

**CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA.
Facultad de Biología.**



**Tesis de Diploma.
“Purificación y caracterización de la proteína Vif
recombinante y el anticuerpo monoclonal 3E12, específico
para esta proteína”.**

***Autor: Mickel Palomino Arias.
Tutor: Dr. Carlos A Duarte Cano.***

Junio, 2008.

Indice

Agradecimientos	3
Resumen.	5
Abreviaturas.....	6
Introducción.....	8
Objetivos.	9
Revisión Bibliográfica.....	10
Aspectos estructurales y funcionales del VIH.....	10
La terapia anti-retroviral del VIH/SIDA	11
La proteína Vif del VIH	12
La familia APOBEC3 y su función anti-retroviral.....	16
Sitios de interacción de APOBEC3G con la proteína Vif.	16
Mecanismos de acción de Vif.	18
Dominios antigénicos de Vif, de acuerdo a su reconocimiento por anticuerpos monoclonales.	19
Materiales y Métodos.....	20
Cepa de E. coli.	20
Cinética de expresión del gen vif.	20
Ruptura de la biomasa.	20
Cromatografía en gel de Ni ²⁺ -NTA-agarosa.....	21
Estudio de renaturalización de Vif en diferentes tampones.	21
Renaturalización final del eluato de pH 5.0.....	22
Precipitación de las muestras.	22
Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).	23
Análisis por densitometría a las electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	23
Western blot.	23
Purificación del anticuerpo monoclonal anti-ratón 3E12.....	24
Estimación del grado de pureza del 3E12 purificado.	24
Determinación de la constante de afinidad del AcM 3E12.	24
Biotinilación del 3E12.....	25
Ensayos de ELISA.....	26
ELISA de competencia entre los anticuerpos comerciales (TG001 y TG002) y el 3E12, recubriendo con 1ug/ml de proteína Vif (CIGB).....	26

Ensayos para comparar el reconocimiento de la proteína Vif de referencia y la purificada en nuestro laboratorio por los anticuerpos monoclonales: TG001, TG002 y 3E12.	27
Ensayo para comprobar la especificidad del AcM 3E12	27
Ensayo para evaluar reconocimiento de la cola de histidina por el AcM 3E12	27
Determinación de la subclase del 3E12.	27
Determinación de la concentración de proteínas.	28
Resultados y Discusión.....	29
Purificación y Caracterización de Vif.....	29
Curso temporal del crecimiento de los cultivos y expresión de <i>vif</i>	29
Purificación de Vif mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos.	32
Estudio de las condiciones de renaturalización de Vif.	35
Evidencias de multimerización de la proteína Vif purificada.	38
Caracterización del AcM 3E12	40
Purificación del AcM 3E12 a partir de fluido ascítico.	40
Determinación de la subclase del AcM 3E12	41
Especificidad del 3E12.....	43
Comparación del reconocimiento de las proteínas Vif-CIGB y Vif-NIBSC en fase sólida	44
Cálculo de la Kd en tiempo real de la interacción entre el anticuerpo 3E12 y Vif.	45
Reconocimiento de Vif en solución por los AcMs 3E12 y TG002.	46
Ensayos de competencia entre el 3E12 y los anticuerpos TG001 y TG002.	46
Conclusiones.	49
Recomendaciones.....	50
Referencias Bibliográficas.	51

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a mi madre Carmen Arias y su esposo Argelio Zaldivar por su ayuda y sustento durante toda la carrera, al doctor Carlos Duarte por su paciencia, inteligencia y experiencia transmitida en mi formación como profesional, además de sus brillantes ideas, a su esposa Dania Vázquez. Al laboratorio de hepatitis C del CIGB, en especial a los doctores Liz-Álvarez y Santiago Dueñas. Al laboratorio de antivirales dengue, en especial a la doctora Vivian Huerta, a los compañeros del área de desarrollo del CIGB, y de la división de Química-Física, y de manera general al Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, por darme la oportunidad de conocer a investigadores tan talentosos y sencillos a la vez y de poner en mis manos todos los reactivos y herramientas necesarios que sin ellos no hubiese podido realizar esta Tesis de Diploma.

A todos gracias.

Resumen.

La proteína Vif es esencial para la replicación in vivo del VIH y tiene como blanco a la proteína celular Apobec3G. En este trabajo hemos estudiado la cinética de expresión de *vif* en *E.coli*, hemos purificado la proteína y estudiado sus condiciones de renaturalización. Además se ha purificado un anticuerpo monoclonal (AcM) (3E12) contra la misma, al cual se le ha determinado su especificidad, su Kd, su clase, su capacidad para reconocer el antígeno en solución y se ha estudiado su epitopo. En cuanto a la cinética se estableció que en las condiciones especificadas se lograba hasta un 44,9% de expresión y en la purificación se pudo obtener un preparado con más de un 90% de pureza con respecto a contaminantes de *E.coli*. El AcM purificado (98% de pureza) fue específico para su antígeno y se obtuvo una Kd en tiempo real de 2.24nM. La subclase del AcM fue IgG2a, aunque se encontró una actividad residual con IgG1 que debe ser dilucidada. Además este AcM fue capaz de reconocer el antígeno en solución (Vif-CIGB) y se excluyeron como posibles epítomos de reconocimiento la región N-Terminal desde el aa 34 hasta el aa 47 y en la región C-Terminal desde el aa 176 hasta el aa 192.

Abreviaturas.

aa: aminoácido.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

AcM: anticuerpo monoclonal.

Apobec3G: Polipéptido catalítico 3G de la enzima editora del ARNm de la apolipoproteína B humana (del inglés *Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polipeptide-like 3G*).

BSA: albúmina de suero bovino.

Dab: sustrato insoluble diamino bencidina.

dCTP: desoxi-citidina trifosfato

dUTP: dexoci-uridina trifosfato

EDTA: ácido tetra-acético diamino etileno.

ELISA: del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*.

Fc: fragmento proteolítico de IgG que contiene las regiones carboxi terminales unidas por puentes disulfuros de las dos cadenas pesadas.

GuHCl: cloruro de guanidinio.

H₂O₂: peróxido de hidrogeno.

IgG1: inmunoglobulina de ratón subclase I.

IgG2a: inmunoglobulina de ratón subclase IIa.

IgG2b: inmunoglobulina de ratón subclase IIb.

Kd: constante de afinidad.

LB: medio de cultivo Luria broth.

MES: morfolino-etano-sulfónico.

Nef: factor de regulación negativo de la expresión de CD4 en la célula infectada.

OPD: sustrato soluble orto -p-diamino bencidina.

PBS: tampón fosfato de sodio.

pI: punto Isoeléctrico

PPM: patrón de peso molecular.

Rev: factor regulador de la transcripción.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

Tat: factor trans- activador.

V_{crecimiento}: velocidad de crecimiento del cultivo bacteriano.

Vif: factor de infectividad viral.

VIH: virus de inmunodeficiencia humana.

Vpr: factor regulador de replicación.

Vpu: factor regulador de la liberación de viriones y degradación del CD4.

Introducción.

La pandemia del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es considerada uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. En el 2007 se infectaron con este virus 2.5 millones de personas y fallecieron 2.1 millones debido al SIDA (ONUSIDA, 2008). Todavía no se ha encontrado una vacuna efectiva contra la infección, pero sí se han desarrollado terapias anti-retrovirales que alargan y hacen más llevadera la vida de los infectados.

En estos momentos, el proyecto de Inhibidores del VIH del CIGB está enfocado en el desarrollo de inhibidores contra una de las proteínas virales relacionadas con el proceso replicativo del VIH. Esta proteína se nombra Vif (del inglés, viral infectivity factor).

La proteína Vif del VIH-1, había sido descrita con anterioridad, como la responsable de la infección en células no permisivas. Sin embargo su papel en el proceso infectivo era desconocido. Recientemente se descubrió (Sheehy AM y cols, 2002), su papel neutralizante sobre la proteína Apobec3G(A3G). El mecanismo de acción de Vif, implica su unión a A3G y su subsiguiente poliubiquitinación, con la correspondiente degradación por el proteosoma (Xianghui Y y cols., 2003), (Andrew M y cols., 2006).

Debido a la necesidad de trabajar con Vif para elaborar metodologías que permitan el pesquise de moléculas capaces de inhibir sus funciones, en nuestro grupo se clonó y expresó en *E. coli* el gen que codifica para esta proteína (Duarte C, resultados no publicados). En esta construcción genética el gen *vif* se encuentra bajo el control del promotor T7, que se induce por la polimerasa de este fago, la que a su vez en la cepa de *E.coli* BL21DE3, se encuentra bajo el control del promotor lac.

Previamente se ha desarrollado en el laboratorio un procedimiento para la purificación de Vif, a partir del reporte de Yang y cols. (1996). A partir de esta proteína se generó muy recientemente un anticuerpo monoclonal en ratones, el cual se denominó 3E12.

Tanto la proteína Vif como el AcM 3E13 constituyen elementos de suma importancia en el proyecto que se desarrolla en nuestro laboratorio y que tiene como propósito final la obtención de moléculas inhibitoras de la actividad de Vif y por tanto de la replicación del VIH-1.

Teniendo en cuenta estos elementos nos trazamos los siguientes objetivos:

Objetivos.

1. Purificar la proteína VIF a escala analítica con la pureza requerida para estudios inmunoquímicos.
2. Estudiar el curso temporal del crecimiento de la cepa BL21DE3 transformada con el pET28vif y de la producción de la proteína recombinante.
3. Estudiar la influencia del tampón, el pH y el EDTA en el proceso de renaturalización de Vif recombinante.
4. Purificar el anticuerpo monoclonal 3E12 con la pureza requerida para estudios inmunoquímicos.
5. Caracterizar el AcM 3E12 purificado en cuanto a subclase, reconocimiento del antígeno en fase sólida y en solución, especificidad, constante de afinidad y competencia con anticuerpos de referencia.

Revisión Bibliográfica.

Aspectos estructurales y funcionales del VIH.

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, es la mayor epidemia atribuida a un patógeno que haya aparecido en el siglo 20. La misma es causada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) tipo1, descubierto en 1983. El VIH pertenece a la familia de lo retrovirus, subfamilia de los lentivirus y tiene una morfología icosaédrica de 100-110nm de diámetro. El genoma del VIH, está constituido por un ARN de simple cadena que sirve como molde en la síntesis de una cadena complementaria de ADN, la cual a su vez se duplica e incorpora en sitios del genoma celular con una gran actividad de transcripción. El genoma lo constituyen el gen *gag* que codifica para la poliproteína que da lugar a las proteínas de la cápsida del virus; el gen *pol* que codifica para las tres enzimas: la reverso transcriptasa, la integrasa y la proteasa aspártica; y por último el gen *env* que codifica para las proteínas de la envoltura. Además de estos genes, característicos de todos los retrovirus, están los genes que codifican para las proteínas reguladoras y estos son: *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, y *nef* (Lever y cols., 2005).

Las proteínas codificadas por los genes reguladores se denominan igual que estos; y son proteínas involucradas en el ciclo replicativo del virus en la célula. Tat es un factor transactivador con afinidad por el sitio Tar dentro del genoma viral. Su función es aumentar la actividad de la ARN polimerasa II celular y, en consecuencia, el número de copias de ARN destinadas a la síntesis de nuevas proteínas y provirus. La proteína Rev está involucrada en la síntesis de proteínas estructurales y en la salida de los ARNm largos del núcleo. La proteína Vpr detiene el ciclo celular en fase G y facilita la entrada del complejo de integración al núcleo. La proteína Vpu induce la degradación de los receptores CD4 y potencia el proceso de liberación del virus de la membrana. La proteína Nef disminuye la expresión del receptor CD4, las moléculas del MHC-I y del receptor de interleuquina-2. Por último, la proteína Vif (Kao S y cols, 2003) ha sido descrita en la mayoría de los retrovirus, y tiene como función inducir la degradación en los proteosomas de moléculas celulares relacionadas con la destrucción del genoma viral.

El ciclo de replicación del virus comprende diferentes etapas. El virus infeccioso penetra en la célula blanco por la interacción con los receptores CD4 y los receptores de citoquinas (CCR5 y CXCR4 son los más importantes). Esta interacción tiene lugar con la gp 120, la cual media cambios conformacionales

que permiten la fusión de la membrana viral y la celular. Ya en el citosol, ocurre el desnudamiento del virus y la RT-polimerasa sintetiza una nueva cadena de ADNv(-cDNA), la cual se integra en el ADN nuclear por sus extremos LTR. Este proceso es facilitado por un complejo de integración en el cual juega un rol primario la integrasa viral (Goto y cols., 1998).

Una vez que ha tenido lugar la integración del ADN viral en el cromosoma celular, cualquier señal que contribuya a la activación de las células T puede dar inicio al proceso replicativo. En el proceso de replicación del virus intervienen en su mayoría proteínas reguladoras. Dos de las más importantes son Tat, capaz de aumentar en más de mil veces la transcripción de los genes virales y Rev que estabiliza los ARNm largos que permiten comenzar la síntesis de las proteínas estructurales que darán lugar a los nuevos viriones.

Los virus creados encapsulan el ARN viral y salen al exterior a través de un proceso de gemación. Durante la salida arrastran parte de la membrana de la célula a partir de la cual forma su envoltura. Una vez fuera de la célula tiene lugar la maduración, proceso mediado por la proteasa aspártica que es imprescindible para la infectividad de los nuevos viriones.

La terapia anti-retroviral del VIH/SIDA

La terapia anti-retroviral de alta eficacia contra el VIH/SIDA se basa en la combinación de inhibidores contra algunas de las proteínas que intervienen en el proceso de infección y propagación del virus. Los inhibidores que han sido aprobados por las autoridades farmacéuticas para su uso en la clínica están dirigidos contra la transcriptasa reversa, la proteasa aspártica, medidores de la entrada viral y, más recientemente, contra la integrasa.

El VIH presenta un alto grado de mutabilidad, debido a que la reverso transcriptasa no tiene actividad correctora. Esto impide en gran medida el desarrollo de una vacuna eficaz contra el virus y dificulta la eficacia de los inhibidores. Debido a su variabilidad, el virus crea resistencia a un inhibidor después de cierto tiempo de administración, al desarrollar mecanismos alternativos en el proceso de infección.

Además de los blancos clásicos para la inhibición, en estos momentos se incursiona en otras proteínas virales que participan activamente en la infección. Estas proteínas son conocidas por los investigadores como proteínas regulatorias o accesorias y dentro de estas se encuentran Tat, Rev, Nef,

Vpr y Vif entre otras (Goto y cols., 1998).

Entre todas estas proteínas, Vif presenta ciertos atractivos como blanco para inhibidores. Sólo recientemente se ha logrado dilucidar el mecanismo por el cual Vif facilita la replicación del VIH. (Sheehy AM y cols., 2002). Aunque no se ha obtenido un inhibidor de la proteína Vif, se ha reportado un compuesto químico denominado RN-18, capaz de inhibir la función de Vif y la replicación del VIH-1 en presencia de APOBEC3G (A3G) (Nathans R y cols., 2008). El compuesto RN-18 incrementa los niveles de A3G en la célula en función de Vif, su incorporación en los viriones y estimula la degradación de Vif. Dicho compuesto no puede inhibir completamente la degradación de A3G por la vía proteosómica, sin embargo preserva en buena medida la actividad citidina desaminasa mediada por A3G sobre el -cDNA viral.

Además de lo anterior, también se ha utilizado la región variable de la cadena pesada de anticuerpos contra Vif, para bloquear la interacción Vif -A3G. En este sentido se ha logrado inhibir la interacción y los "intrabodies" han conservado su actividad, no así su solubilidad (Aires da Silva F y cols., 2004). Esta estrategia resulta interesante por la gran especificidad de los AcMs obtenidos. La limitante sería obtener un dominio soluble y con una actividad similar a la del AcM parental.

Estudios efectuados con virus deficientes en Vif, cultivados por más de cinco semanas en una línea celular no permisiva mostraron un restablecimiento de la infectividad. El mecanismo utilizado no comprendió el restablecimiento de la función de Vif, sino la acumulación de mutaciones en el promotor y una mutación nula en Vpr (Haché G y cols., 2008). El alcance de estos hallazgos es, sin embargo, muy limitado ya que las condiciones de estos experimentos son difícilmente extrapolables a la situación de los pacientes de VIH/SIDA.

La proteína Vif del VIH

Vif es una proteína altamente conservada, tiene 192 aa, un pI alrededor de 9 y un peso molecular de 23kDa. Es común a todos los lentivirus, con excepción del virus de la anemia infecciosa de equinos (Oberstee y cols., 1992). En su secuencia primaria presenta una serie de dominios presentes en la mayoría de los lentivirus. Hacia su región N-Terminal presenta una serie de residuos de Trp muy conservados y posiblemente relacionados a su interacción con A3G. Algunos investigadores sitúan esta región como crítica en la interacción con A3G (Wichroski y cols, 2004) y en particular a la Ile en la

posición número 9 como un a.a indispensable en la interacción con A3G. Sin embargo, se ha encontrado que la interacción con A3G, incluye las posiciones de la 40-44 (Reingewertz y cols., 2009); de la 13-39, de la 85-99 y de la 169-192 (Fig. 1). Esto excluye a la región N-terminal como la única responsable de la interacción con A3G y deja la posibilidad a algunas de estas posiciones como el sitio de interacción con la posición 128 de A3G; crítica en la conservación de su actividad biológica (Santa – Marta y cols., 2005). Aunque la mayor parte de las interacciones con A3G se describen hacia la C-Terminal, en las posiciones de la 40 a la 71 se ha encontrado un dominio de unión a A3G no linear. Además péptidos y anticuerpos dirigidos contra esta zona han inhibido la unión de Vif –A3G (Mehle y cols., 2007).

Otro dominio muy conservado es el $H_{108}^- C_{139}^- C_{159}^- H_{173}$ (Fig.1); sitio implicado en la unión de una molécula de Zn^{2+} , y de la interacción con la Culina 5 con varios residuos hidrofóbicos contenidos en el dominio. Se le ha atribuido a esta región una estructura en alfa hélice, cuando no se ha coordinado con el Zn^{2+} y de hoja beta cuando esto ha tenido lugar. De cualquier manera, el acomodo espacial al acomplejarse el Zn^{2+} al sitio HCCH determina la multimerización de la proteína y favorece a la vez, la unión de otras proteínas (Mehle y cols., 2006). Entre las proteínas reportadas en la interacción con Vif está Culina 5 y las elonguinas B y C (Xianghui Y y cols, 2003). Además, a Culina 5 se une la proteína RBX2 encargada de rescatar el complejo de ubiquitinación con la siguiente degradación proteosómica. A partir de mutaciones que no permiten la unión del complejo Culina 5 y Elo BC a Vif, se ha demostrado un aumento en la actividad desaminasa de A3G, con la producción de viriones no infectivos (Xianghui y cols., 2003). Estas elonguinas B y C se unen a la caja BC, donde se encuentra la secuencia más conservada en la mayoría de los lentivirus (Steven y cols., 1992) denominada: *SLQXLA*. La misma se localiza hacia la región C-Terminal y es la responsable de la unión de las proteínas elonguinas B y C. Estas a su vez unen a la Culina 5 para formar el complejo mencionado.

Otro posible mecanismo relacionado con este sitio es la fosforilación de la ser144, encontrada en el dominio *SLQXLA*, junto a la thr148 y thr155. Estos residuos son susceptibles a la fosforilación por una S/T quinasa celular capaz del reconocimiento en Vif de secuencias como: R/KXXS/T y R/KXXXS/T. Se conoce de una disminución en la infectividad del VIH-1 en más de un 90 % cuando se muta la ser144 por una ala (Xiaoyu y cols., 1996). La demostrada fosforilación *in vivo* de la ser144 puede atribuirle un papel a este dominio en la funcionalidad de la proteína.

Hacia esta región C-Terminal, en especial entre las posiciones 151 y 164 se plantea que se ubica el sitio de multimerización de la proteína (Fig. 1). A esta conclusión se llegó luego de mutar esta región y comprobar como la infectividad en células no permisivas tenía iguales valores a los alcanzados por virus deficientes de Vif (Shicheng y cols., 2001).

Otros sitios de interacción reportados en Vif se muestran en la figura 1.

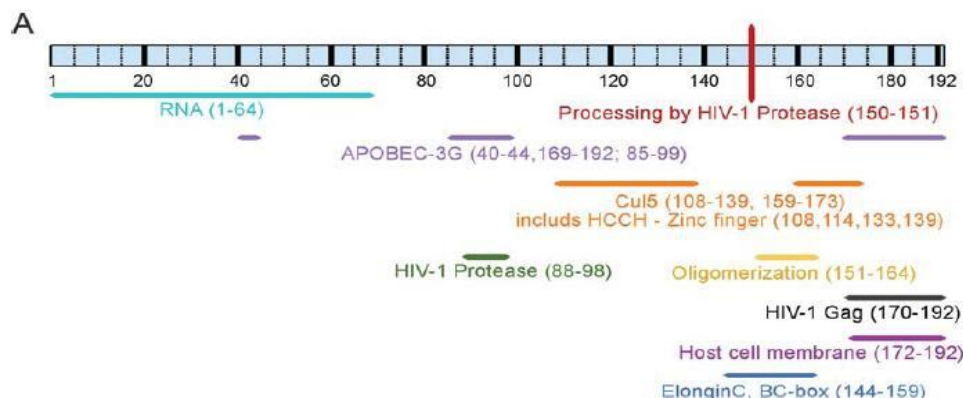


Figura 1. Mapa con los sitios de interacción encontrados en Vif. (Reingewertz y cols., 2009)

La posición 170-192, es una región de interacción con proteínas de la cápsida; la región 172-192 es de interacción con la membrana, la posición 88-98 es de interacción con la proteasa del VIH y la posición 150-151 es el sitio de proteólisis de esta misma proteasa.

Además de estos sitios de interacción con proteínas se ha reportado la unión de Vif al ARN y al ADN (Bernacchi y cols., 2007). La unión al ARN se encontró en el sitio Tar, hacia la región 5' del ARN viral. Esta unión juega un papel importante durante la incorporación de Vif a los viriones y en el acomodo espacial de la partícula viral. La unión al ADN, tendría lugar luego de penetrar el virus en la célula. La importancia de esta interacción estriba en eliminar aquellas moléculas de A3G que se hayan escapado, de la interacción con Vif en el citosol. Además, la afinidad de Vif por los mismos sitios de unión de A3G al ADN; le confiere a este factor de infectividad un nuevo papel más allá del comprobado proceso de ubiquitinación.

La estructura tridimensional de Vif no ha sido establecida, pero para acercarse a su relación estructura/función se ha propuesto una modelación computacional (Fig. 2) (Balaji y cols., 2006) basada en su homología con otras proteínas. La estructura propuesta tiene un 25 % de homología con la proteína que se empleó como molde en el alineamiento de su secuencia. Los sitios de fosforilación encontrados son: ser 146, dentro del motivo SLQXLA, y la Thr188 contenida en el motivo R/KXXXS/T y

reconocida por la proteína quinasa dependiente de GMPc. La Thr 153 fue el otro sitio de fosforilación encontrado. La ser 146 ha sido reportada como el sitio más conservado en Vif, y mutaciones en dicho sitio abrogaron la infectividad del virus. Teniendo en cuenta este modelo y los datos experimentales sobre la importancia de este residuo, se mutó el mismo por una alanina. Lo que se obtuvo fue que el volumen espacial del átomo de oxígeno, de la ser146, cubre la entrada a una cavidad de la proteína, mientras no ocurre así con el átomo de hidrógeno de la alanina.

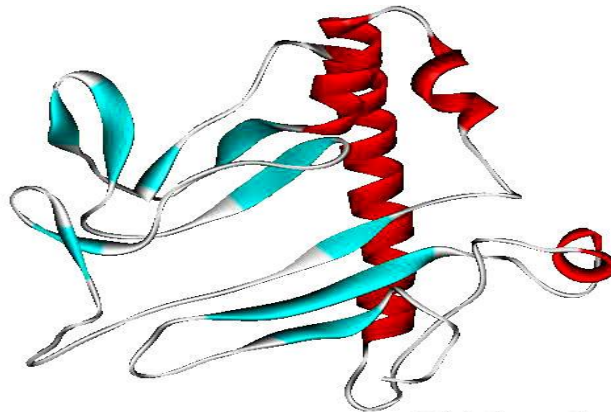


Figura 2. Modelo propuesto por Balaji y cols., 2006, para la proteína Vif.

A pesar de las consideraciones de este modelo, el por ciento de homología reportado en el alineamiento de la secuencia es muy bajo. Por esta razón los modelos predictivos con menos de un 80% de homología, tienen grandes divergencias con la estructura cristalográfica, cuando es obtenida.

Como la homología de Vif con otras proteínas cristalizadas, es mínima se han utilizado técnicas alternativas con el fin de lograr la estructura espacial de alguna de las regiones antes mencionadas. Dentro de estas regiones la C-Terminal, se muestra como la más importante por el gran número de interacciones que en ella tienen lugar. En este sentido

Se ha logrado la estructura cristalográfica de un péptido que mimetiza la región 139-176, en interacción con las elonginas B y C (Stanley y cols, 2008). Estos resultados muestran una conformación de una hélice en bucle de la caja BC en unión con las elonginas B y C. Otro estudio de esta región fue con la síntesis de un péptido, con un bloque de prolina, con el objetivo de predecir su disposición espacial en condiciones fisiológicas. Con el empleo del espectro del dicroísmo circular se planteó una estructura con residuos de una hélice. El espectro de la resonancia magnética nuclear reveló una estructura no plegada. En este mismo estudio el desorden en la estructura de Vif disminuyó

cuando interactuó con un péptido de la región de la elonguina C, que interactúa con Vif (Reingewertz y cols., 2009). De acuerdo a estos resultados, es posible que la proteína solo adopte su estructura una vez haya interactuado con las otras proteínas descritas, lo cual lleva a la oligomerización de la misma. Este paso de formación de multímeros se ha descrito como fundamental en su unión a A3G (Yang y cols., 2001) y en muy estrecha relación con la unión del Zn^{2+} al sitio $H_{108}^- C_{139}^- C_{159}^- H_{173}$.

Existen líneas celulares que son permisivas a los virus mutantes de Vif mientras que otras muestran un fenotipo resistente a dichos virus.

En células infectadas, Vif se puede encontrar asociada a la membrana plasmática (Goncalves y cols., 1994) en el núcleo de la célula y en mayor por ciento asociada al citoesqueleto (Karczewski y cols., 1996).

La familia APOBEC3 y su función anti-retroviral.

APOBEC3G es una citidina-desaminasa celular con una actividad antiviral potente (Sheehy y cols., 2002). Esta y varias proteínas de la familia APOBEC3 son empaquetadas en los viriones de VIH-1 y desaminan las citidinas convirtiéndolas en uracilos, induciendo de esa forma una hiperpermutación masiva G/A en el genoma viral. Esto ha sido comprobado en otros retrovirus como el virus de la leucemia en ratones, donde además de una fuerte desaminación en el cDNA del retrovirus, también es capaz de empaquetarse en los nuevos viriones (Harris y cols., 2003). Luego de la mutación de dCTP por dUTP en el cDNA, se han propuesto varios modelos como explicación a la inmunidad innata implícita en A3G. Uno de ellos responsabiliza a la fijación de estas mutaciones en el ADN como la causa de la pérdida de la funcionalidad de la proteína y a la infectividad del virus. El otro modelo dice que la acumulación de dUTP en el cDNA hacen inestable al ADN y activan una uracil ADN glicosidasa celular; similar a las endonucleasas purínicas y apurínicas; encargada de destruir el cDNA (Mangeat y cols., 2003, Zhang y cols., 2003). Una tercera posibilidad involucra a los dUTP en el fallo de la iniciación de la replicación en la cadena complementaria del cDNA (Klarmann y cols., 2003).

Las proteínas APOBEC3 pueden también ejercer actividad antiviral vía mecanismos independientes de su actividad citidina-desaminasa (Turelli y cols., 2004).

Sitios de interacción de APOBEC3G con la proteína Vif.

Para el estudio de los posibles sitios en A3G capaces de interactuar con Vif, se ha dividido A3G,

primero en dos mutantes (Conticello G y cols, 2003): el primero simula la región N-terminal (1-215) y el segundo la región C-terminal (197-384). Cuando ellos evalúan la posible interacción entre de cada una de estas regiones con Vif, solo observan interacción en la región N-Terminal. Luego, a esta región la dividieron en cuatro secuencias denominadas: N1 (aa1-61), N2 (aa54-124), N3 (aa121-161) y N4 (aa156-198). Estas secuencias fueron co-expresadas en células no permisivas junto con *vif* y solo en el segmento N2 se encontró interacción con Vif. Este segmento (N2) se localiza dentro del dominio de Zn^{2+} propuesto para esta proteína de acuerdo con estudios de homología entre secuencias de la familia Apobec.

En otro estudio para identificar los sitios de A3G que interactúan con Vif, Zhang y cols.,(2007) encontraron una región próxima al dominio de unión Zn^{2+} hacia el N-Terminal de A3G involucrada en la asociación con Vif y su correspondiente degradación. Ellos dividieron a la proteína A3G en dos mutantes; uno hacia la región N-Terminal (aa1-245) y el otro hacia la región C-Terminal (aa105-384). Sobre cada uno de los mutantes detectaron actividad degradativa mediada por Vif; lo cual sugiere que la región común a ambos fragmentos (aa105-245) debe ser la responsable de tal actividad. Luego construyeron dos mutantes más, uno de ellos comprendía el N-Terminal, desde la posición 1 hasta la 156 y el otro la C-Terminal desde la región 157 hasta la 384. En ninguno de los caso encontraron actividad degradativa significativa respecto a los dos primeros mutantes evaluados. Esto significa que esta región común a los primeros mutantes (aa105-245), si está implicada en la degradación, depende de la unión de su N y su C-Terminal para adoptar una estructura espacial adecuada. La otra posibilidad implica la existencia de dos dominios dentro de la secuencia: uno implicado en la interacción con Vif y el otro en la inducción de la degradación de A3G donde el evento de degradación dependa de la interacción previa.

De acuerdo con estas dos posibilidades, se demostró, la existencia de un sitio de interacción en la región 57-245. Luego expresaron el fragmento (105-245) y comprobaron, a pesar de su inestabilidad, que la acción degradativa sobre este era similar a A3G en su forma salvaje. Además comprobaron la actividad inhibitoria de los mutantes: aa1-156 y aa157-384 en relación con el aumento de la expresión de A3G en presencia de Vif y en ambos casos se evidenció actividad inhibitoria sobre Vif. De manera interesante el C-Terminal de esta región inhibió predominantemente la degradación de A3G aún cuando se postulaba como primer paso la unión con la región N-Terminal. Cuando se quiso estudiar la

ubiquitinación de los residuos de lys en esta región no se pudo demostrar su participación en el proceso de ubiquitinación. Esto sugiere la existencia de otro factor que sirva como señal desencadenante del proceso degradativo. Por último se estudió el efecto de los fragmentos 1-156 y 157-384 en la inhibición in vivo de la replicación del VIH en células no permisivas y se encontró un 34% y un 12% respectivamente de inhibición.

Aunque a la región descrita (105-245) se le atribuye un papel importante en la degradación de A3G, los estudios sugieren un efecto inhibitorio pequeño. Una de las explicaciones puede ser la necesidad de conservar la estructura espacial de la región N-Terminal de A3G; de gran importancia en la degradación por Vif. En cuanto a este aspecto la longitud de los péptidos y el hecho de constituir pequeños fragmentos de un todo los limita como posibles inhibidores.

Lo interesante de los dos resultados es la presencia de una región común de 19aa incluida tanto en el fragmento N2 descrito por Contincello y cols., 2003, como en el fragmento 105–245. Esta región de 19aa para la cual se demostró interacción con Vif, forma parte de los mutantes: 1-245, 1-156, 105-384. En los cuales también se comprobó su interacción con Vif (Zhang y cols., 2007) y solo en el mutante 157-384, que no contenía esta región, no se determinó interacción entre ambas proteínas. Estos resultados sugieren a esta secuencia como un posible blanco terapéutico, si se tiene en cuenta su ubicuidad en cuatro fragmentos en las cuales se encontraron evidencias de interacción entre Vif y A3G.

Mecanismos de acción de Vif.

Se ha descrito que Vif es capaz de interactuar con APOBEC3G, y al mismo tiempo con las proteínas celulares Culina5 y las elonginas B y C (Elo B y Elo C) para formar el complejo ubiquitina ligasa. Este complejo de proteínas es el encargado de unir APOBEC3G a ubiquitina para que esta la conduzca hacia los proteosomas donde es degradada y de esa forma inactivada (Yu y cols., 2003; Mehle y cols., 2006). La secuencia de unión de Vif a las elonginas B y C se ha identificado como el dominio SLQXLA. La Culina 5 se enlaza a una región de aa hidrofóbicos del dominio HCCH y a este dominio se enlaza una molécula de Zn^{2+} . La unión del Zn^{2+} favorece la formación de multímeros y las demás interacciones de Vif con las proteínas del citoesqueleto contribuyen a los cambios conformacionales en la estructura de Vif que favorecen su interacción con Apob3g y la degradación de la última.

También a Vif se le ha atribuido la función de evitar el empaquetamiento (Kao y cols., 2003) de

Apobec3g en los viriones. En los cuales no destruye el ARNm, sino el ADNc formado al infectar un linfocito T.

Dominios antigénicos de Vif, de acuerdo a su reconocimiento por anticuerpos monoclonales.

La proteína Vif del VIH-1 se ha reportado poco inmunogénica, aunque se han detectado anticuerpos contra ella en sueros de pacientes tanto en etapas tempranas como tardías de la enfermedad.

En la búsqueda de dominios antigénicos, se ha reconstruido la proteína Vif empleando péptidos sintéticos sobrelapados de toda su secuencia. Estos péptidos se enfrentaron a sueros de pacientes positivos para VIH-1 y, en particular, para la proteína Vif. De esta manera se determinaron los epitopos: S87K/EWRKKRY94 y K176PQKTKGHRRSHTMNG192; el primero ubicado hacia el N-Terminal y el segundo hacia el C-Terminal. Además de estos dominios, la secuencia SHTMNGH fue reconocida solo por dos AcM de ratón (IgG1) (Ulrike y cols., 1991). Otro dominio inmunogénico reportado es TPKKIKPLPSVTK (Sodrowski y cols., 1986). En este caso se inmunizó con el péptido sintético correspondiente a esta secuencia. Dentro de esta misma secuencia, se han levantado anticuerpos en ratón contra el dominio PLPSVT (Khalife y cols., 2004). Además, este AcM ha reconocido otras proteínas distintas a Vif, pero que comparten la mayor parte del dominio descrito. Estos resultados evidencian el carácter inmunogénico del dominio C-Terminal de la proteína Vif, en especial del sitio rico en aminoácidos apolares.

Además de los sitios descritos se han reportado dos anticuerpos monoclonales comerciales de la compañía Transgene, contra la proteína recombinante Vif, producida en *E.coli*. Estos son el TG001, dirigido contra la región C-Terminal K₁₇₆PQKTKGHRRSHTMNG₁₉₂ y el TG002, obtenido contra la región N-Terminal K₃₄ARGWFYRHHYE₄₇.

En resumen los estudios de inmunogenicidad realizados apuntan hacia las regiones N y C-Terminal como los sitios más inmunogénicos dentro de la proteína recombinante Vif.

Materiales y Métodos.

Cepa de E. coli.

Se empleó la cepa BL21-DE3 (F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)) Novagen (Madison, WI). Esta cepa ha sido transformada con el plasmidio de expresión pET28aVIF, que contiene el gen Vif bajo el control del promotor T7 (Duarte y cols., resultados no publicados).

Cinética de expresión del gen vif.

Cincuenta μ l de un glicerol de la cepa BL21-DE3/pET28aVIF se usaron para inocular 5 ml de cultivo LB, en presencia de Kanamicina (50 μ g/ml). El precultivo se dejó crecer toda la noche y con el mismo se inocularon tres cultivos de 300 ml (A, B y C), de manera tal que se lograra una D.O. teórica de 0.1UA. Al igual que con el precultivo se adicionó Kanamicina (50ug/ml).

Luego de transcurridas dos horas se indujeron los cultivos A y B, con isopropil-1- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) (BDH, Reino Unido) (0.33mM); mientras el B servía como control negativo de la inducción. Después de preparar los cultivos y colocarlos en la zaranda (New Brunswick) a 37°C en el cuarto de incubación se muestrearon a intervalos de 1 hora aproximadamente para la medición de la D.O_{620nm}. Este proceso se repitió hasta la octava hora de crecimiento. Se hicieron las diluciones necesarias para que el valor de las D.O cayese dentro del rango lineal de la curva.

De acuerdo con estudios previos se hizo la inducción con 0.33mM IPTG a las dos horas de crecimiento de los cultivos A y B mientras el C fue el control negativo de la inducción. Desde la segunda hora de crecimiento hasta la octava hora se tomaron los volúmenes resultantes de la relación 0.8/D.O_{260nm}. Las muestras colectadas se emplearon en una electroforesis SDS-PAGE y en un western-blot con sobrenadante de cultivo del anticuerpo monoclonal (AcM3E12) obtenido en el laboratorio contra la proteína. (Duarte, C y cols., resultados no publicados).

Ruptura de la biomasa.

Luego de ajustadas las condiciones de crecimiento para Vif, se inocularon y cultivaron cuatro erlenmeyers con medio LB siguiendo las condiciones descritas en el experimento anterior. Esta biomasa se cultivó hasta 8h en zaranda, se detuvo su crecimiento por centrifugación a 3500rpm. A la misma (biomasa) se le determinó el peso húmedo, siendo de 3.8g y se resuspendió hasta 0.1 g de biomasa por

ml de tampón trisHCl- EDTA.

Para la ruptura se emplearon cuatro ciclos de ultrasonido (70%) de 1min de ruptura y uno de descanso.

La muestra se distribuyó en alícuotas de 1ml, se centrifugó a 10000rpm por 10min y el precipitado se resuspendió en 1ml de 4MGuHCl, 150mM NaCl, 50mM MES, pH 7.0. Luego de 5 minutos de agitación fuerte en vortex, la muestra se volvió a centrifugar a las mismas condiciones y la fracción soluble se colectó en un solo tubo.

Cromatografía en gel de Ni²⁺-NTA-agarosa.

La muestra extraída en las condiciones descritas en el acápite anterior se pasó por una columna PD5 con 1mL de Ni²⁺-NTA-agarosa (Quiagen) equilibrada en tampón MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico) (BDH, Reino Unido) 50mM, NaCl 150mM, GuHCl 4M, pH 7.0. El volumen aplicado a la columna fue de 12mL y se colectó la fracción no adsorbida. Luego se lavó con 3ml del tampón inicial y se eluyó consecutivamente con 5ml del mismo tampón MES pero a pH 5.5 y pH 5.0. Por último se dejó equilibrada la columna en el tampón inicial (4MGuHCl, 150mM NaCl, 50mM MES, pH 7.0). Todo el tiempo se trabajó a gravedad.

Estudio de renaturalización de Vif en diferentes tampones.

Se prepararon 16 tampones; cada uno con un volumen final de 50ml y acida sódica al 0,05% y se dividieron en cuatro grupos. El orden de los tampones; en los cuatro grupos fue el siguiente:

Grupo1.

1. PBS1X, 1mM EDTA, 2M GuHCl, pH7.4.
2. PBS1X, 1mM EDTA, 1M GuHCl, pH7.4.
3. PBS1X, 1mM EDTA, 0.5M GuHCl, pH7.4.
4. PBS1X, 1mM EDTA, 0.25M GuHCl, pH7.4.
5. PBS1X, 1mM EDTA, 0M GuHCl, pH7.4.

Grupo2.

PBS1X, sin EDTA, pH7.4, con las mismas variantes de GuHCl que el grupo anterior.

Grupo3.

50mM MES, 150mM NaCl, 1mM EDTA, pH6.2, con las mismas variantes de GuHCl que los anteriores.

Grupo4.

50mM MES, 150mM NaCl, sin EDTA, pH6.2, con las mismas variantes de GuHCl que los anteriores

Además se prepararon muestras con 200µg de la proteína Vif (elución de p=5.0 de Ni²⁺NTA, diluidos en 1ml de tampón: 50mM MES, 150mM NaCl, 1mM EDTA, GuHCl 4M, pH 7.0.

Luego se dializaron las cuatro muestras de forma simultánea, y a razón de 1h contra cada tampón de su grupo, con agitación y a temperatura ambiente. De esa manera se busca una reducción gradual en la cantidad de GuHCl desde 4M en la muestra inicial hasta 0 en el último paso de diálisis. Después de dializar, las muestras se centrifugaron 10min a 10000rpm para eliminar los agregados insolubles que se pueden formar.

Renaturalización final del eluato de pH 5.0.

El eluato a pH 5.0, se diluyó hasta una concentración de 0.2mg/ml. Luego se dializó durante 2 horas con agitación y temperatura ambiente de forma sucesiva contra 2L de los tampones del grupo 3 previamente descritos. Después de dializar, la muestra se centrifugó 10min a 10000 rpm para eliminar los agregados insolubles que se pueden formar.

El eluato dializado se concentró por ultrafiltración desde 30ml hasta un 5ml con una membrana de tamaño de poro de 10 kDa, (Amicon, YM10).

Precipitación de las muestras.

Las muestras de proteína en 4M GuHCl obtenidas durante la cromatografía en columna Ni²⁺-NTA-agarosa y durante los experimentos de diálisis se precipitaron de acuerdo al siguiente protocolo.

Se tomó el volumen de proteína a precipitar de acuerdo con la cantidad deseada, y se le agregó ácido tricloroacético (TCA) (100%) al 10%. A continuación se le adicionó acetona disuelta al 90%, en agua, se agitó y se dejó por 20min a -20C°. Se centrifugó 15min a 10000rpm, se desechó el sobrenadante, se lavó el precipitado con 1ml de acetona (90%) y se agitó en vortex 1min. Luego se incubó nuevamente a -20C° y se siguieron los pasos de lavado hasta 3 o 4 veces. El precipitado final se resuspendió en tampón muestra 1X, de acuerdo a la concentración deseada.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para la electroforesis se prepararon geles de poliacrilamida al 15% y se siguió el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Como patrón se empleó un patrón de peso molecular de amplio rango de la firma Bio-Rad (PPM) (pesos moleculares: miosina, 200kD; β galactosidasa, 116.3 kD; BSA, 66.2; ovoalbumina, 45kD; anhidrasa carbónica, 31kd; Inhibidor de tripsina, 21.5kD; lisozima, 14.4kD; apteoinina 6.5kD, y se siguieron las indicaciones del fabricante.

Para la preparación de las muestras colectadas durante la cromatografía, en todos los casos, primero se precipitaron según el protocolo descrito y se aplicaron 10 μ g de proteínas totales de cada una de las fracciones colectadas.

Al comparar las muestras de biomasa, con el fin de obtener la misma cantidad de bacterias para que lo aplicado fuese aproximadamente equivalente entre las diferentes muestras, se empleó la fórmula: $V_{\text{centrifugado}} = 0.8/D.O$ mL para determinar el volumen de cultivo a centrifugar para cada muestra. Después de centrifugar se retiró el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 100 μ L de tampón de muestra 1X con azul de bromofenol y se aplicaron 10 μ L en el gel.

Tanto Vif como el AcM 3E12, se analizaron en condiciones reductoras y no reductoras, para lo cual se diluyeron las muestras en los correspondientes tampones: tampón de Laemmli para las condiciones reductoras y el mismo sin β mercaptoethanol y sin SDS para las condiciones no reductoras.

En todos los casos las muestras se calentaron 5 min a 98°C y se aplicó la cantidad de proteína especificada en cada caso.

Análisis por densitometría a las electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

El estimado del % representativo de la banda de interés, respecto al total, se realizó con la ayuda del programa Image J 1.42d Wayne Rasnband National Institutes of Health USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij>. Todos los geles se llevaron a un formato de 32 bit y se les determinó la contribución de la banda de interés mediante una relación de picos representativos de las intensidades de las distintas bandas en cada carril.

Western blot.

Para todos los ensayos de Western blot se prepararon geles de poliacrilamida al 15% según se

describió anteriormente y para la transferencia se siguió el procedimiento descrito por Towbin (1979). Se emplearon membranas de nitrocelulosa (Osmonics, EE.UU). Para el revelado se empleó el AcM 3E12 a una dilución 1:100 del sobrenadante de cultivo. Se empleó una dilución 1:1000 del conjugado anti-IgG de ratón con peroxidasa de rábano (HRPO), utilizando como sustrato diaminobencidina (DAB) (5mg/10mL de PBS 1X) y H₂O₂ (5µL/10mL de PBS 1X).

Purificación del anticuerpo monoclonal anti-ratón 3E12

Material de partida: ascitis obtenida de ratones inoculados con 1 millón de células.

Se empleó una columna de proteína A Sefarosa (Amersham-Pharmacia) (volumen de columna 5ml). La muestra inicial de 14 ml de ascitis de ratón se diluyó ½ en tampón 1,5M glicina; 3M NaCl y pH8.9. La columna se equilibró en el mismo tampón de dilución y acoplada a una bomba peristáltica con un flujo volumétrico de 1,8 ml/min, se colectaron muestras por elución en tampón citrato a los pH: pH6.0; pH5.0; pH4.0; pH3.0. Además se debe mostrar el cromatograma de elución.

Las fracciones eluidas se evaluaron, mediante un ELISA de reconocimiento con previo recubrimiento con Vif según los procedimientos que se describen más adelante.

Luego de comprobar que nuestro anticuerpo eluye a pH 6.0, se dializó el volumen final de elución contra PBS 1X por 1h a temperatura TA y en agitación.

Luego de dializarse se concentró la solución, hasta aproximadamente la quinta parte del volumen colectado durante la elución pH6.0, con una membrana de 50 kDa de tamaño de poro. Por último se le determinó la concentración midiendo D.O_{280nm} y de acuerdo con el coeficiente de extinción molar para la IgG de ratón (1,4); tomando el promedio de las diluciones hasta aproximadamente 0,1 de D.O_{280nm}.

Estimación del grado de pureza del 3E12 purificado.

El grado de pureza se determinó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no reductoras y reductoras. Aplicando para cada condición las siguientes cantidades de anticuerpo: 2.1, 4.2, 8.4 y 10.5 µg. Por último se le hizo densitometría a las bandas obtenidas en la electroforesis para estimar el grado de pureza.

Determinación de la constante de afinidad del AcM 3E12.

Para determinar la K_d del 3E12, se empleó un equipo Biacore X (Biacore AB), con el objetivo de

calcular la afinidad de nuestro AcM 3E12 por Vif con la mayor exactitud posible. Para esto se trabajó con un chip de unión a metales que presenta el ácido nitrilotriacético pre-inmovilizado en una matriz de Dextrana (sensor chip NTA, Biacore AB). Este chip permite la captura de proteínas capaces de formar enlaces de coordinación con el Ni²⁺ quelado por el ácido nitrilotriacético. Como tampón de corrida se empleó Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 50 mM, detergente P-20 0.005%, pH 7,2 y el flujo de trabajo fue de 20 µL/min. Con el objetivo de cargar la superficie del chip con Ni²⁺ se aplicaron 20 µL de una solución de NiCl₂ 0.5M por ambos canales de interacción del equipo i.e. Fc1 y Fc2. Luego se aplicaron 20 µL de la proteína Vif a una concentración de 30.1 nM en tampón MES 50mM, NaCl 150mM, pH 6.2 por el canal Fc1. En estas condiciones se obtuvo una superficie con 149 ±19 RU de Vif en el canal Fc1. El AcM 3E12 se aplicó en diferentes concentraciones en un rango de 50-6.25 nM, diluido en tampón de corrida. Se aplicaron 60 µL de cada una de las diluciones del AcM por ambos canales y se registraron 3 min de disociación en cada aplicación. La substracción automática de las señales obtenidas en el canal Fc2 a las señales obtenidas en el canal Fc1 permitieron registrar de manera específica las señales generadas por la interacción del AcM 3E12 con la proteína Vif. Para regenerar la superficie se aplicaron 5 mL de GuHCl 4M, HCl 20 mM. En el caso del TG002 no se detectó reconocimiento de la proteína unida al chip en concentraciones de hasta 100nM.

Para el cálculo de la K_d se empleó el programa BiaEvaluation v 4.1 (Biacore AB). Se realizó un ajuste global empleando las curvas obtenidas con todas las diluciones del Ac3E12 y la curva generada por la aplicación del tampón de corrida. El ajuste de las curvas se hizo por el modelo de interacción Langmuir 1:1. Ensayo de competencia entre el 3E12 y los anticuerpos TG001 y TG002.

Biotinilación del 3E12.

Se tomó el volumen correspondiente a 2mg de 3E12, y se concentró hasta 200ul en un concentrador Centricón de tamaño de poro de 10 kD. La concentración final fue de 10mg/ml en tampón bicarbonato pH 8.5. A este volumen se le adicionaron 20 µl de biotina, preparada previamente (10mg/ml) en 100 µl de dimetil sulfóxido (DMSO), y la mezcla se dejó incubar 1h en agitación a temperatura ambiente. El preparado biotinilado (220ul) se dializó 2h contra PBS pH7.4.

El anticuerpo biotinilado se llevó hasta 1mg/ml (dilución 1/10), y se tituló mediante un ELISA, para determinar la dilución de trabajo.

Para el ELISA de titulación del 3E12 biotinilado, se recubrieron placas con Vif (CIGB), se lavó, se bloqueó con leche y se adicionó el 3E12, partiendo de una dilución 1/5000. El revelado fue con extravidina peroxidasa (1/1000).

Ensayos de ELISA.

El recubrimiento de cada placa con Vif (1 µg/ml o 5µg/mL) fue en 50mM MES, 150mM NaCl pH6.2, a 40°C y en vacío toda la noche. El recubrimiento con los AcM TG001, TG002 y el 3E12 fue en tampón de recubrimiento toda la noche a 4°C. Los lavados se efectuaron siempre en PBS, tween-20 (0.05%). Después del recubrimiento y el bloqueo se lavó solo una vez, en los otros pasos se lavó cinco veces. El bloqueo de las placas fue 1h a 37°C en leche 1% en PBS1X. Los anticuerpos se incubaron y diluyeron en las mismas condiciones del bloqueo con tween-20 (0.1%). Como conjugados se utilizaron: el conjugado anti-IgG de ratón HRPO (Sigma) diluido 1:3000 para los anticuerpos de ratón. Para el policlonal de conejo se usó el conjugado anti IgG de conejo HRPO (Sigma) diluido 1:10000. El conjugado extravidina peroxidasa se usó para el AcM 3E12 biotinilado a una dilución 1:1000.

El revelado de todos los ensayos tubo lugar en oscuridad (10-15min), con el sustrato cromógeno orto-p-diamino bencidina (OPD) (0.2 mg/ml) y H₂O₂ (0.05%) en tampón sustrato pH 5.5. Para detener la reacción se adicionó en cada pozo 50µl de H₂SO₄ (2M) y se procedió a leer la absorbancia a 492nm.

ELISA de competencia entre los anticuerpos comerciales (TG001 y TG002) y el 3E12, recubriendo con 1ug/ml de proteína Vif (CIGB).

Se recubrió una placa con proteína Vif-CIGB (1µg/ml), en tampón 50mM MES, 150mM NaCl pH6.2 y se dejó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se. Posteriormente se bloqueó, se lavó y se adicionaron los siguientes anticuerpos:

TG001 (diluciones 1/5, 1/10, 1/20, y 1/40).

TG002 (5, 2.5, 1.25 y 0,625ug/ml).

3E12 (5, 2.5, 1.25 y 0,625ug/ml).

332 (5, 2.5, 1.25 y 0,625ug/ml).

Además se incluyó un blanco y un máximo, para los cuales se añadió PBS leche en este paso. Se incubaron por 1h a 37°C. A continuación se lavó varias veces, y se adicionó el anticuerpo biotinilado

3E12 (1/30000), excepto en los pocillos correspondientes al blanco, y se incubó a 37°C por solo 15min. La placa se lavó y se adicionó el conjugado extravidina peroxidasa y luego el sustrato.

Ensayos para comparar el reconocimiento de la proteína Vif de referencia y la purificada en nuestro laboratorio por los anticuerpos monoclonales: TG001, TG002 y 3E12.

Para demostrar el reconocimiento de la proteína Vif purificada por nuestro laboratorio y compararla con una proteína de referencia recombinante (rVif–NIBSC) se procedió de la siguiente manera:

Se recubrieron placas de ELISA con la proteína Vif (de referencia y la obtenida en nuestro laboratorio)). Luego se lavaron las placas para eliminar los restos de sales. Se bloqueó y se adicionaron los AcM de la siguiente manera:

El TG001 se diluyó 10 veces, el TG002 se llevó 2µg/ml, el 3E12 y el AcM 332(control negativo) también se llevaron a la misma concentración del TG002. A los cuatro anticuerpos se les hicieron diluciones seriadas a partir de las diluciones y molaridades iniciales mencionadas. Luego de lavar las placas, se adicionó el conjugado anti IgG de ratón HRPO y se incubó por 1h a 37°C.

Ensayo para comprobar la especificidad del AcM 3E12

Se recubrieron las placas con Vif a 5 o 1µg/mL y BSA 5µg/mL. Se añadió el sobrenadante de cultivo del AcM 3E12 a una dilución 1:100, el TG002 a 1 µg/mL y el AcM 332 como control negativo (CN). En los tres casos se evaluó en paralelo la unión directa y en competencia con 10µg/mL de Vif en solución. Para el resto del ensayo se siguieron las mismas condiciones generales establecidas.

Ensayo para evaluar reconocimiento de la cola de histidina por el AcM 3E12

Se recubrieron placas con Vif y el dominio II recombinante de la proteína de la envoltura del virus dengue (DII) a 5µg/mL. Se añadieron diluciones seriadas dobles del AcM 3E12 a partir de 0.1µg/mL o del AcM comercial anti His (Serotec) a partir de 1µg/mL. Para el resto del ensayo se siguieron las mismas condiciones generales establecidas.

Determinación de la subclase del 3E12.

La subclase de IgG a la que pertenece se determinó mediante un ELISA. Se recubrió con Vif; se lavó, se adicionó el 3E12 sin biotinar (1/10000), y por último se adicionaron los conjugados siguientes: anti-IgG-1, IgG2a e IgG2b (ICN-Flow). Además se adicionó un conjugado (HRPO) contra la cadena

pesada de IgG de ratón. Este anticuerpo sirvió como indicativo de la señal máxima, respecto a las demás condiciones. Se usaron como blanco pocillos sin recubrir con la proteína. Además teniendo en cuenta las mismas condiciones se comprobó la subclase del TG0002.

Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas presente en cada fracción recogida se determinó por el método del ácido bicinonínico (BCA) utilizando un kit para este ensayo (Pierce, EE.UU.) y siguiendo las orientaciones del fabricante.

Resultados y Discusión

Purificación y Caracterización de Vif

En este primer bloque de resultados nos referiremos a una serie de experimentos realizados para profundizar en el estudio de algunos de los pasos en la producción a escala analítica de la proteína Vif-CIGB.

Curso temporal del crecimiento de los cultivos y expresión de *vif*.

Como primer paso nos planteamos estudiar la cinética de crecimiento bacteriano de la cepa BL21DE3 transformada con el plasmidio pET28vif. Hasta la segunda hora de crecimiento los valores de D.O son prácticamente iguales, con una desviación estándar menor de 10^{-3} (Fig.3). A partir de la tercera medición, una hora después de la inducción de los cultivos A y B, la curva de crecimiento comienza a separarse de forma evidente con relación a la del cultivo control.

La velocidad media de crecimiento del cultivo se puede expresar mediante la siguiente fórmula: $\Delta D.O_{620nm}/\Delta T(h)$. De acuerdo con esta relación en el intervalo entre las 2 y 5 la $V_{\text{crecimiento}}$ para el cultivo A fue de 0.18 UD.O_{620nm}/h; para el B 0.18 UD.O_{620nm}/h, y para el C 0.33 UD.O_{620nm}/h.

Estos resultados reflejan como a partir de la inducción y hasta la 5ta hora de crecimiento, el cultivo C creció dos veces más rápido que los cultivos inducidos A y B. De la 5ta hora en adelante la velocidad del cultivo C continuó siendo mayor que la de los cultivos inducidos.

La disminución en el crecimiento de A y B a partir de la inducción puede explicarse porque el metabolismo de las bacterias se desvía hacia la síntesis de la proteína Vif mientras en el cultivo C, no inducido, el metabolismo está en función del crecimiento bacteriano.

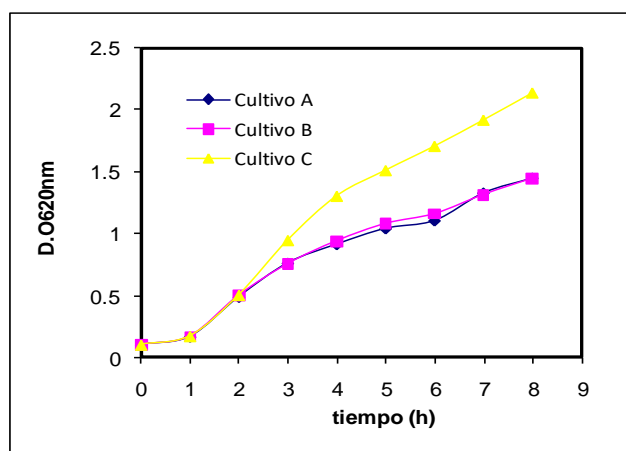


Figura 3. Curso temporal del crecimiento de los cultivo A, B y C. Los cultivos Ay B fueron inducidos a las 2h de crecimiento, con IPTG (0,33mM), mientras C no se indujo. El crecimiento se detuvo a las 8 horas de cultivo.

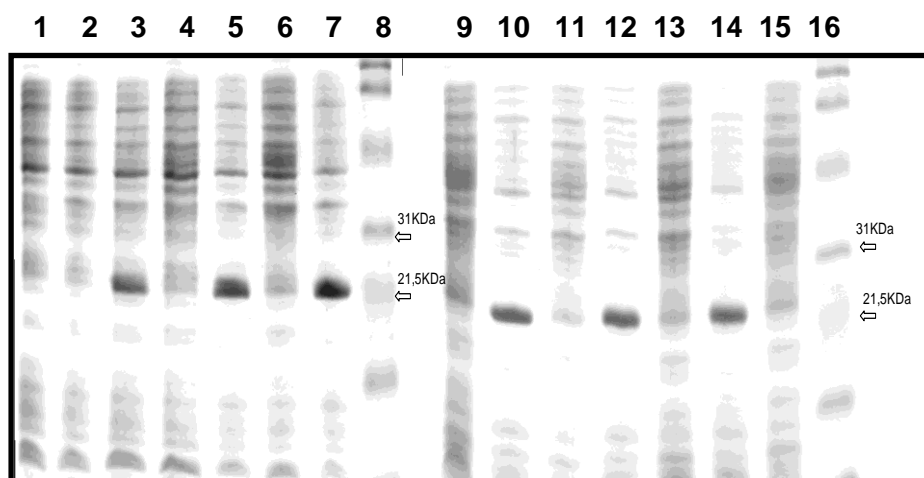


Figura 4. SDS-PAGE de las muestras colectadas de los cultivos a diferentes tiempos. A, cultivo inducido; C, cultivo no inducido. Carril 1, A2h; carril 2, C2h; carril 3, A3h; carril 4, C3h; carril 5, A4h; carril 6, C4h; carril 7, A5h; carril 8, PPM; carril 9, C5h; carril 10, A6h; carril 11; C6h; carril 12, A7h; carril 13, C7h; carril 14, A8h; carril 15, C8h; carril 16, PPM.

Por otro lado, no es posible concluir que a las 8 horas los cultivos hayan llegado a la fase estacionaria. Estos resultados sugieren que el cultivo puede ser extendido hasta las 8 horas o quizás un poco más para lograr una mayor cantidad de biomasa. Sin embargo, antes de tomar esta decisión es necesario estudiar antes como varía la expresión de *vif* durante todo el cultivo, así como la integridad molecular de la proteína Vif producida.

Guy y cols., (1991), que reportaron la expresión del gen *vif* en *E coli* bajo el mismo promotor, indujeron a las 4h. Xiaoyu y cols., (1998), en cambio, lo hicieron con 0.4mM de IPTG cuando el cultivo alcanzó una D.O entre 0.6-0.8. En nuestro trabajo empleamos la inducción a las 2 horas, cuando el cultivo alcanza una D.O. de 0.5, ya que este aspecto había sido estudiado en experimentos previos (Duarte C, resultados no publicados). En ninguno de los casos anteriores se describió la cinética de crecimiento y expresión del gen *vif*, por lo cual las consideraciones de cuando parar el cultivo fueron asumidas de acuerdo a criterios generalizados para el sistema de expresión usado.

Para estudiar la producción de la proteína recombinante las muestras colectadas a lo largo del cultivo se analizaron por SDS-PAGE (Fig. 2) y a las bandas obtenidas en la electroforesis se les hizo un análisis densitométrico para estimar el % de expresión de *vif* antes y después de la inducción (Tabla. 1).

Tabla1. Expresión del gen *vif* durante la cinética de crecimiento, determinado por densitometría.

Tiempo(h)	A	C
2	0%	0%
3	21,6%	1,5%
4	36,6%	2%
5	40%	2,8%
6	40,4%	4,2%
7	44,9%	3,3%
8	40,4	2,8%

En la electroforesis se detectó una banda que apareció precisamente 1 hora después de la inducción y que presentó una movilidad electroforética congruente con la esperada para Vif (23kD). El % de esta banda aumentó de 0 a 21,6% desde la segunda hora (comienza la inducción) hasta 3ra hora de crecimiento. El % de expresión continuó en aumento hasta la 7ma hora de crecimiento para después estabilizarse. El cultivo C empleado como control negativo de la inducción mostró un % basal de expresión de *vif*. En ningún caso el % de expresión obtenido sobrepasó el 4.5%.

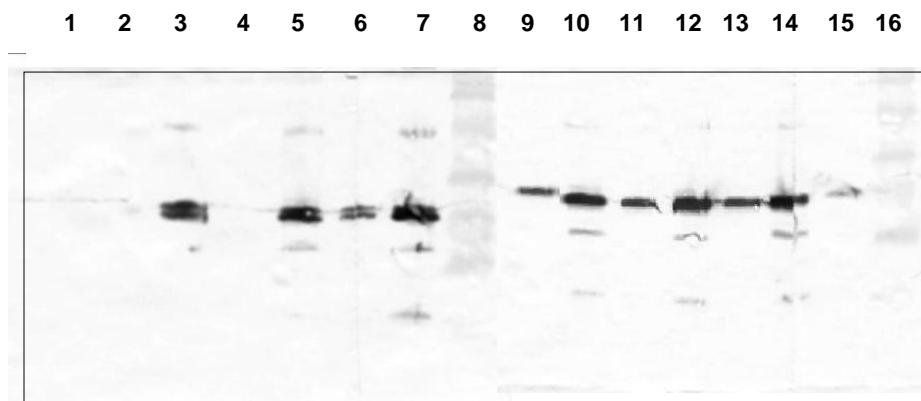


Figura. 5. Western-blot (WT) a las muestras colectadas, durante la cinética de producción de Vif. A, cultivo inducido; C, cultivo no inducido. Carril 1, A2h; carril 2, C2h; carril 3, A3h; carril 4, C3h; carril 5, A4h; carril 6, C4h; carril 7, A5h; carril 8, PPM; carril 9, C5h; carril10, A6h; carril 11,C6h; carril 12, A7h; carril 13, C7h; carril14, A8h; carril15, C8h.

En las condiciones de crecimiento e inducción estudiadas, el mayor por ciento de expresión estimado fue del 44.9% a las 7 horas. A la 8h se registró una disminución del 4,5%, lo cual puede ser resultado de un aumento en la actividad degradativa por las proteasas bacterianas, pero también pudiera tratarse de fluctuaciones propias de la variabilidad del método empleado.

Para confirmar la naturaleza de la banda expresada, las muestras se aplicaron en una electroforesis y a partir de aquí se estudiaron por Western blot con el AcM 3E12.

Con este resultado se demostró la identidad antigénica con Vif de la banda principal a la altura de 23kD. A partir de estas señales en la inmunotransferencia no fue posible identificar una tendencia clara al aumento en el tiempo de la cantidad de Vif producida, como se evidenció en SDS-PAGE. Esto se explica por la saturación de la membrana de nitrocelulosa debido a las cantidades de Vif aplicadas y la elevada sensibilidad de la técnica. A partir de la 5ta hora de crecimiento se detectó una segunda banda de degradación. Esto puede deberse o bien al aumento en la cantidad total de Vif producida, o a un aumento en la actividad proteolítica de las proteasas bacterianas, a una combinación de ambos factores.

Retomando la discusión anterior sobre la conveniencia de cosechar la biomasa a las 8 horas de cultivo podemos concluir que a esa hora no se aprecia una mayor degradación de Vif en comparación con las tres horas precedentes. Teniendo en cuenta que hay un ligero aumento de la biomasa, y que el por ciento de expresión de Vif muestra valores muy parecidos en las tres últimas horas, pensamos que es conveniente esperar a las ocho horas para la cosecha, aunque en realidad la pérdida no sería muy alta si se detuviera el cultivo una o dos horas antes.

Purificación de Vif mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos.

A partir de 3.8 gramos de biomasa colectados a las 8 horas de cultivo se procedió a la ruptura por ultrasonido, y la proteína Vif se extrajo del precipitado de ruptura con tampón MES pH7.0, 4M de GuHCl. Se demostró por un ensayo de Western blot que en el precipitado de la extracción no quedó proteína Vif detectable (resultados no mostrados). La molaridad de GuHCl, a la cual se hizo la extracción de la proteína se determinó previamente a partir de ensayos a distintas molaridades de GuHCl (Duarte C, resultados no publicados). Algunos autores reportan la extracción con molaridades por encima de 10 M de urea (Ulrike y cols., 1991).

La extracción en las condiciones especificadas constituyó la muestra inicial aplicada a la columna de 1ml de Ni²⁺NTA–Sefarosa. La racionalidad del empleo de esta cromatografía se apoya en que nuestra proteína presenta una cola de 6 histidinas que le deben conferir la propiedad de unirse fuertemente a iones metálicos como el Ni²⁺. El volumen a pasar por la columna fue ajustado con otros ensayos y se

estableció que entre 10 y 15 ml son suficientes para saturar la columna sin una pérdida considerable de la proteína.

Debido a la migración en el sobrenadante de ruptura de una banda a la misma altura de Vif, se analizó esta muestra por Western blot. Se demostró que dicha banda no fue reconocida por anticuerpos específicos para Vif, lo cual indica que se trata de una proteína bacteriana que migra a la misma altura que Vif (datos no mostrados).

Después de efectuada la corrida cromatográfica se determinó la cantidad de proteínas totales en cada fracción recogida. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Fracciones obtenidas de la cromatografía de iones metálicos

Muestra	Proteínas (mg/mL)	Vol (mL)	Total proteínas (mg)
Fracción Soluble	2.7	12	32.40
Inicial 4M	1.0	12	12.
Fracción no adsorbida	0.43	12	5.14
Eluato pH5.5	0.43	5	2.15
Eluato pH5.0	0.86	5	4.32

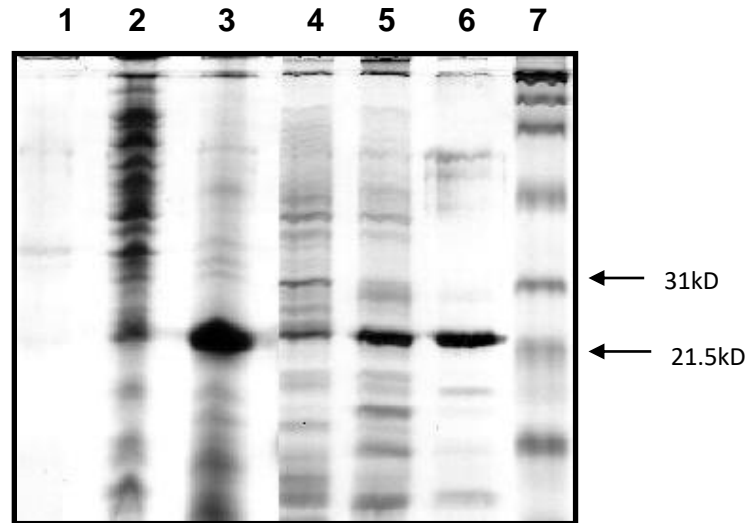


Figura 6. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones involucradas en la cromatografía de afinidad en Ni^{2+} NTA-Sefarosa. Gel de 15% de poliacrilamida. Carril 1, biomasa no extraída; sobrenadante de ruptura, carril 2, extracción inicial; carril 3, fracción no adsorbida, carril 4, eluato pH5.5; carril 6, eluato pH5.0; carril 7, PPM (patrón de peso molecular).

La estimación de la pureza de las fracciones cromatográficas se realizó por SDS-PAGE (Fig. 6).

El eluato de pH5.0 mostró una banda principal (75% del total de proteínas) que migra a la altura esperada para Vif. Las dos bandas que se observan entre 45 y 65kD son bandas fantasmas que han sido asociadas a efectos del B mercaptoetanol presente en el tampón de preparación de las muestras (Tasheva y Dessev 1983; Chiari y cols., 1990; Kumar y cols., 1993). Las bandas de bajo peso deben ser en su mayoría degradaciones de la misma Vif, como se comprueba más adelante en este trabajo.

El eluato recolectado a pH 5.5 mostró la presencia de proteínas contaminantes que tienen determinada afinidad por los metales aunque menos que Vif. Se apreció que con este lavado también eluyó una parte de Vif que estaba fijada menos fuertemente a la matriz (23.5 % del total de proteínas de esa fracción y 0.5 mg totales). Sin embargo, si no fuese por ese lavado, la muestra colectada a pH 5.0 presentaría un mayor número de impurezas por lo que consideramos que cumple satisfactoriamente su objetivo.

La observación de una banda con el peso molecular de Vif en la fracción no adsorbida (10.8% del total) indica que la columna se saturó, y el exceso de proteína eluyó en esta fracción. Esto afectó el recobrado de la purificación, sin embargo, en la escala de laboratorio en que estamos trabajando este

parámetro no es tan importante como la pureza final del material. Además, la pérdida por este concepto se estimó en 0.55mg que corresponde con un 10% de la proteína Vif monomérica aplicada a la matriz. Si en el futuro se pretendiera optimizar este parámetro será necesario aumentar la relación matriz/muestra aplicada.

El procedimiento de purificación empleado en este trabajo tiene algunas diferencias en relación con el informado por Yang y cols., (1996). La proteína Vif obtenida por estos autores también porta un péptido adicional de secuencia MRGSHHHHHGS. La nuestra, aunque también presenta la cola de histidinas, no comparte los otros aminoácidos extra.

En nuestro método de purificación se eluye Vif con el tampón de pH5.0 y no 5.5 como lo indican estos autores. Además, al tampón de ruptura se le adiciona EDTA para disminuir la actividad de las proteasas celulares y evitar la degradación de la proteína en cuestión y, a la par, minimizar la formación de los agregados de Vif, proceso que se encuentra muy favorecido en presencia de metales (Indrani y cols., 2006).

Estudio de las condiciones de renaturalización de Vif.

Hasta este momento se trabajó la purificación de Vif en presencia de 4M GuHCl para garantizar la solubilidad de esta proteína. Se conoce que Vif tiende a formar multímeros con mucha facilidad, ya sea por formación de puentes disulfuro intercatenarios, como por la presencia de dominios que promueven la interacción entre monómeros (Yang y cols., 2001; Paul y cols., 2006). Debido a estas propiedades se reporta en Vif una tendencia muy fuerte a la precipitación por lo que su solubilización y renaturalización resultan uno de los pasos más difíciles del proceso de obtención.

Se ha reportado la diálisis secuencial y paulatina reducción de las molaridades de GuHCl como un procedimiento adecuado para la renaturalización de VIF (Yang y cols., 1995; Paul y cols., 2006). Para estudiar en este contexto como influye la naturaleza del tampón empleado, su pH y la presencia de EDTA como agente quelante diseñamos los experimentos que exponemos a continuación:

En el primer estudio se compararon los tampones MES y PBS, con y sin 1 mM de EDTA y con concentraciones decrecientes de GuHCl: 2M, 1M, 0.5M, 0.25M y 0 M. Se procedió a dializar 200µg de Vif correspondientes al eluato de pH 5.0 de la columna de Ni NTA contra cada una de esta serie de tampones, de manera tal que la concentración de GuHCl va disminuyendo de forma gradual.

La figura 7 muestra los resultados de la SDS-PAGE correspondiente a la proteína renaturalizada en las cuatro condiciones descritas. La doble banda observada en todos los carriles, incluido el correspondiente al tampón de muestra, corresponde con las bandas fantasmas mencionadas anteriormente.

Los mejores resultados en este experimento se obtuvieron para el tampón MES + EDTA, pH6.2, pues de los 200µg iniciales se recuperaron 191.1 µg, lo cual representa el 95.5% del total. En segundo lugar ese mismo tampón sin EDTA recuperó 109 µg de proteína en forma soluble, para un 54.5%. En cambio, las muestras dializadas contra las dos variantes basadas en PBS precipitaron por completo. Este experimento se repitió tres veces con resultados similares.

Con este experimento se demostró que el EDTA es realmente un factor positivo para evitar la

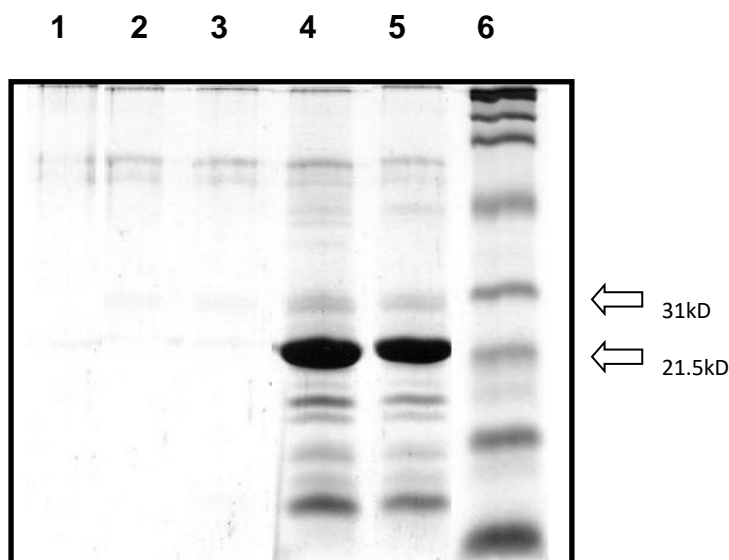


Figura 7. SDS PAGE con las muestras renaturalizadas y precipitadas. Carri 1, tampón de muestra; carril 2, proteína renaturalizada en PBS-EDTA; carril 3, muestra renaturalizada en PBS+EDTA; carril 4 muestra renaturalizada en MES+1mM EDTA; carril 5, muestra renaturalizada en MES-1mM EDTA; carril, 6 PPM.

precipitación de Vif durante el proceso de renaturalización. Se ha descrito que los iones metálicos como Zn^{2+} favorecen la formación de oligómeros de Vif, posiblemente a través de su interacción con el dominio de unión a metales HCCH (Paul y cols., 2006; Mehle y cols., 2006; Xiao y cols., 2006). La racionalidad de añadir EDTA en el tampón de diálisis fue precisamente quelar los iones metálicos presentes en la muestra, que deben ser abundantes luego de una cromatografía de Ni^{2+} NTA.

Por otra parte, el uso del tampón MES en la renaturalización de Vif había sido ya descrito por Paul y cols., (2006). Sin embargo, la influencia del pH en este proceso no había sido estudiada. Con vistas a evaluar este aspecto se invirtieron los valores de pH del experimento anterior y se siguió el mismo proceso de renaturalización.

En contraste con el primer experimento, no se logró recuperar proteína soluble en MES a pH 7.2 ni siquiera en presencia de EDTA. En cambio, la cantidad de proteína solubilizada en el tampón PBS a pH 6.2 fue de 14.98 µg (7.4%) y 124.92 µg (62%) para las variantes sin y con EDTA respectivamente.

De este experimento se deriva que el valor de pH es un parámetro clave para lograr la eficiente renaturalización de Vif. Sin embargo, los valores obtenidos con PBS no llegaron a los mismos niveles logrados con el MES al mismo valor de pH. Para corroborar esta observación se desarrolló un tercer experimento en el cual se comparación estas dos condiciones (MES, pH 6.2 + EDTA y PBS pH 6.2 + EDTA), y se estudió además la estabilidad de la proteína en ambos tampones durante las 72 horas posteriores a la renaturalización a dos temperaturas diferentes.

Los resultados de este experimento se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Renaturalización de Vif. Comparación de PBS y MES pH 6.2 y estabilidad durante 72h a dos temperaturas.

	Condiciones almacenamiento	Proteína soluble (µg)		
		0h	24h	72h
PBS+EDTA, pH 6,2	4 C°	226.25 (113%)	194,24 (97%)	188.36 (94%)
	-20 C°		172.37 (86%)	12.60 (6%)
MES +EDTA, pH 6,2	4C°	218.77 (109%)	217,09 (108%)	192.16 (96%)
	-20 C°		186,95 (93%)	210.21 (105%)

De estos resultados se puede apreciar que, inmediatamente después de concluido el proceso de diálisis, ambos tampones muestran similares resultados en términos de recuperación de proteína soluble. Este resultado se repitió a las 24h, tanto en las muestras congeladas como en las que se conservaron a 4°C. Sin embargo, 72 h después, la proteína conservada en PBS a -20°C experimentó

una precipitación casi total, en contraste con la conservada a 4°C que se mantuvo soluble. Este resultado inesperado obtenido a las 72h se reprodujo en otro experimento independiente (resultados no mostrados).

De este conjunto de hallazgos podemos concluir que, si el valor de pH es esencial para garantizar la eficiente renaturalización de Vif, el tampón MES le confiere una mayor estabilidad a la proteína soluble, al menos en estado de congelación a -20°C. Es posible que este efecto se deba a que con este tampón la proteína adquiere un plegamiento adecuado que evite interacciones de tipo hidrofóbicas o de otro tipo que favorecen la formación de agregados y la consiguiente precipitación de estos.

En correspondencia con el resultado de estos experimentos el tampón elegido para la renaturalización de la proteína Vif purificada por cromatografía de Ni-NTA fue el MES 50mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, pH 6.2, 0.05% NaN₃.

Evidencias de multimerización de la proteína Vif purificada.

La formación de multímeros de Vif se evidenció por la migración de distintas bandas de una muestra purificada sometida a condiciones no reductoras y reductoras (Fig. 8). En ambos tratamientos se observó una banda predominante que migró a la altura correspondiente al monómero, pero el porcentaje de esta banda varió. En la muestra reducida se estimó en un 90%, mientras que en las condiciones no reductoras disminuyó hasta un 60-70%. La

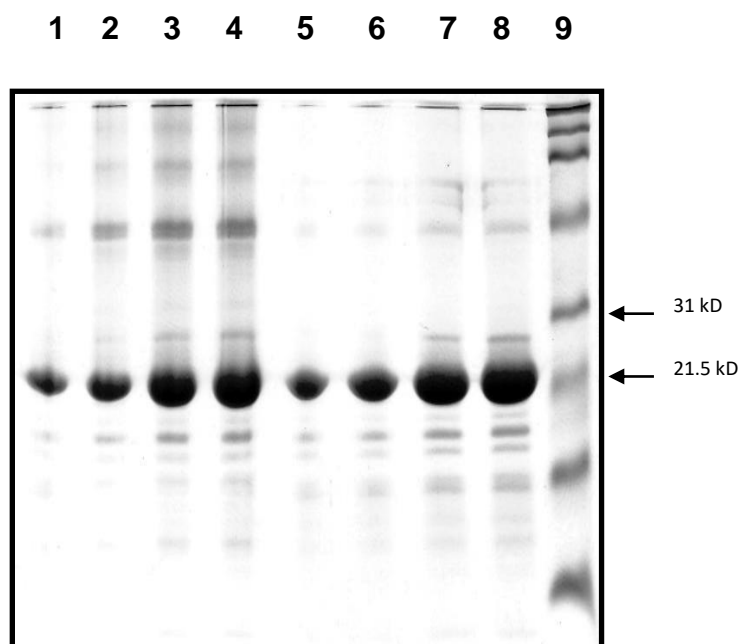


Figura 8. SDS-PAGE de la preparación final de Vif purificada y renaturalizada. Carriles 1-4, Vif 2, 4, 8 y 10 µg respectivamente condiciones no reductoras; carriles 5-8, Vif 2, 4, 8 y 10 µg respectivamente condiciones reductoras; carril 9, PPM.

presencia abundantes multímeros de Vif en condiciones no reductoras había sido reportado con anterioridad (Shichen y cols., 2004). Para comprobar que estas bandas se correspondían con multímeros de Vif, se hizo un Western blot con el AcM 3E12 con cantidades crecientes de Vif (Fig. 9). Se evidenció que todas las especies moleculares de alto peso son, en efecto, reconocidas por este anticuerpo, así como también las principales bandas de menor talla que pueden ser interpretadas como productos de la degradación proteolítica de Vif.

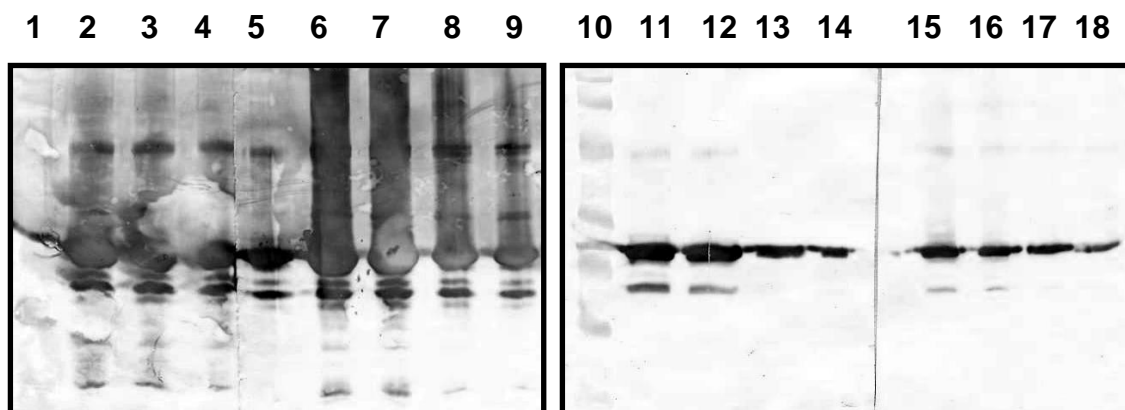


Figura 9. Reconocimiento de multímeros y productos de degradación de Vif con el AcM 3E12. Carriles 1 y 10, PPM: Carriles 2-5, 10, 8, 4 y 2 μg de Vif reducida respectivamente; carriles 6-9, las mismas cantidades de Vif en tampón no reductor. Carriles 11-14; 1, 0.8, 0.4 y 0.2 μg de Vif reducida respectivamente; carriles 15-18, las mismas cantidades de Vif no reducida.

Por lo tanto, es posible concluir que la preparación final de Vif obtenida tiene más de un 90% de pureza en relación con proteínas contaminantes de origen bacteriano.

Caracterización del AcM 3E12

En este segundo bloque de experimentos recogeremos los resultados relativos a la caracterización del AcM 3E12, recientemente generado en nuestro laboratorio contra la proteína Vif-CIGB (Duarte CA, resultados no publicados).

Purificación del AcM 3E12 a partir de fluido ascítico.

Para acometer los experimentos de caracterización era necesario contar con preparaciones puras del AcM 3E12. Para esto partimos de 14 mL de fluido ascítico obtenido en el bioterio del CIGB a través de la inoculación intraperitoneal de 1×10^6 células del hibridoma secretor del AcM 3E12. El material se clarificó previamente por centrifugación y filtración y se diluyó dos veces en el tampón de equilibrio Glicina 1.5M, NaCl 3M, pH 8.9. Este tampón se seleccionó ya que en el momento de la purificación desconocíamos la subclase del 3E12 y está reportado que los anticuerpos IgG1 mejoran de forma radical su afinidad por la proteína A en este tampón de alta fuerza iónica. Al eluir con el gradiente discontinuo de pH se observó

un pico considerable con el tampón de pH 6.0 (datos no mostrados). En el resto de los pH los picos de elución fueron muy reducidos. Todas las fracciones se colectaron y se analizó la presencia de anticuerpos activos mediante un ELISA indirecto con placas tapizadas con Vif.

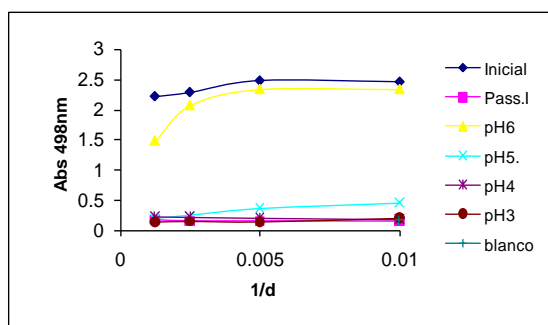


Figura 10. ELISA indirecto para la determinación de actividad de unión a Vif en fracciones derivadas de la purificación del AcM 3E12. Las placas se recubrieron con $5\mu\text{g/mL}$ de Vif-CIGB. Se añadieron 4 diluciones seriadas dobles de cada una de las fracciones cromatográficas a partir de 1:100. El ELISA se reveló con anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa.

En este ensayo se observó que la actividad de unión a

Vif fue completamente adsorbida en la columna y luego eluida con el tampón de pH 6.0 (Fig. 10). La fracción activa se dializó frente a PBS y luego se concentró hasta un volumen de 28 mL. La cantidad total de proteína obtenida después de la concentración fue de 33 mg, lo cual presupone un

rendimiento de 2.3 mg de AcM por mL de ascitis inicial.

Finalmente, el grado de pureza del anticuerpo purificado se evaluó mediante una SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (Fig. 11).

En los carriles 5 al 8 correspondiente al anticuerpo reducido se observa, además de las bandas correspondientes a las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, un banda que migra entre las proteínas de 66.2 y 116.2 kD del patrón de peso molecular. Esta señal puede corresponder a una proteína contaminante, pero el hecho de que no aparezca una banda equivalente en la muestra

no reducida sugiere que pudiera ser un artefacto. En cualquier caso, el análisis densitométrico de las muestras correspondientes a los carriles 7 y 8 arrojaron una pureza del 98.2% para el AcM, lo cual es más que suficiente para aplicaciones inmunoquímicas y de diagnóstico para este tipo de moléculas.

Determinación de la subclase del AcM 3E12

Para determinar la subclase del 3E12 se instrumentó un ELISA indirecto en el cual la unión del anticuerpo a Vif adsorbido a la placa de ELISA era detectada por los antisueros clasificadores conjugados a peroxidasa (Fig. 12).

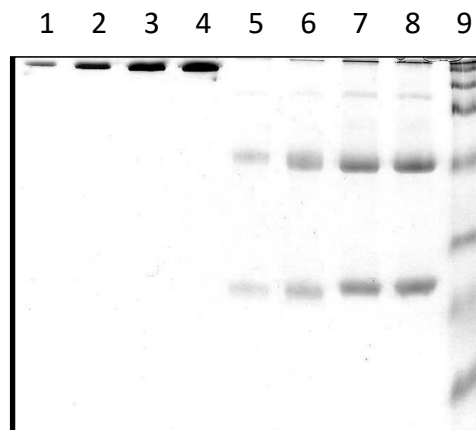


Figura 11. Electroforesis en condiciones no reductoras y reductoras, del AcM 3E12 purificado por proteína A Sefarosa. Carril 1, 2.1µg; carril 2, 4.2µg; carril 3, 8.4µg; carril 4, 10.5 µg; carriles del 5-8, se repiten las muestras en el mismo orden pero en condiciones reductoras; carril 10, PPM.

En un primer experimento se observó un elevado reconocimiento del 3E12 con el conjugado anti IgG2a, una reactividad marginal con el anti IgG1 y ninguna con el anti IgG2b. Como control positivo se empleó el conjugado anti IgG total de ratón. Como confirmación de estos resultados repetimos el mismo experimento incluyendo como control el AcM TG002 (IgG1) y disminuyendo la concentración de

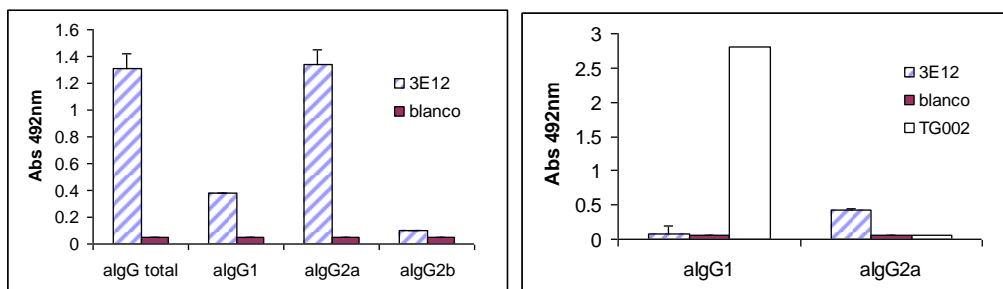


Figura 12. ELISA para la determinación de la subclase del AcM 3E12. Las placas se recubrieron con 1µg/mL de Vif-CIGB. A) Se añadió el 3E12 a 0.1µg/mL seguido de los diferentes antisueros clasificadores. B) Se repitió el ensayo con el 3E12 a 0.05µg/mL y se incluyó el AcM TG002 como control.

3E12 de 0.1 a 0.05µg/mL. En estas condiciones solo se observó reconocimiento del 3E12 por el anti IgG2a, aunque la señal disminuyó considerablemente con relación al experimento anterior. El TG002 fue correctamente tipado como anti IgG1. Lo anterior sugiere fuertemente que el 3E12 es una IgG2a, aunque la reactividad observada con el suero anti IgG1 es algo inusual. Sería recomendable verificar estos resultados con otros reactivos clasificadores o al menos verificar, con un set de AcMs de subclase conocida, si el suero anti IgG1 muestra una reacción cruzada con IgG2a.

Volviendo atrás al experimento de purificación también resulta inusual que este anticuerpo eluyera a pH 6.0 de la matriz de proteína A Sefarosa cuando está descrito que las IgG2a eluyen en el rango de pH entre 4.5 y 5.5. Hay dos elementos que pueden explicar este comportamiento: el primero es que cualquier inexactitud en el pH de las soluciones de elución puede provocar este efecto debido a la vecindad de los pHs de elución de ambas subclases. El segundo es que la matriz había sido usada de forma extensiva lo cual pudiera contribuir a la disminución de la afinidad de la proteína A por la Fc de las inmunoglobulinas.

Especificidad del 3E12

Es de suma importancia verificar correctamente la especificidad de un AcM. En el siguiente experimento demostramos que el 3E12 es específico para Vif, su unión a la fase sólida es inhibida al incubarse con el antígeno en solución y no reconoce la proteína no relacionada BSA ni las proteínas de leche empleadas en el bloqueo (Fig. 13).

En otro experimento nos propusimos descartar la posibilidad de que el 3E12 estuviera reconociendo la cola de histidinas presente en el extremo carboxilo de Vif-CIGB y que no forma parte de la Vif nativa. Para esto evaluamos su unión en ELISA con la proteína DII, que solo comparte con Vif la cola de 6 histidinas. En este experimento se evidenció que el 3E12 no fue reactivo contra DII mientras que el AcM control anti cola de

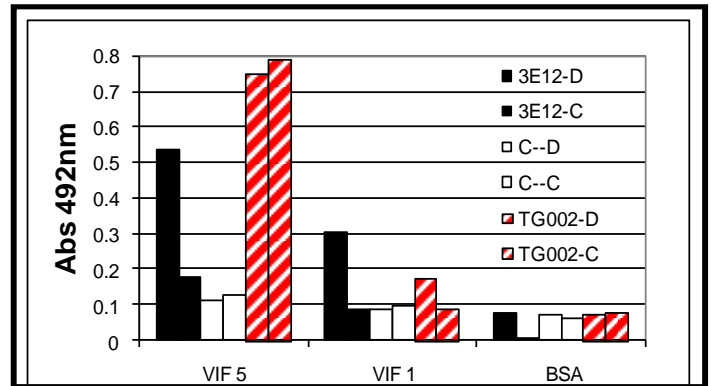


Figura 13. ELISA indirecto, recubrimiento con Vif a 5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o BSA a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Bloqueo leche 1%, 3E12D, dilución 1:100 del sobrenadante de cultivo del AcM 3E12; 3E12-C, la misma muestra co-incubada con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Vif en solución; C-D, AcM 332 control negativo; C-C, AcM 332 incubado con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Vif en solución; TG002-D, AcM TG002 a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; TG002-C, la misma muestra co-incubada con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Vif en solución.

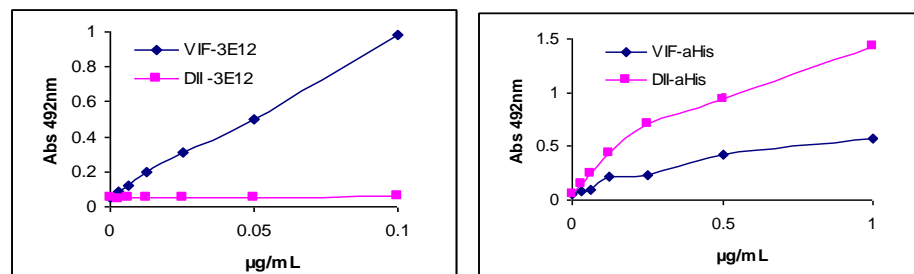


Figura 14. ELISA indirecto contra A) Vif-CIGB y B) Dominio II de la proteína de envoltura del virus Dengue (DII). Curva de AcM 3E12, diluciones seriadas dobles a partir de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, rombos azules; Curva de AcM anti cola de His (Serotec), diluciones seriadas dobles a partir de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

histidina reconoció ambas proteínas. Esos resultados demuestran que el 3E12 no reconoce la cola de histidinas.

Comparación del reconocimiento de las proteínas Vif-CIGB y Vif-NIBSC en fase sólida

A continuación nos propusimos investigar si el epitopo reconocido por el 3E12 estaba presente en una proteína Vif suministrada por el repositorio internacional de reactivos de VIH/SIDA del NIBSC, Reino Unido. En el mismo experimento evaluamos el reconocimiento de ambas variantes de Vif por dos

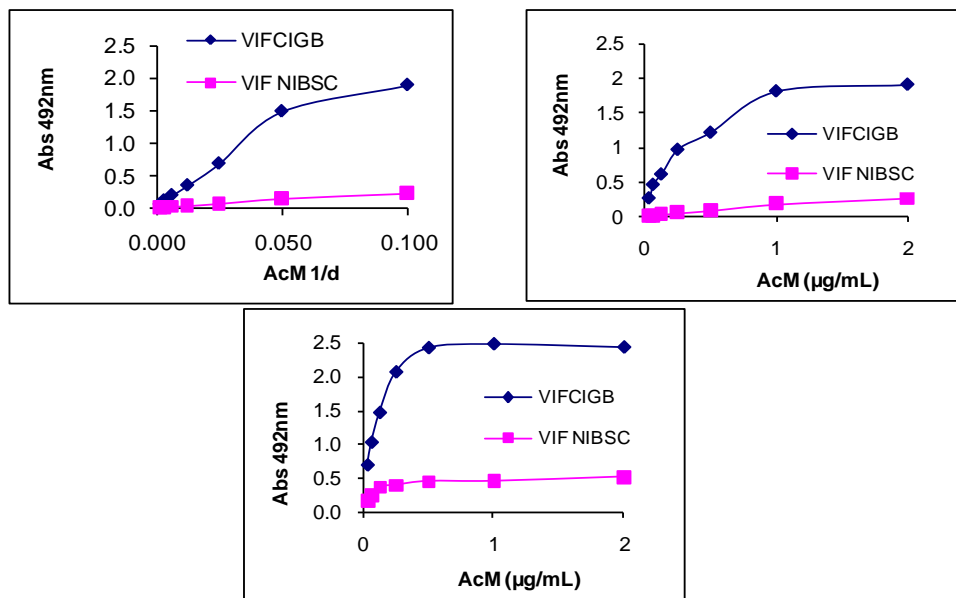


Figura 15. ELISA indirecto con las proteínas Vif-CIGB (rombos azules) y Vif-NIBSC (cuadrados rosados) ($1\mu\text{g}/\text{mL}$) adsorbidas en placas de poliestireno (Costar High binding). Se añadieron diluciones seriadas dobles de cada anticuerpo a partir de 1:10 para el TG001y $2\mu\text{g}/\text{mL}$ para el TG002 y 3E12. Se reveló la reacción con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa.

anticuerpos de referencia: TG001 y TG002.

Como se observa en la figura 15, los tres AcMs reconocieron a ambas variantes de Vif adsorbidas en fase sólida. Esto indica que los respectivos epitopos están expuestos en las dos proteínas en estas condiciones. Es evidente que los tres AcMs reconocen mejor la Vif-CIGB que la Vif NIBSC puesto que se alcanzan valores de $\text{DO}_{492\text{nm}}$ mucho más altos para concentraciones equivalentes de ambas proteínas. Un análisis previo en nuestro laboratorio reveló que la Vif NIBSC ha sufrido una marcada degradación proteolítica (Duarte, C comunicación personal) lo cual puede explicar este resultado aparentemente contradictorio.

En cuanto a la comparación entre los diferentes anticuerpos solo es posible hacerlo entre el TG002 y el 3E12 ya que se trabajaron a concentraciones equivalentes. En este caso los valores de DO_{492nm} obtenidos para el 3E12 fueron siempre superiores para ambas proteínas. En la región lineal de la curva relativa a Vif-CIGB estas diferencias pueden ser de hasta más de dos veces. Estos resultados indican que, siendo ambos anticuerpos bivalentes de clase IgG, el 3E12 debe tener una mayor constante de afinidad por Vif.

En el caso de TG001, puesto que se trabajó con sobrenadante de cultivo y no con el AcM purificado, no fue posible cuantificar su señal de reconocimiento en función de su concentración. Esto no permite una comparación rigurosa con los otros dos, pues ni siquiera se alcanza la región de saturación de la curva.

Cálculo de la K_d en tiempo real de la interacción entre el anticuerpo 3E12 y Vif.

La constante de afinidad a tiempo real K_d de la interacción entre el 3E12 y Vif se calculó con la ayuda del equipo Biacore X. A partir de las curvas obtenidas para las diferentes molaridades de 3E12 (Fig. 16) se calcularon los valores de K_d empleando un software asociado al equipo. El valor obtenido fue $2.24M \cdot 10^{-9}$ con un ajuste de Chi cuadrado de 0.386.

Para ninguno de los dos AcM de referencia empleados en este estudio se ha reportado la K_d . Tampoco hemos encontrado tales reportes en la literatura para otros AcM contra Vif, por lo cual no se puede comparar el valor obtenido para el 3E12 con otros AcM dirigidos contra el mismo antígeno.

Adicionalmente este valor de K_d encontrado pudiera variar al emplear un sistema diferente de

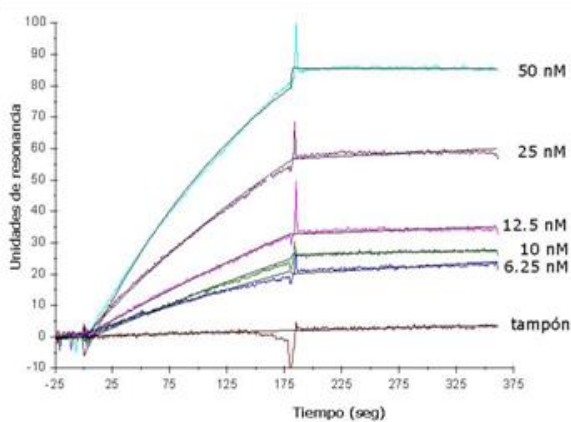


Figura 16. Curvas de interacción del 3E12 con Vif en tiempo real determinadas por el equipo Biacore X. Chips de Ni NTA se cargaron con Vif a 30.1 nM. 3E12 de 6.25 a 50nM. La línea negra superpuesta en cada curva es la línea de mejor ajuste que calcula el programa

interacción con Vif. Pero en última instancia, una K_d en el orden nanomolar implica una considerable afinidad por el antígeno.

Reconocimiento de Vif en solución por los AcMs 3E12 y TG002.

Con el objetivo de comparar la capacidad de los AcMs 3E12 y TG002 para reconocer a la proteína Vif en solución se evaluó la combinación de estos anticuerpos con un policlonal anti Vif en conejo, en un ELISA de captura de antígeno. Como se observa en la figura 17 el 3E12 fue eficiente en la captura de Vif lo cual indica que su epitopo se encuentra bien expuesto en estas condiciones. La capacidad de reconocer el antígeno en solución es una propiedad muy útil para futuras aplicaciones de este AcM.

Con la combinación 3E12/policlonal se logró detectar hasta una concentración de 15ng/mL.

Teniendo en cuenta que este sistema puede ser optimizado en el futuro este AcM podría ser de utilidad para la cuantificación de Vif en muestras biológicas.

En cambio, el TG002 no fue capaz de detectar a la proteína en estas condiciones lo cual indica que reconoce un epitopo que se expone solo cuando Vif está unida a una fase sólida.

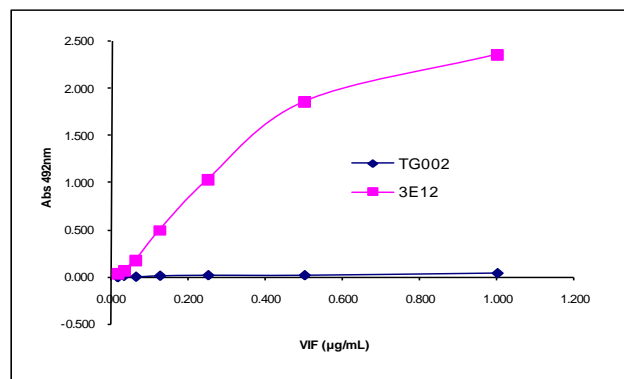


Figura 17. Reconocimiento de Vif en solución por los AcM 3E12 y TG002 en combinación con un policlonal de conejo anti Vif. Recubrimiento 5µg/mL de los AcMs. Curva de Vif a partir de 1 hasta 0.015 µg/mL. Policlonal 1:1000, anti IgG de conejo peroxidase 1:10000.

Ensayos de competencia entre el 3E12 y los anticuerpos TG001 y TG002.

Con el objetivo de precisar mejor cual pudiera ser el epitopo reconocido por el 3E12 se desarrollaron ensayos de competencia con los AcMs TG001 y TG002.

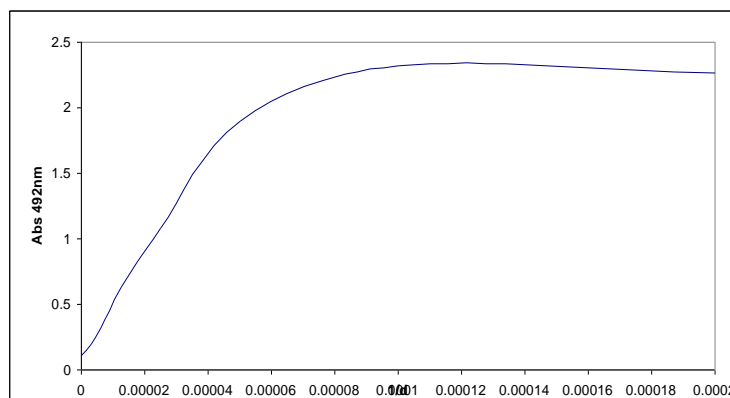


Figura 18. Evaluación de la actividad del 3E12 biotinilado en ELISA. Recubrimiento con VIF 1µg/mL Diluciones seriadas dobles del AcM 3E12 biotinilado empezando por 200 ng/mL. Extravidina peroxidasa 1:1000.

Como paso previo se marcó el 3E12 con biotina siguiendo el protocolo descrito anteriormente. La titulación del anticuerpo biotinilado se muestra en la figura 18. La curva de actividad obtenida en ELISA demuestra que la Biotinilación fue exitosa y que es posible trabajar con este reactivo en un rango entre 100 y 30 ng/mL

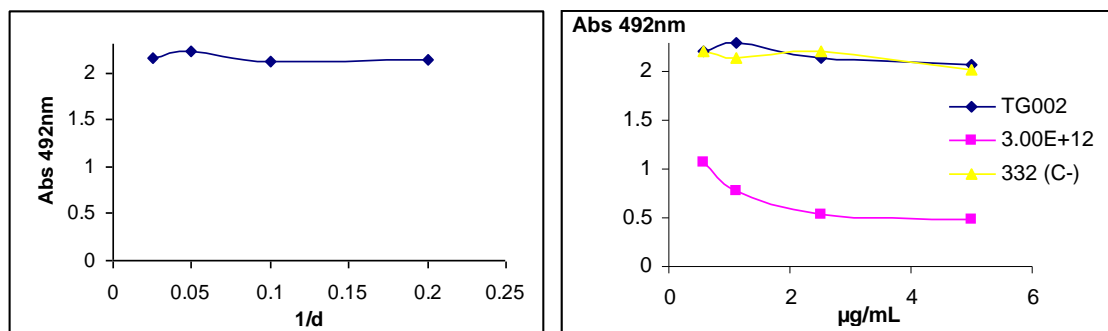


Figura 19. ELISA de competencia Recubrimiento VIF 1µg/mL. Anticuerpos “fríos” 1 h a 37°C; 3E12 biotinilado 15 min a 37°C. A) AcM TG001 diluciones seriadas dobles a partir de 1:10: B) AcM TG002, AcM 332 (CN) y AcM 3E12, diluciones seriadas dobles a partir de 5µg/mL.

Con el 3E12 biotinilado se diseñó un experimento de bloqueo en el cual en un primer paso se incubaron los anticuerpos no marcados en placas de ELISA recubiertas con Vif y, en un segundo paso, se añadió el reactivo marcado.

En este experimento se hizo evidente que ninguno de los AcM de referencia disminuyó la unión del 3E12 biotinilado a Vif. Por el contrario, el propio 3E12 no marcado logró una reducción de más del 50% de la señal en este ensayo.

Este experimento indica que el epítipo reconocido por el 3E12 no es el mismo de los otros dos anticuerpos: aminoácidos del 34 al 47 para el TG002, y del 176 a 192 para el TG001.

Se necesitan otros experimentos para lograr mapear con certeza el epítipo del 3E12 en Vif. Sabemos que es un epítipo secuencial porque reconoce la proteína en Western blot e inclusive reacciona contra bandas de bajo peso molecular producto de la degradación proteolítica.

El hecho de que este anticuerpo sea reactivo contra multimeros sugiere que no está dirigido contra los dominios que promueven la agregación entre monómeros, a saber, el dominio HCCH y la región 151-164 (Reingewertz y cols., 2009).

El procedimiento más eficaz para el mapeo de un epítipo secuencial es el estudio de la interacción

frente a una batería de péptidos sobrelapados que cubran toda la secuencia de Vif. Este estudio se dificulta por el costo asociado a la síntesis de estos péptidos. Una alternativa mas económica es la secuenciación por EM de las bandas de degradación de bajo peso molecular reconocidas por el 3E12.

Conclusiones.

1. Los % de producción de Vif se mantuvieron elevados (alrededor del 40% de la proteína total) entre las 6 y 8 horas de cultivo, mientras la biomasa continuó aumentando en ese período y no se evidenció un aumento significativo de la degradación, por lo que es factible continuar usando ese tiempo total de cultivo en futuros experimentos.
2. El pH, y la presencia de EDTA tienen una influencia importante en la eficiencia de la renaturalización de Vif, mientras que el tampón MES le confiere una mayor estabilidad a la proteína renaturalizada cuando esta se almacena a -20°C .
3. Se logró purificar la proteína Vif con más de un 90% de pureza en relación a proteínas contaminantes de bacteria, lo cual permite su empleo en diferentes aplicaciones inmunoquímicas.
4. Se obtuvo una preparación del AcM 3E12 con un 98% de pureza, útil para aplicaciones inmunoquímicas.
5. El AcM 3E12 es específico para Vif, y es capaz de reconocer a esta proteína tanto en fase sólida como en solución.
6. Se estimó una constante de afinidad de $2.24 \times 10^{-9} \text{ M}$ para la interacción entre el 3E12 y Vif unida a un chip de Ni NTA.
7. El AcM 3E12 reconoce un epítipo de naturaleza secuencial que no coincide con los reportados para los AcM TG001 (aa 176-192) y TG002 (aa 34-47).

Recomendaciones

1. Estudiar el curso temporal del cultivo de la cepa de expresión de vif después de las 8 horas.
2. Continuar la caracterización del epitopo reconocido por el 3E12, ya sea por estudios con péptidos sintéticos o a través de la caracterización de las bandas de degradación de Vif.
3. Calcular la constante de afinidad del 3E12 por Vif en solución empleando un chip que capture el AcM por la región Fc.
4. Verificar los resultados de la subclase obtenidos con otro set de reactivos clasificadores.
5. Secuenciar los genes que codifican para las regiones variables del 3E12 con vistas a obtener fragmentos de anticuerpos recombinantes y evaluar su capacidad inhibitoria de la infección por VIH.

Referencias Bibliográficas.

- ✓ Aires da Silva F, Santa-Marta M, Freitas-Vieira A, Mascarenhas P, Barahona I, Moniz-Pereira J, Gabuzda D y Goncalves J. *J Mol Biol* (2004); 340: 525–54.
- ✓ Balaji S, Kalpana R y Shapshak P. *Bioinformation* (2006); 1(8): 290-309.
- ✓ Bernacchi S, Henriët S, Dumas P, Paillart JC y Marquet R. *J Biol Chem* (2007); 10.1074: 1-20.
- ✓ Bruno G, Michel G, Karin D, Danièle S, Marie-Paule K y Jean-Pierre. *J Virol* (1991); 65, 3: 1325-31.
- ✓ Chiari ME, Rudolf R, y Jaenicke R. *Biochemistry* (1983),129: 98-102.
- ✓ Conticello G, Harris S y Neurberger S. *Current biology*.(2003);13:2009-13.
- ✓ Goncalves J, Jallepalli P y Gabuzda D. *J Virol* (1994); 68.2:704-12.
- ✓ Goto T, Nakai M y Ikuta K. *Micron* (1998); 29, 2/3: 123-138.
- ✓ Haché G, Shindo K, Albin SJ, y Harris RS. *Current Biology* (2008); 18,11:819-24.
- ✓ Harris RS, Bishop K, Sheehy M, Craig M, Peterson-Mahrt S, Watt N, Neuberger S, Malim H. *Cell* (2003); 113.803-9.
- ✓ Indrani P, Jian Cui, y Ernest L. Maynard *PNAS* (2006); 103; 49:18475-480.
- ✓ Kao S, Khan M A, Miyagui E, Plishka R, Buckler-White A, y Strebel K. *J Virol* (2003); 77, 21, 11398-11407.
- ✓ Karczewski M y Strebel K. *J Virol* (1996); 70.1:494-507.
- ✓ Khalife J, Pierce J, Godin C y Capron D. *Parasitology* (1993); 108.69: 533-543.
- ✓ Kumar S, Gopalkrishna K, Prasad H y Pyit W. *Analytical Biochemistry* (1993), 213: 226-28.
- ✓ Laemmli UK. *Nature* (1970); 227 (5259):680-5.
- ✓ Lever A. The medicine publishing company ltd, *Medicine* (2005); 33:6.
- ✓ Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, y Trono D. *Nature* (2003); 424: 99-103.
- ✓ Mehle A, Wilson H, Zhang Ch, Brazier AJ, McPike M, Pery E, y Gabuzda D. *J Virol* (2007);

81.23: 13235-41.

- ✓ Mehle A, Thomas ER, Rajendran KS, Gabuzda D. JBC (2006); 281, 25: 17259-17265.
- ✓ Nathans R, Cao H, Sharova N, Ali A, Sharky M, Stranska R, Stevenson M y Rana M. Nature (2008); 26, 10:1187-1191.
- ✓ Oberstee MS y Gonda MA. Virus genes (1992); 6: 95-102.
- ✓ ONUSIDA. Situación de la epidemia de SIDA, (2008); <http://unaid.org/es>.
- ✓ Paul I, Cui J y Maynard EL. PNAS (2006); 103, 49: 18475-18480.
- ✓ Reingewertz T, Benyamini H, Lebendiker M, Shalev DE y Friedle S. Protein engineering Design & Selection (2009); PEDS Advance Access: 1-7.
- ✓ Santa Marta M, Aires da Silva F, Fonseca AM, Goncalves J. y Fonseca AM. J Biol Chem (2005); 280, 10:8765-75.
- ✓ Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, y Malim MH. Nature (2002); 418:646-650.
- ✓ Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Tartar A, Portetelle D, Bumy A, y Haseltine W. Science (1986); 231:1549-1553.
- ✓ Stanley BJ, Ehrlich ES, Yu Y, Xiao Z, Yu XF y Xiong YJ. Virol (2008); 82: 8656–8663.
- ✓ Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Proc Natl Acad Sci U S A (1979); 76, 9: 4350-4.
- ✓ Turelli P, Mangeat B, Jost S, Vianin S y Trono D. Science (2004); 303: 1829.
- ✓ Ulrike W, Heike K, Roly K, Joachim EK, Helmut N, y cols., AIDS Res Hum Ret (1991); 7: 861-7.
- ✓ Wichroski M J, Ichima K, y Rana T. J Biol Chem (2005); 280, 9: 8387-96.
- ✓ Yang S, Sun Y, Zhang H. JBC (2001); 276, 7: 4889-4893.
- ✓ Yang X, Goncalves J y Gabuzda D. J Biol Chem (1996); 271, 17, 10121-10129.
- ✓ Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P y Yu XF. Science (2003); 302: 1056-1060.
- ✓ Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, y Gao L. Nature (2003); 24:94-98.
- ✓ Zhang L, Saadatmy J, Li X, Guo F, Niu M, Jiang J, Kleiman L y Cen S. Virology (2007); 04358:1-9.