulou, C.F. (2000).Hantavirus maturation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 256:33–46.

Sundstrom, J. B., McMullan, L. K., Spiropoulou, C.F., Hooper, W. C., Ansari, A. A., Peters, C.J., and Rollin, P.E. (2001). Hantavirus infection induces the expression of RANTES and IP-10 without causing increased permeability in human lung microvascular endothelial cells. *J.Virol.*75:6070.

Szot J, Sotomayor V. (2002). Guía clínica del diagnóstico y manejo del síndrome cardiopulmonar por Hantavirus Primera edición, Ministerio de Salud, República de Chile.

Tischler, N., Lisbona, F., I., Martínez, R., Fernández, J., Rosemblatt, M. y Valenzuela, P. (2002). Secuencia y expresión de genes de virus Hanta Andes. *Biol. Res.* 35:3-4.

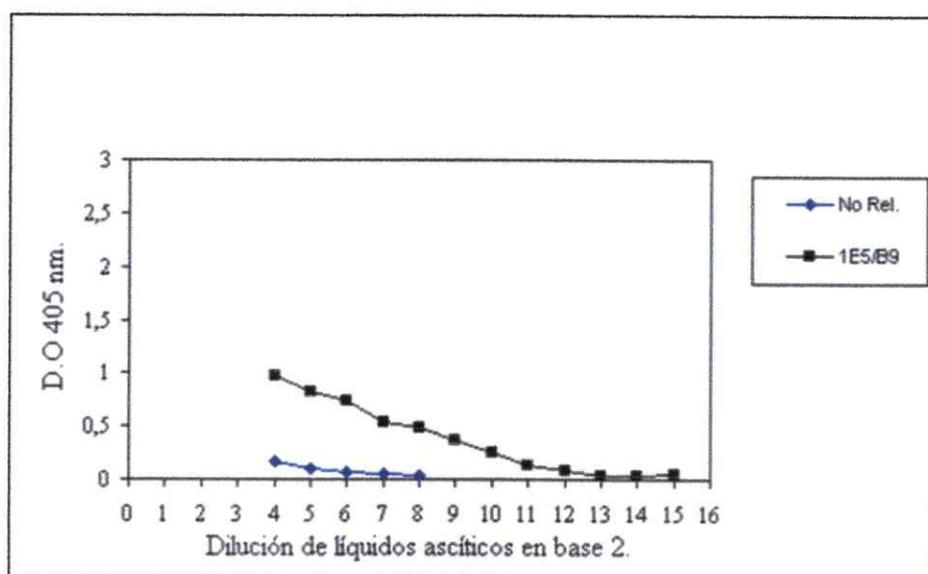
Tischler, N.D., Fernández, J., Müller, I., Martínez, R., Galeno, H., Villagra, E., Mora, J., Ramírez, E., Rosemblatt, M., Valenzuela, P.D.T (2003). Complete sequence of the genome of the human isolate of Andes virus CHI-7913: comparative sequence and protein structure analysis *Biol. Res.* 36:1-10.

Toro, J., Vega, J., Khan, A., Mills, J., Padula, P., Terry, W. 1998 An Outbreak of Hantavirus Pulmonary Syndrome, Chile, (1997). *Emerg. Infect. Dis.* 4:1-8.

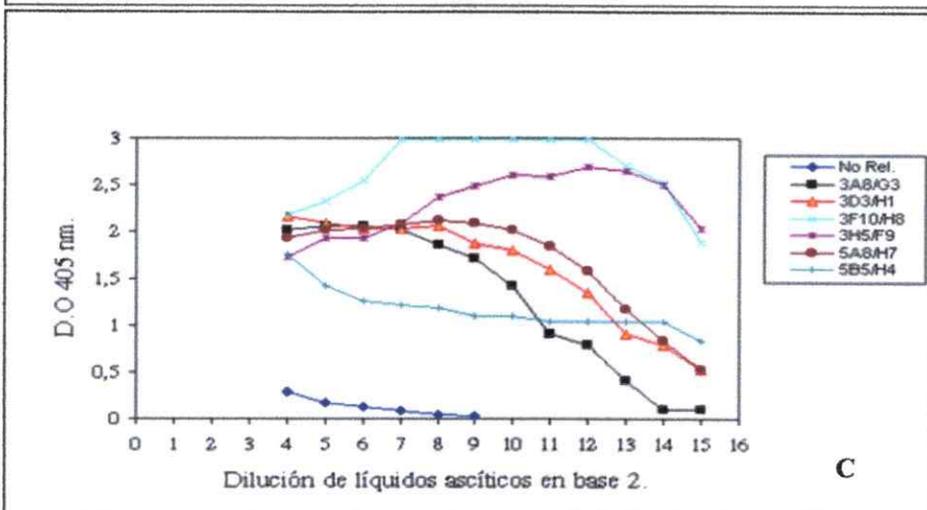
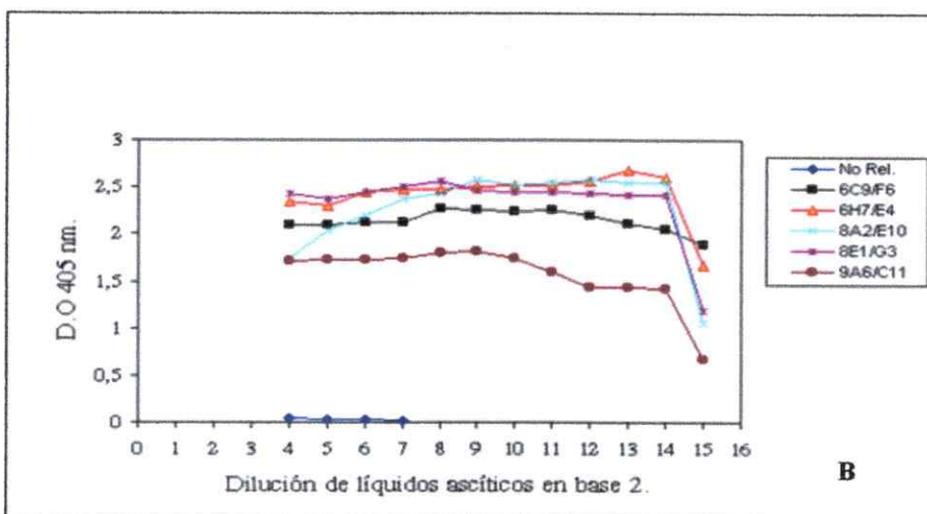
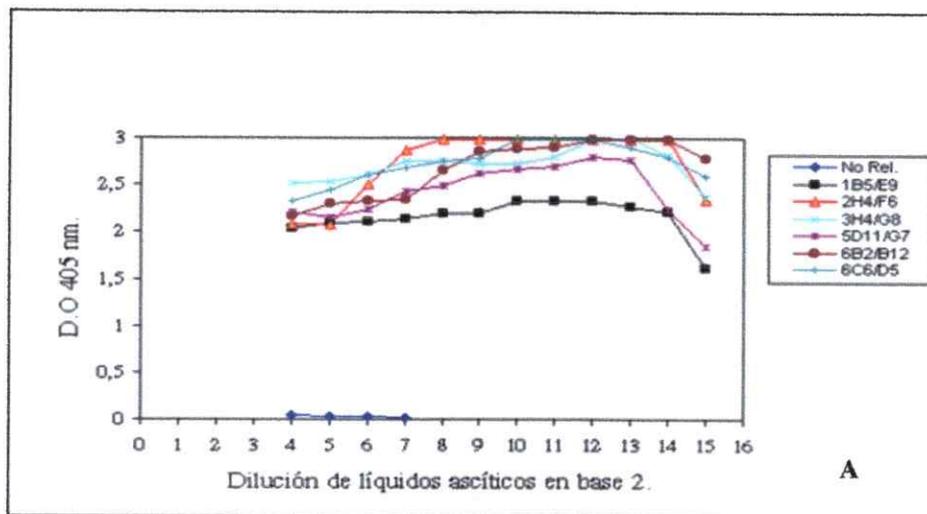
Wells, R.M., Sosa, Estani, S, Yadon, Z.E., et al. (1997). An unusual Hantavirus outbreak in southern Argentina: Person-to-person transmission? Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. *Emerg. Infect. Dis.* 3:171-174.

Zaki, SR., Greer, P.W., Coffield, L.M., et al. (1995). Hantavirus pulmonary syndrome: Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am. J. Pathol.* 146:552-579.

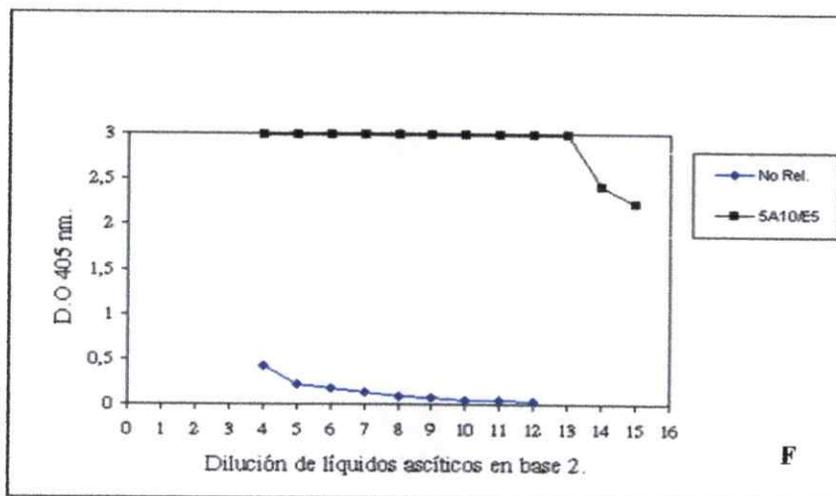
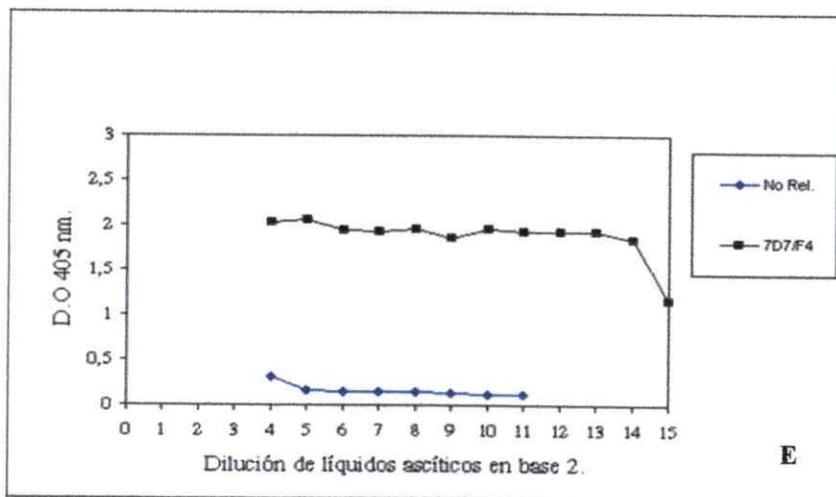
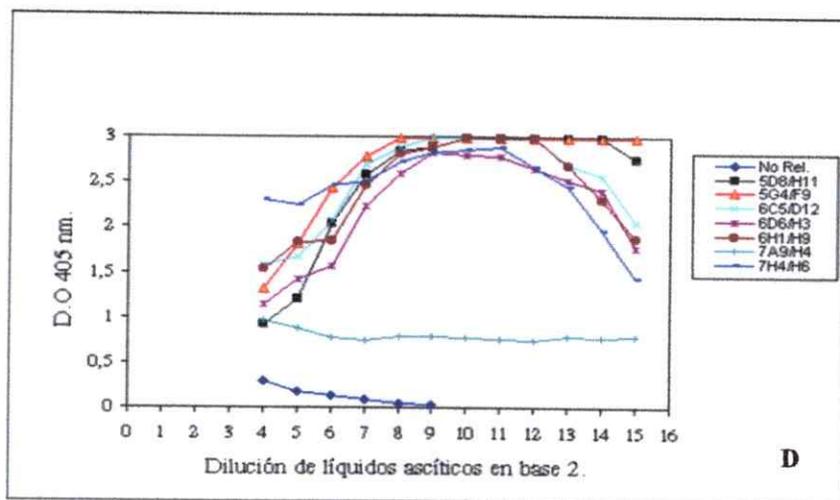
## VII. ANEXO



**FIGURA A:** Titulación de líquidos ascíticos anti ANDV G1-p30 mediante ELISA.



**FIGURA B:** Titulación de los líquidos ascíticos contra G2 $\alpha$  y G2 $\beta$  mediante ELISA.  
**A y B:** Titulación de líquidos ascíticos por ELISA de anti ANDV G2 $\alpha$ , **C, D, E y F:** Titulación de líquidos ascíticos por ELISA de anti ANDV G2 $\beta$ .



**FIGURA B:** Titulación de los líquidos ascíticos de G2 $\alpha$  y G2 $\beta$  mediante ELISA.  
**A y B:** Titulación de líquidos ascíticos por ELISA de anti ANDV G2 $\alpha$ , **C, D, E y F:** Titulación de líquidos ascíticos por ELISA de anti ANDV G2 $\beta$ .