

Construcción de bacmids recombinantes con genes inmunogénicos del virus de la fiebre aftosa usando el sistema Bac-to-Bac

Paulina Andrade^{1*} y Daniel Palacios¹

¹Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. Laboratorio de Biología Molecular. Diego de Robles y Vía Interoceánica, Campus Cumbayá, Edif. Darwin. Casilla Postal 17-1200-841, Quito, Ecuador.

*Autor principal/Corresponding author, e-mail: pandrade@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 16/05/2013. Aceptado/Accepted: 26/05/2013.

Publicado en línea/Published on Web: 28/06/2013. Impreso/Printed: 06/06/2013.

Abstract

The Foot and Mouth disease virus belongs to the Picornavirus family and primarily affects to bovine, ovine, porcine and caprine. The virus is divided in seven serotypes, O, A, C, Sat1, Sat2, Sat3 and Asia1. In Latin America, the most prevalent serotypes are O and A, in Ecuador, serotype O is the most common. Currently, the vaccine in use is that of an inactivated virus that has some disadvantages such as a limited immune response, the need for a cold chain to keep the vaccine functional and the need of a great quantity of virus to manufacture it. An alternative to overcome these inactivated vaccine's problems is the creation of subunit vaccines using a recombinant protein expression system, where only the immunogenic components of the pathogen are used. Therefore, this project's main objective is the application of a Bac-to-Bac system for the construction of recombinant baculovirus with the foot and mouth disease virus' highly immunogenic capsid genes such as VP1, P1-2A and 3C from serotype O. Recombinant baculoviruses were obtained with the VP1 construct and these will be later transfected in insect cells for the expression and analysis of VP1 as a possible candidate for a subunit vaccine.

Keywords. Foot and mouth disease virus, Serotype O, Baculovirus, VP1 gene, subunit vaccine, Bac to Bac.

Resumen

El virus de la fiebre aftosa pertenece a la familia de los Picornavirus y afecta mayormente a animales bovinos, ovinos, porcinos y caprinos. Se divide en 7 serotipos: O, A, C, Sat1, Sat2, Sat3 y Asia1. En Latinoamérica, los serotipos más prevalentes son el O y A, en Ecuador, el serotipo de mayor incidencia es el O. La vacuna que se utiliza actualmente es una vacuna convencional de virus inactivado que posee algunas desventajas como una respuesta inmune limitada, la necesidad de una cadena de frío para mantener a la vacuna viable y el requerimiento de grandes cantidades de virus para fabricarla. Una alternativa para superar estos problemas y en general los problemas de las vacunas convencionales, es la creación de subunidades de vacunas por medio de un sistema de expresión de proteínas recombinantes, donde se utiliza sólo las proteínas inmunogénicas del patógeno. Por lo tanto, este proyecto se centró en la aplicación del sistema Bac-to-Bac para la construcción de baculovirus recombinantes con genes de la cápside, altamente inmunogénicos, del virus de la fiebre aftosa como son VP1, P1-2A y 3C del serotipo O. Se logró obtener baculovirus recombinantes con el constructo VP1 y éstos, posteriormente, serán transfectados en células de insectos para la expresión y análisis de VP1 como un posible candidato de subunidad de vacuna.

Palabras Clave. Virus de fiebre aftosa, Serotipo O, Baculovirus, gen VP1, subunidades de vacuna, Bac to Bac.

Introducción

La fiebre aftosa (FA) es un virus de ARN de sentido positivo perteneciente a la familia de los *Picornaviridae* del género de los *aphtovirus*. Su ARN codifica para una sola poliproteína que contiene los genes estructurales y los genes no estructurales del virus. La cápside está forma-

da por las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4, las cuales son codificadas por la región P1 del genoma. La región P2 y P3 del genoma codifican para las proteasas 2A y 3C y las proteínas encargadas de la replicación del virus, 2B, 3A, 3B, 3D. Para el procesamiento de la poliproteína viral es necesaria la actividad de las proteasas 2A y 3C, las cuales cortan la poliproteína y

ISSN 1390-5384



Primer	Secuencia	Descripción
P1-2A (F)	ATAGGATCCaccatgGGACAATCCAGTCCAGCGAC	Extra-BAMHI-Kozak-Start-P12A
P1-2A (R)	CGCGAATTCTtaCCCAGGGTTGGACTCAACGT	Extra-ECORI-Stop-2A
3C (F)	ATAGAATTCaccatgAGTGGTGCCCCACCGACCG	Extra-ECORI-Kozak-start-3C
3C (R)	CGCAAGCTTttaTCGTGGTGTGGTTCCGGGGTC	Extra-HINDIII-stop-3C
VP1 (F)	ATAGGATCCaccatgAACCCTTCTGCGGGCGAGT	Extra-BAMHI-Kozak-start-VP1
VP1 (R)	CGCAAGCTTttaAAGTCTGTTTCACCGGTGCCAC	Extra-HINDIII-stop

Tabla 1: Primers utilizados para la amplificación de los genes inmunogénicos de la FA

ensamblan la cápside viral respectivamente [1].

El virus de la FA genera una enfermedad que afecta mayormente a animales bovinos, ovinos, caprinos y porcinos y está dividida en 7 serotipos: A, O, C, Sat1, Sat2, Sat3 y Asia 1; dentro de los cuales los serotipos A y O son los que están presentes en Latinoamérica.

La transmisión del virus ocurre por aerosoles y una vez que ingresa en el animal, se replica primero en la faringe por 24-48 horas. Posterior a su replicación, el virus invade el torrente sanguíneo y en corto tiempo aparecen las lesiones características en la boca y en las patas de los animales susceptibles [2]. Los síntomas de la enfermedad son fiebre, anorexia, depresión y baja producción de leche y debido a las lesiones en la boca y patas, ocasiona salivación excesiva y cojera [3]. La viremia usualmente desaparece después de 3-4 días pero el virus se replica, altamente, en los sitios donde ocurren las lesiones (>8 log 10 unidades infecciosas por mL), a través de las cuales ocurre el contagio hacia otros animales [1, 2].

En el Ecuador, esta enfermedad constituye un gran problema económico debido a que las pérdidas del sector ganadero alcanzan hasta los \$25 millones anuales y al parecer, hasta el día de hoy, la erradicación no ha sido positiva [4]. Uno de los problemas por el cual no se ha dado esta erradicación se debe a que no siempre se manejan planes de vacunación efectivos por parte del sector ganadero. Adicionalmente, la vacuna de virus inactivado, utilizada actualmente, presenta problemas de estabilidad ya que el ARN del virus es termolábil y, por lo tanto, la vacuna requiere de un riguroso manejo de su cadena de frío, el cual no siempre se lo logra. Su producción también es compleja y muy pocos países fabrican la vacuna, de virus inactivado, ya que genera problemas de bioseguridad por la necesidad de cultivar al virus de forma masiva [6].

Una posible solución a los problemas que tiene la vacuna de virus inactivado para la FA es la creación de subunidades de vacunas, las cuales tienen como componente principal las proteínas inmunogénicas del patógeno por lo que no presentan problemas de bioseguridad y son más estables a los cambios de temperatura [6]. En la actualidad, un sistema altamente utilizado para la creación de subunidades de vacunas es el sistema Bac to Bac, el cual emplea el baculovirus *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) que tiene un genoma de 133 kilobases. Este baculovirus ha sido modificado (bacmid) para la expresión de genes foráneos en cultivo de células de insecto o larvas [6]. El sistema Bac

to Bac utiliza el mecanismo del transposón Tn7 para la transposición de un cassette de expresión, contenido dentro un plásmido donante, al vector bacmid. En este sistema, los bacmids recombinantes son generados en *Escherichia coli* y luego son utilizados para transfectar células de insecto y expresar las proteínas recombinantes [6].

Los genes del virus de la FA con potencial inmunogénico para ser posibles subcandidatos de vacuna son los de su cápside [5]. Por lo tanto, esta investigación plantea crear bacmids recombinantes que contengan estos genes inmunogénicos de la FA, mediante la amplificación y clonación de VP1, P1-2A y P1-2A-3C dentro del sistema Bac to Bac.

Métodos

Confirmación molecular de la presencia del virus de la fiebre aftosa en muestras epiteliales

Cinco muestras de epitelio de lengua de ganado vacuno síntomas de fiebre aftosa, fueron donadas por el Instituto de Zoonosis del Instituto Nacional de Higiene (INH). A partir de estas muestras se extrajo el ARN total utilizando el kit EZNA total RNA kit I (Omega Bio-Tek). La confirmación de la presencia del virus se realizó mediante RT-PCR utilizando el SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity de invitrogen. Los primers fueron obtenidos del Manual de Fiebre Aftosa de Malirat y Bergmann [7] correspondientes al serotipo O. El programa de RT-PCR consistió en la retrotranscripción a 55°C por 30 minutos, seguido de una PCR con 35 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto, annealing a 60°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 2 minutos y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Amplificación de los genes inmunogénicos de la FA

Para la amplificación de los genes inmunogénicos VP1, P1-2A y 3C, se diseñaron primers específicos en base a la secuencia de estos genes obtenida a través del GenBank. Posteriormente, se utilizó el programa de Primer Blast del NCBI para escoger la secuencia de los primers, los cuales se seleccionaron en base a la longitud, temperatura de annealing y porcentaje de citosinas y guaninas. Además, se incluyeron sitios de restricción para la clonación de los genes dentro del plásmido pFastBac, nucleótidos extra para mejorar la eficiencia de la restricción enzimática [8], codones de inicio y fin y una

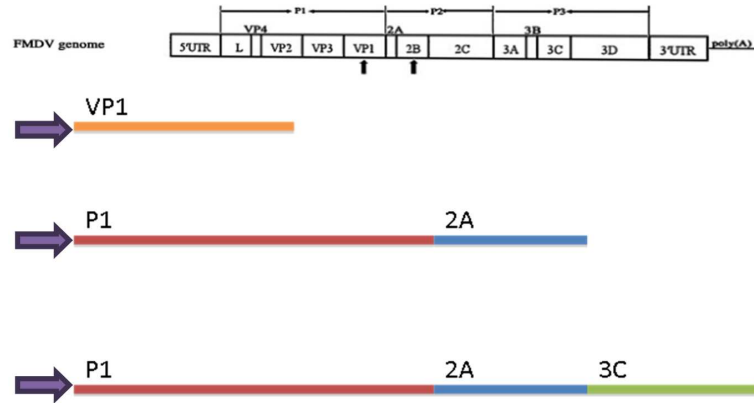


Figura 1: Esquema de constructos que se utilizaron en este proyecto. VP1, P1-2A y P1-2A-3C. Figura modificada de Sáiz et al. [5].

secuencia Kozak para mejorar la eficiencia de la traducción (tabla 1).

La amplificación de los genes, se realizó mediante RT-PCR a partir del ARN extraído de las muestras positivas para el serotipo O. Las condiciones del RT-PCR fueron las siguientes: para los genes VP1 y 3C, 55°C por 30 minutos para la retrotranscripción, seguido de 35 ciclos de denaturación a 95°C por 2 minutos, 60°C por 15 segundos y 55°C por 15 segundos de temperatura de annealing, 72°C por 2.5 minutos de elongación y una extensión final a 72°C por 5 minutos. El programa de RT-PCR para el gen P1-2A fue de 55°C por 30 minutos para la retrotranscripción, seguido de 35 ciclos de denaturación a 95°C por 2 minutos, 67°C por 15 segundos y 65°C por 15 segundos de temperatura de annealing más 72°C por 2.5 minutos de elongación y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Se empleó el termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400. Los amplicones fueron observados en gel de agarosa al 1 % y purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega.

Creación de constructos

Los constructos propuestos para esta investigación fueron el gen de la cápside viral VP1, el conjunto de genes estructurales P1 más la proteasa 2A (P1-2A) y P1-2A más

la proteasa 3C (Fig.1). Estos constructos fueron clonados en el plásmido donante pFastBac, el cual contiene un cassette de expresión que consiste en un marcador de selección de resistencia a la gentamicina, un promotor específico de baculovirus, un sitio de clonación múltiple, sitios Tn7 para la transposición y una cola poli A del SV40.

Para la clonación se realizó restricción enzimática de los productos de PCR y del plásmido pFastBac utilizando las enzimas de restricción específicas para cada constructo (Tabla 1). Los productos de la restricción enzimática de los genes inmunogénicos fueron visualizados y purificados del gel de agarosa 0.75 %, utilizando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. El plásmido pFastBac no fue purificado después de la restricción enzimática.

Los productos escindidos y purificados de los genes y del plásmido pFastBac fueron utilizados en un radio de 1:5 (1 parte de vector y 5 partes de inserto) con un mínimo de concentración de plásmido de 50 ng para la ligación. La determinación de este radio se lo realizó mediante la ecuación 1.

$$\frac{ng\ de\ vector \times\ Tama\ de\ inserto\ (pb)}{Tama\ de\ vector} \times\ radio\ molar\ de\ \frac{Inserto}{Vector} = ng\ de\ inserto \quad (1)$$

Células *E. coli* DH10β fueron transformadas con el plásmido ligado, utilizando una solución de CaCl₂ 60 μM y shock térmico. Posteriormente, estas células fueron cultivadas en medio LB suplementado con ampicilina (100 μg/mL), debido a que el marcador de selección del plásmido pFastBac es el gen de la β-lactamasa. Se comprobó identidad del gen clonado mediante secuenciación.

Generación de bacmids recombinantes mediante el sistema Bac to Bac

Se utilizó el sistema Bac to Bac para la generación de bacmids recombinantes. Este sistema consta de células especiales de *E. coli*, llamadas DH10Bac; las cuales contienen el bacmid con gen de resistencia a la kanamicina y un sitio mini-attTn7 insertado en la terminal N

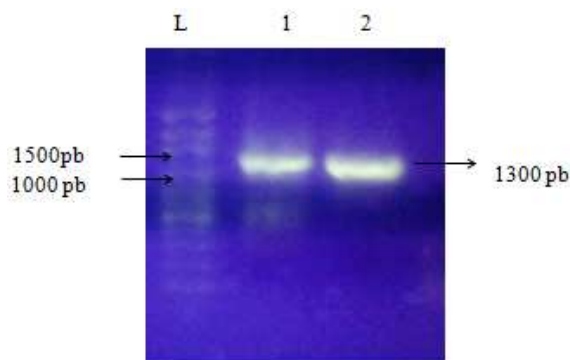


Figura 2: Amplificación del serotipo O del virus de la Fiebre Aftosa de muestras de epitelio de ganado vacuno. L: escala marca Axygen de 100 pb. 1) Producto de amplificación de la muestra 226 2) Producto de amplificación de la muestra 86.

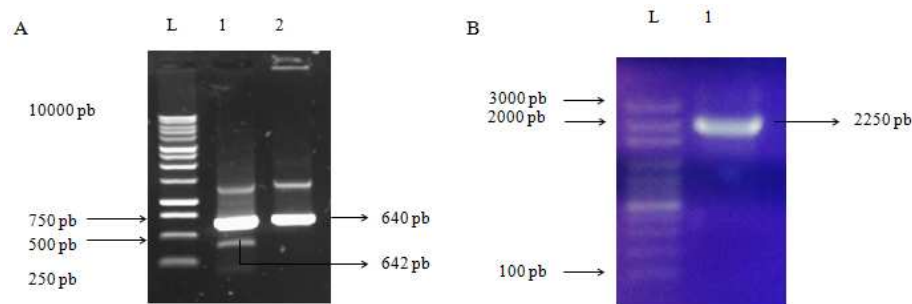


Figura 3: Amplificación de los genes de la cápside de la FA. L: Escalera de 1kb marca Promega. 1) Amplificación de gen VP1. 2) Amplificación del gen 3C. B. Amplificación del gen de la cápside del virus de la fiebre aftosa. L: escalera de axygen de 100 pb hasta 3000 pb. 1) Amplificación del conjunto de genes P1-2A.

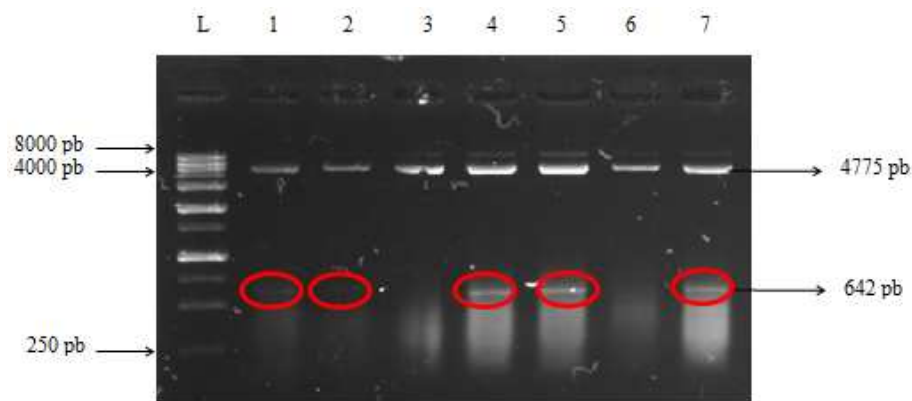


Figura 4: Restricción enzimática del plásmido recombinante pFastBac con BamHI y HindIII para determinar la presencia del gen VP1 dentro del vector. L) Escalera marca axygen de 250 pb. 1 - 7 restricciones enzimáticas de pFastBac-VP1 de colonias positivas.

del gen que codifica para el péptido de *lacZα* que complementa la delección del *lacZ* de las DH10Bac. Así mismo, contienen un plásmido ayudador que codifica para la transposasa del transposón Tn7 y para la resistencia a la tetraciclina. Se indujo la transformación de las células DH10Bac utilizando CaCl_2 60 μM y shock térmico. Posteriormente, se dejó incubar a 37°C con agitación a 225 rpm por 4 horas para que ocurra la transposición del cassette de expresión del pFastBac al bacmid, interrumpiendo el gen *lacZα*. Las bacterias fueron sembradas en un medio LB suplementado con tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), gentamicina (7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), X-Gal (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e IPTG (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se seleccionaron las bacterias lactosa negativas, se les extrajo el bacmid y se realizó un PCR utilizando primers del inserto para confirmar su presencia.

Resultados y discusiones

La fiebre aftosa es una enfermedad causada por un virus que afecta a la producción de ganado. Existen 7 serotipos del virus y no existe inmunidad cruzada entre los serotipos [9]. Debido a las limitaciones que posee la vacuna de virus inactivado, utilizada para prevenir brotes de FA [10], es necesario buscar alternativas para su prevención. Una opción interesante es el establecer un sistema in vitro de expresión de proteínas inmunogénicas del virus que pueden ser utilizadas como posibles candidatos para el desarrollo de subunidades de vacunas.

Es por esta razón que este trabajo propuso la expresión de proteínas inmunogénicas del virus en el sistema de expresión Bac to Bac, altamente, utilizado para la expresión de antígenos virales [6].

Confirmación molecular de la presencia del virus de la fiebre aftosa en muestras epiteliales

Se logró amplificar el ADN del serotipo O en dos de las cinco muestras de epitelio de ganado vacuno. La banda correspondiente al serotipo es de 1300 pb [7] (Fig. 2).

Amplificación de los genes inmunogénicos de la FA

Se llegó a estandarizar el protocolo de amplificación de los genes estructurales del virus de la fiebre aftosa, a través de la utilización de diferentes temperaturas de annealing. En las siguientes figuras se puede observar la amplificación de los genes VP1 y 3C del serotipo O que tienen un tamaño de 642 y 640 pb, respectivamente, y la amplificación del gen P1-2A que tiene un tamaño de 2250 pb (Fig.3).

Creación de constructos

A partir de la amplificación de estos genes, se logró clonar el VP1 en el vector de pFastBac. Para constatar la presencia del gen VP1 dentro del vector, se realizó la purificación y restricción enzimática de pFastBac-VP1. Como se observa en la Figura 4, esta restricción presentó dos bandas: una correspondiente a pFastBac de 4775 pb y una correspondiente al gen VP1 de 642 pb.



Figura 5: Extracción y PCR del Bacmid para comprobar la presencia del gen VP1. L) Ladder marca Axygen de 250 pb - 8000 pb. 1-5) extracciones de Bacmid donde se puede observar la banda en la parte superior al gel correspondiente a 136 Kb. 6-10) Amplificación del gen VP1. C-) Control negativo.

Para reconfirmar que el vector pFastBac posea el gen VP1, se determinó la secuencia del inserto en el plásmido recombinante pFastBac-VP1 (Functional Biosciences), utilizando los mismos primers de amplificación del gen VP1. Con esta secuencia se realizó un alineamiento múltiple utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) contra el GenBank y se obtuvo alineamiento con una secuencia que correspondía al gen VP1 perteneciente al serotipo O del virus de la FA de la provincia de Santo Domingo de Tsáchilas (accesión JN005912.1) con un Expect value (E value) de 0 y con un porcentaje de similitud del 94 %. Se encontró también en la base de datos del GenBank que la secuencia se alineaba con este mismo gen proveniente de la provincia de Orellana (código de accesión JN005918.1), Napo (JN005917.1), Bolívar (JN005916.1), Imbabura (JN005915.1), Cotopaxi (JN005914.1) y Los Ríos (JN005911.1). Estos alineamientos tenían el mismo E value de 0 y un 94 % de homología por lo que también se puede asegurar que este mismo serotipo está circulando por varias provincias pertenecientes a las regiones de la Costa, Sierra y Oriente del Ecuador.

El gen de P12A no pudo ser clonado en el plásmido pFastBac ya que no se logró obtener la concentración necesaria de su fragmento escindido purificado para realizar una ligación con el ratio de 1:5. Por ende no fue posible crear los constructos P12A y P12A3C.

Generación de bacmids recombinantes mediante el sistema Bac to Bac

Se realizó la transposición del gen VP1 desde pFastBac-VP1 al bacmid en células DH10Bac, las cuales contienen el bacmid y el plásmido ayudador que codifica para la transposasa encargada de realizar la transposición del cassette de expresión, entre los sitios Tn7 del pFastBac-VP1 con el sitio mini-attTn7 del bacmid. Esta transposición irrumpe el gen *lacZ α* del bacmid, tornándolo a las DH10Bac lactosa negativas. Para confirmar la presencia de VP1, se extrajo el bacmid de 5 colonias lactosa negativas y se amplificó con los primers de VP1 (Fig.5).

Conclusiones

Se logró establecer el sistema Bac-to-Bac para la generación de bacmids recombinantes que pueden ser uti-

lizados, en un futuro, para la expresión y estudio de proteínas recombinantes de interés como lo son los candidatos de subunidades de vacuna. La expresión de la proteína del gen VP1 del virus de la FA puede ser utilizada para estudios de inmunogenicidad en ganado vacuno ecuatoriano; sin embargo, es necesario continuar con la creación de los constructos P1-2A y P1-2A-3C ya que si bien se ha observado que VP1 puede generar inmunidad en ganado vacuno, ésta no es suficiente debido a que la proteína, por sí sola, no puede plegarse de forma correcta y, por ende, no puede exponer todos sus epítomos para una correcta estimulación del sistema inmune [10]. Por otro lado, Li et al (2008) lograron expresar el constructo P1-2A-3C del serotipo Asia 1 y se logró una inmunidad mayor debido a la presencia de la proteasa 2A y a la proteína 3C que inducen el doblamiento y procesamiento adecuados de la cápside. Consecuentemente, es posible que el constructo de P1-2A-3C en el serotipo O fuera la mejor opción como candidato de subunidad de vacuna [11].

El sistema Bac to Bac es una herramienta útil para la expresión de proteínas complejas que requieren de plegamiento y modificaciones post-traduccionales para su correcta actividad biológica. Además, ha sido explorado para la expresión de antígenos virales que pueden ser utilizados como subunidades de vacunas y, actualmente, existen varias vacunas comerciales de uso humano y animal producidas por este sistema. Algunos ejemplos son CIRCUMVENT, Cervarix, CircoFLEX, entre otros. Por estas razones, el establecimiento de este sistema es un paso muy importante para el estudio de proteínas de relevancia como son los antígenos virales de la fiebre aftosa; los cuales, a largo plazo, podrían traer una alternativa a la solución del problema que genera esta enfermedad dentro del Ecuador.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por el Programa “Chancellor Grants”, Universidad San Francisco de Quito.

Al Instituto Nacional de Higiene (INH) por la donación de las muestras de epitelio de lengua de ganado vacuno infectado con el virus de la fiebre aftosa serotipo O.

Al laboratorio de biotecnología vegetal y de microbi-

ología por su colaboración durante el desarrollo del proyecto.

Referencias

- [1] Strauss, J.; Strauss, G. 2002. "Virus and Human Disease. Plus-Strand RNA and Double-Strand RNA Viruses". *Capítulo 3* : 57 – 122.
- [2] Rodríguez, L.; Grubman, M. 2009. "Foot and mouth disease virus vaccines". *Vaccine*, 27:D90 – D94.
- [3] Brown, F. 1986. "Review Lecture: Foot-And-Mouth Disease - One of the Remaining Great Plagues". *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 229:215 – 226.
- [4] Hoy. 2009. "Aftosa dejaría este año más de \$25 millones en pérdidas". <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/aftosa-dejaria-este-ano-mas-de-25-millones-en-perdidas-353857.html>.
- [5] Sáiz, M.; Nuñez, J.; Jimenez-Clavero, M.; Baranowski, E.; Sobrino, F. 2002. "Foot and mouth disease virus: biology and prospects for disease control". *INIA: Madrid, España*.
- [6] Van Oers, M. 2006. "Vaccines for viral and Parasitic Diseases Produced with Baculovirus Vectors". *Advances in virus research*, 68:193 – 253.
- [7] Malirat, V.; Bergmann, I. 2003. "Fiebre Aftosa: Instrumentos moleculares para caracterización viral". *Centro Panamericano de Fiebre Aftosa*.
- [8] McPherson, M.; Moller, S. 2010. "PCR: The Basics from background to bench". *Garland Science/BIOS Scientific Publishers*.
- [9] Li, Z.; Yi, Y.; Yin, X.; Zhang, Z.; Liu, J. 2008. "Expression of Foot-and-Mouth Disease Virus Capsid Proteins in Silkworm- Baculovirus Expression System and Its Utilization as a Subunit Vaccine". *Plos One*, 3.
- [10] Xu, Y.; Shen, H.; Zhao, M.; Chen, L.; Li, Y.; Liao, M.; Y., L.; Chen, J. 2011. "Adenovirus-vectored shRNAs targeted to the highly conserved regions of VP1 and 2B in tandem inhibits replication of foot-and-mouth disease virus both in vitro and in vivo". *Journal of Virological Methods*.
- [11] Grubman, M. 2005. "Development of novel strategies to control foot-and-mouth disease: Marker vaccines and antivirals". *Biologicals*, 33:227 – 234.