

TRABAJO FIN DE GRADO

BIOTECNOLOGÍA

**Producción de antígenos del virus Mixoma
empleando nanopartículas de origen viral**

Ana García García

BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Julio/2024



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



Resumen

El virus Mixoma infecta a diferentes especies de conejos dando lugar a una infección conocida como mixomatosis. Esta afección, letal en la mayoría de los casos, plantea un problema tanto a nivel económico como medio ambiental. Las vacunas actuales frente a la mixomatosis presentan diversas carencias lo que implica que sea necesaria una investigación más amplia de los mecanismos de actuación viral y de la interacción entre este virus y su hospedador. Actualmente la investigación se encuentra dirigida al desarrollo de plataformas heterólogas de vacunación para las cuales, es necesario un conocimiento más exhaustivo del genoma viral. El estudio de las proteínas sintetizadas por el virus Mixoma, sobre todo aquellas implicadas en la formación del virión y con cierto grado de homología con virus más estudiados como el virus Vaccinia, puede ser un primer paso para afrontar esta cuestión. Para ello es interesante la expresión heteróloga de proteínas virales como la codificada por el gen M102-L. Este enfoque permite además la síntesis de la proteína de interés por medio de la unión a partículas similares a virus mediante sistemas baculovirales recombinantes. En el presente trabajo se tratará de aplicar este planteamiento a la síntesis de la proteína codificada por el gen M102L unida al dominio S de la proteína VP1 del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo. La estrategia a seguir se basará en la construcción de un plásmido recombinante que permita la transfección en células de insecto mediante el sistema de expresión génica de baculovirus recombinantes. Logrando así la síntesis de partículas similares a virus unidas a la proteína de interés en sistemas de expresión heterólogos.

Abstract

The Myxoma virus from the *Poxviridae* family infects different rabbit species, resulting in an infection known as myxomatosis. This condition, lethal in most cases, poses both economic and environmental problems. The current vaccines against myxomatosis have various shortcomings, necessitating more extensive research into the viral mechanisms and interactions between this virus and its host. Presently, research is focused on developing heterologous vaccination platforms, which require a more comprehensive understanding of the viral genome. Studying the proteins synthesized by the myxoma virus, especially those involved in virion formation and with some degree of homology to better-studied viruses like the vaccinia virus, can be a first step in addressing this issue. For this purpose, the heterologous expression of viral proteins such as the one encoded by the M102L gene is of interest. This approach also allows the synthesis of the protein of interest by means of attaching it to virus-like particles through recombinant baculoviral systems. In the present work, this approach will be applied to the synthesis of the protein encoded by the M102L gene linked to the S domain of the VP1 protein from the rabbit hemorrhagic disease virus. The strategy to be followed will be based on the construction of a recombinant plasmid that enables transfection into insect cells through the recombinant baculovirus gene expression system, thus achieving the synthesis of virus-like particles attached to the protein of interest in heterologous expression systems.

Declaración de originalidad

Declaro la originalidad de los contenidos presentes en este Trabajo Fin de Grado. Los textos, datos y figuras procedentes de otros autores han sido debidamente citados de forma clara y estricta tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía.

Índice de abreviaturas

ADN Ácido desoxirribonucleico

BEVS Sistemas de expresión de baculovirus

CLC Lisado celular clarificado

CMV Citomegalovirus

HF High Five

His-tag Etiqueta de histidina

IPTG Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

kDa kiloDaltons

LB Medio Luria-Bertani

M Marcador de masa molecular

MOI Multiplicidad de Infección

MYXV Virus del Mixoma

NEB New England Biolabs

OD Densidad Óptica (Optical Density)

OPVs Orthopoxvirus

ORFs Pautas abiertas de lectura

PBS Solución Salina Tamponada con Fosfatos (Phosphate-Buffered Saline)

Pb pares de bases

P0 Pase 0

P1 Pase 1

RHDV Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (Rabbit Hemorrhagic Disease Virus)

SFB Suero fetal bovino

SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SOC Super Optimal broth with Catabolite repression

TIRs Repeticiones invertidas terminales

Ufp Unidades formadoras de placas

UV Ultravioleta

VLPs Partículas similares a virus

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
El Virus Mixoma	1
Introducción a la expresión heteróloga de proteínas virales	5
2. Objetivos.....	6
3. Materiales y métodos	6
Cepas y condiciones de cultivo.....	6
Anticuerpos.....	7
Plásmido recombinante	7
Fragmento recombinante	8
Construcción del vector de expresión mediante ensamblaje de Gibson.....	8
Transformación de células de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico.....	9
Aislamiento de ADN plasmídico y cuantificación.....	9
Digestión enzimática.....	9
Sobreexpresión del gen 102L	10
Test rápido para la detección de RHDV	10
Análisis por SDS-PAGE, <i>Western Blotting</i> y tinción con Azul de Coomassie.	10
Transfección de células Sf9.....	11
Infección de células Sf9 con los baculovirus recombinantes.....	12
Titulación viral.....	12
Purificación de VLPs a partir de células High Five	13
Reconocimiento de la proteína M102L por suero Anti-Mixoma mediante ensayo <i>Western Blot</i>	13
4. Resultados y Discusión.....	14
Transformación de cepas <i>E. coli</i>	14
Cuantificación del ADN plasmídico purificado.....	14
Digestión enzimática con <i>XhoI</i> y <i>NcoI</i>	15
Ensayos de sobreexpresión	15
Transfección en células de insecto Sf9 para producir baculovirus recombinantes P0.	18
Transfección en células de insecto Sf9 para producir baculovirus recombinantes P1.	19
Titulación viral.....	21
Purificación de VLPs a partir de High Five.....	22
Reconocimiento de la proteína de interés por suero Anti-Mixoma mediante ensayo <i>Western Blot</i>	25
5. Conclusión	25
6. Bibliografía.....	27

1. INTRODUCCIÓN

El Virus Mixoma

El virus del mixoma (MYXV) es un miembro del género *Leporipoxvirus*, subfamilia *Chordopoxvirinae* y familia *Poxviridae*. Como todos los miembros de esta familia, posee un genoma de ADN lineal de doble cadena con repeticiones invertidas terminales (TIRs) y bucles de horquilla cerrados covalentemente en cada extremo (Figura A). Su genoma se encuentra contenido dentro de un virión en forma de ladrillo, y la replicación viral ocurre únicamente en el citoplasma de las células infectadas (Figura A), [2].

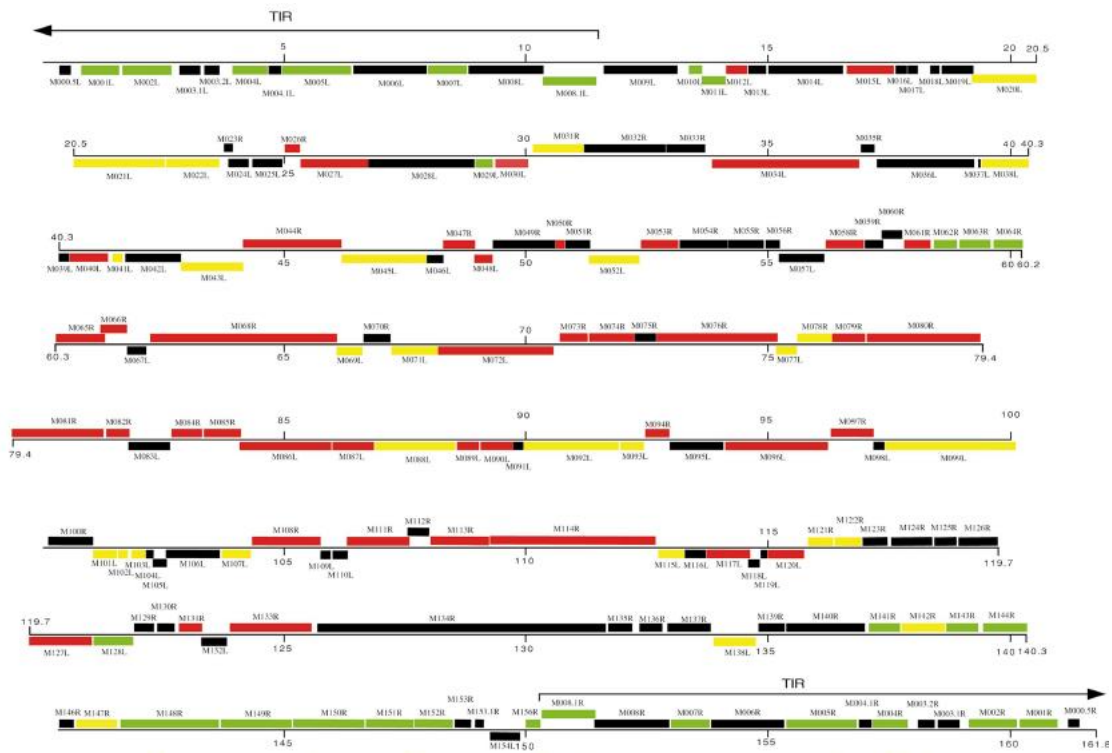


Figura A. Mapa genómico lineal del virus mixoma. Los rectángulos indican pautas abiertas de lectura (ORFs) y su color su posible función. ORFs de función desconocida en negro, ORFs con potencial inmunoregulador o funciones de rango de hospedador, ORFs involucrados en funciones constitutivas en rojo y aquellos ORFs estructurales o involucrados en la morfogénesis o modificación de proteínas en amarillo. Los genes transcritos hacia la izquierda se muestran debajo de la línea, y los transcritos hacia la derecha, encima de la línea. Las secuencias de repetición invertida terminal (TIR) están delimitadas por flechas en cada extremo del genoma [2].

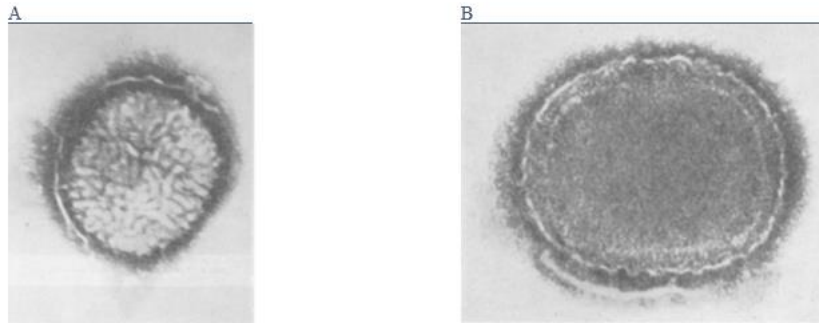


Figura B. Micrografías electrónicas del virus mixoma. A y B muestran los dos tipos de partículas observadas. (A) Partícula de virus en la que la tinción no ha penetrado, (B) partícula en las que la tinción ha penetrado [3].

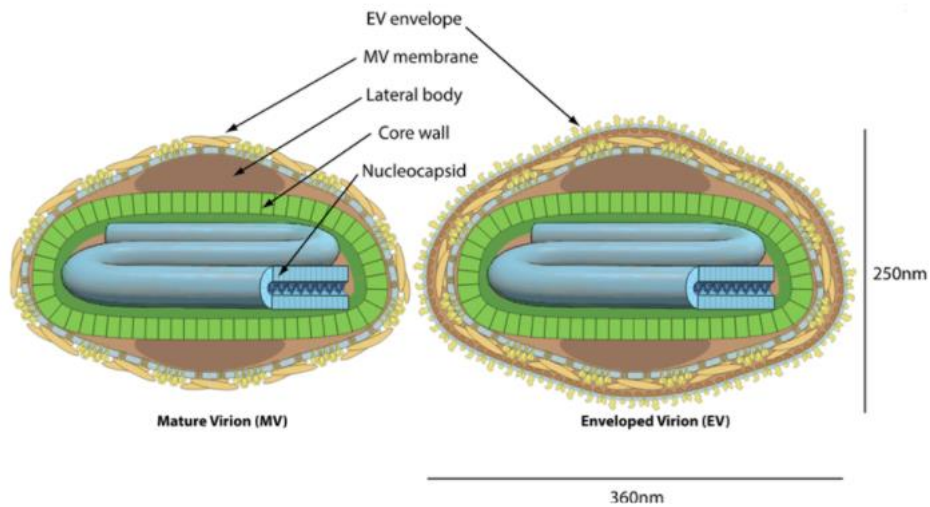


Figura C. Esquema de la estructura del virión del MYXV [4].

El virus mixoma infecta a diversas especies de conejos, lo que resulta en una sintomatología variada. Por ejemplo, causa una infección leve y benigna en su huésped natural, el conejo norteamericano (*Sylvilagus californicus*), pero desencadena una rápida enfermedad sistémica e infección letal conocida como mixomatosis en conejos europeos (*Oryctolagus cuniculus*), con tasas de mortalidad que pueden alcanzar prácticamente el 100%. [5]

La mixomatosis fue observada por primera vez en conejos de laboratorio en 1896 por Giuseppe Sanarelli en Montevideo, Uruguay [5]. Históricamente, el virus mixoma, destaca por su papel en la plaga de conejos en el continente Australiano. Entre 1859 y 1930, la población de conejos europeos en esta zona aumentó de manera exponencial. Esta expansión se originó a partir de un pequeño número de parejas reproductoras iniciales que habían sido introducidas tras la colonización. Como resultado, los conejos se extendieron por todo el continente, alcanzando una población estimada de aproximadamente tres mil millones [6]. En 1936 dado que el MYXV tenía una tasa de mortalidad del 99.5% en el conejo europeo, se sugirió como un posible medio para controlar esta población de conejos. Se estima que unos 400 millones de conejos fallecieron en tan solo un año, y en menos de una década, la población de conejos silvestres se redujo en un 95%

[5]. Sin embargo la cepa original, que presentaba una tasa de letalidad muy alta, fue rápidamente reemplazada por cepas con tasas de letalidad del 70 al 95% alcanzando incluso valores menores del 50% estableciéndose una convivencia entre ambas especies [7], [8], [9], [10].

La enfermedad producida por este virus, la mixomatosis, se caracteriza por causar una conjuntivitis progresiva y secreciones en las mucosas. La infección suele durar entre 10 y 14 días hasta que el sistema inmune colapsa. El virus mixoma se propaga a través de vectores artrópodos, siendo los mosquitos los principales transmisores [5]. El virus infecta solo a conejos y liebres europeas marrones y no es patogénico en ningún otro huésped probado aparte de los lagomorfos. Sin embargo, el MYXV puede replicarse en células en cultivo de muchas especies, incluidas la mayoría de las células cancerosas humanas, que son particularmente permisivas para el MYXV [5], [11].

Por un lado, el MYXV está ganando más interés desde el punto de vista terapéutico, ahora que se ha demostrado que tiene un gran potencial para el tratamiento de ciertas enfermedades de base inflamatoria y cáncer en humanos. Esto se debe entre otras cosas, a que cuenta con una amplia cantidad de genes que codifican proteínas inmunoreguladoras, algunas de estas proteínas son específicas de conejo, mientras que otras son capaces de reconocer dianas de otros hospedadores, como ratón o humano. Estas secuencias se encuentran preferentemente localizadas cerca o en los TIRs. Además el MYXV presenta gran potencial como candidato a virus oncolítico tanto contra cánceres murinos en hospedadores de ratones inmunocompetentes, como contra cánceres humanos xenotransplantados en ratones inmunodeficientes [12].

Por otro lado, el MYXV es un excelente agente de control de plagas en sitios estratégicos. El uso del MYXV como agente de control biológico ha contribuido a convertirlo en un modelo de estudio del sistema virus/hospedador [6]. A su vez, los conejos, juegan un papel fundamental tanto como mascotas o animales de laboratorio como también en la economía como fuente de alimento y de biodiversidad. En la cunicultura, donde son criados tanto para consumo humano como para investigación, el MYXV representa una amenaza considerable. El desarrollo de estrategias de vacunación seguras es fundamental para proteger estas poblaciones y mantener su producción sostenible además de intentar lograr un diagnóstico rápido y fiable de la enfermedad. Destaca en este sentido la necesidad de lograr un balance entre la eficacia de la vacunación y el riesgo de letalidad. Con el fin de inducir reacciones inmunes más potentes durante la vacunación que aseguren una mayor efectividad de la vacuna, se podría considerar la inserción de genes que participen en la respuesta inmune en plataformas heterólogas de vacunación. Este acercamiento ya ha sido exitoso en el tratamiento de otras afecciones como la gripe canina o en la vacunación frente al virus de la gripe equina, el virus del Nilo Occidental y el virus de la diarrea bovina [13], [14], [15].

En este aspecto, interesa la investigación de proteínas del MYXV que presenten alto grado de homología con otras proteínas de virus más estudiados como el virus Vaccinia y cuya función esté relacionada con la formación del virión. El virus Vaccinia es el miembro prototípico de la familia de los poxvirus [4]. La morfogénesis del virión es altamente compleja y se desarrolla en múltiples etapas en ubicaciones intracelulares precisas dentro de la célula infectada [16]. Las distintas proteínas asociadas a la membrana del virión tienen un papel fundamental en su morfogénesis, a su vez, las diferentes formas del virión parecen determinar las distintas rutas de infección viral [17].

Gracias a la secuenciación del genoma completo del MYXV llevado a cabo por Cameron y col., se pueden identificar proteínas del virus que presenten homología con proteínas del virus de Vaccinia cuya función ya ha sido determinada [1]. Por ejemplo, el gen M102L que se encuentra entre las posiciones 101.776 y 101.573 del genoma del MYXV, codifica una proteína de 68 aminoácidos. La expresión de este gen está controlada por un promotor viral tardío. Además, muestra un grado de conservación de entre el 20 y el 50 por ciento entre los poxvirus. Respecto al virus Vaccinia revela una homología con el gen A13L [2]. El gen A13L de VACV produce una pequeña proteína de membrana tipo II del virión maduro intracelular (IMV) denominada p8. Esta proteína está involucrada en la morfogénesis del virión [18]. La conservación de la secuencia en los extremos N- y C-terminal de la proteína p8 indica que estos dominios pueden tener funciones importantes para los Orthopoxvirus (OPVs). El extremo N-terminal de la proteína A13L es un dominio de anclaje de membrana mientras que el extremo C-terminal se extiende desde la membrana del IMV hacia el citoplasma [19], [30]. La porción central de esta proteína muestra heterogeneidad entre especies. Sería interesante explorar la función de esta proteína y por qué diferentes especies de OPVs han desarrollado motivos de aminoácidos distintos en el dominio central [21]. Otra proteína cuya función parece estar relacionada con la formación del virión en el virus mixoma es la codificada por el gen M116L que se encuentra entre las posiciones 113.712 y 113.293 del genoma y está conformada por 140 aminoácidos. Presenta además un alto grado de homología, superior al 50%, con al menos un gen dentro de la familia *Poxviridae*. Las homologías más relevantes son con el gen HM3 del virus capripox y con el gen A28L del virus Vaccinia. El gen A28L del virus Vaccinia está altamente conservado en todos los poxvirus secuenciados [22]. Los estudios de Senkevich y col., mostraron que la proteína codificada por el gen A28L se expresa en momentos tardíos del ciclo de replicación del virus y es un componente de la membrana del virión maduro intracelular, comprobaron además que esta proteína es necesaria para la infectividad del virión [23]. Presenta una secuencia hidrofóbica N-terminal, presente en todos los homólogos del A28, que ancla la proteína en la membrana de la superficie del virión de manera que la mayor parte de ella está expuesta al citoplasma. La presencia de A28 en todos los poxvirus

y su alta conservación de secuencia predicen un papel esencial en el ciclo de vida del virus por lo que el estudio de su homólogo, el gen M116L, podría aportar información esencial [23].

Introducción a la expresión heteróloga de proteínas virales

El estudio e investigación de las proteínas virales del MYXV requiere del uso de técnicas de expresión heteróloga. La expresión heteróloga se refiere al proceso mediante el cual un gen de un organismo es introducido y expresado en un organismo diferente. Este proceso implica, primero, la selección de la proteína de interés y el diseño de la construcción. Esta debe incluir etiquetas (tags) que permitan la posterior purificación de la proteína y su uso en ensayos *Western Blot* con anticuerpos comerciales [24]. El siguiente paso es la elección del sistema de expresión más adecuado que depende, a su vez, del vector de expresión que se utilice. Los proveedores comerciales como *Novagen*, *Life Technologies (Invitrogen)*, *Stratagene*, *Clontech* y *GE Healthcare*, entre otros, ofrecen diversos conjuntos de vectores de expresión bacterianos, de levadura, baculovirales y de mamíferos [25]. Entre ellos se encuentran los vectores de expresión multisistema pTriEx™ que permiten la expresión heteróloga de genes en células bacterianas, de insecto y de mamífero a partir de un solo plásmido. Entre sus características destaca la presencia de segmentos de ADN genómico de baculovirus que flanquean las regiones promotoras y de clonación, lo que permite la generación de baculovirus recombinantes.

Los baculovirus recombinantes han surgido durante las últimas décadas como uno de los sistemas de expresión génica más populares (BEVS). Estos virus son capaces de infectar células de insecto y destacan por su capacidad para producir altos niveles de proteínas recombinantes biológicamente activas [26]. El BEVS introduce genes exógenos en regiones no esenciales del genoma viral a través de la recombinación homóloga y utiliza los promotores de poliedrina (polh/pH) o p10 para producir proteínas recombinantes en células de insectos [27], [28], [29]. Las líneas celulares más comúnmente utilizadas son: IPLB-SF21-AE también conocida como Sf21 y su derivada Sf9, ambas provienen del tejido ovárico pupal de *Spodoptera frugiperda*; también BT1-TN5B1-4 (nombre comercial High Five) derivada del tejido ovárico de adultos de *Trichoplusia ni* [30], [31]. Tanto la Sf21 y Sf9 son altamente susceptibles a la infección viral por baculovirus. El subclon Sf9, posiblemente el más utilizado, tiene una tasa de crecimiento más rápida, permite alcanzar una mayor densidad celular y una mayor tolerancia al ósmosis, al pH y al estrés por cizallamiento que las células Sf21. Las células High Five, por otro lado, aunque presentan un mayor rendimiento en la producción de proteínas recombinantes en comparación con Sf9 y Sf21, liberan más de tres veces la cantidad de proteasas y, por lo tanto, pueden causar una mayor degradación de la proteína objetivo [31].

El BEVS también se ha convertido en una plataforma clave para la producción de partículas similares a virus (VLPs) [31]. Las VLPs son ensamblajes de supramoléculas con geometrías bien

definidas que imitan la estructura principal de los viriones nativos, pero careciendo de genoma viral. Al igual que los virus, las VLPs pueden ser tanto no envueltas como envueltas, y pueden formarse tras la expresión de una o varias proteínas estructurales virales en un sistema heterólogo recombinante [32]. La producción de VLPs con BEVS ofrece varias ventajas sobre otros sistemas de expresión, incluyendo la capacidad de producir proteínas glicosiladas, la formación de partículas autoensambladas, la producción rápida y la facilidad para la fabricación a gran escala. [31], [33].

Hasta el momento, las VLPs han demostrado ser altamente inmunogénicas y recientemente han cobrado relevancia por sus diversas aplicaciones en vacunación, terapia génica e inmunoterapia. Actualmente, existen cuatro vacunas recombinantes que están en el mercado basadas en VLPs altamente purificadas: Engerix® de *GlaxoSmithKline (GSK)* [34] y Recombivax HB® de *Merck and Co, Inc.* contra el virus de la hepatitis B [35], y Cervarix® [36] y Gardasil® contra el virus del papiloma humano (VPH) [37].

2. OBJETIVOS

En este Trabajo Fin de Grado el objetivo principal será tratar de obtener la expresión del gen M102L del virus mixoma mediante la formación de VLPs utilizando la expresión heteróloga del gen que codifica la proteína de interés.

Como objetivos específicos se pretende:

- El diseño y construcción de un plásmido recombinante que permita la expresión del gen viral M102L en sistemas heterólogos. Para ello, se seleccionará el vector de clonación y expresión más adecuado y su ensamblaje con el fragmento recombinante deseado. La determinación de la expresión del gen M102L en diferentes sistemas de expresión (procariotas y eucariotas). La evaluación de la producción y purificación de VLPs fusionadas con la proteína de interés.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de cultivo

Escherichia coli: Cepas *NEB 5-α*, *DH5-α* y *BL21*

DH5-α es una cepa de *E.coli* comúnmente usada en laboratorios para la clonación y mantenimiento de plásmidos al igual que la cepa *BL21* que fue desarrollada específicamente para la producción de proteínas recombinantes debido a su deficiencia en proteasas y lipopolisacáridos. Ambas se emplean como hospedadoras para la transformación y aislamiento de plásmidos y también para la expresión y purificación de proteínas. La cepa de *E. coli* *NEB 5-α* proporcionadas por el kit *NEB® 5-alpha Competent E. coli (High Efficiency)* de la casa comercial *New England Biolabs®* deriva de *DH5-α* y también se utiliza para la transformación y aislamiento de plásmidos.

Las cepas de *E. coli* se cultivan a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) el cual es suplementado con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml para la selección del plásmido mediante el marcador de resistencia a ampicilina.

Células de insecto: Sf9 y High Five

Las células de insecto Sf9 y High Five (HF) se utilizan para la producción de la proteína recombinante mediante el sistema de baculovirus. Se cultivan en medio *Gibco*TM Sf-900TM II SFM (Ref.: 10902096, *ThermoFisher Scientific*) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) o en condiciones libres de suero, a 28°C sin CO₂.

Anticuerpos

Se utiliza el anticuerpo primario monoclonal anti-Histag obtenido en ratón. Se utiliza también el anticuerpo anti-RHDV obtenido en conejo. Este anticuerpo se trata de un suero hiperinmune de conejo contra el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo. Se emplea también suero anti-Mixoma obtenido en conejos infectados por MYXV.

Como anticuerpos secundarios se usan monoclonales comerciales dirigidos contra las Ig de ratón o conejo y conjugados con un fluoróforo rojo o verde, esto permite la detección en el escáner *Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences)*.

Plásmido recombinante

El plásmido pTriEx1.1 se obtuvo de la casa comercial *Novagen*[®]. Se usará como vector en el Ensamblaje de Gibson tras haberlo digerido con las enzimas *NcoI* y *XhoI*. El vector pTriEx alberga un promotor de mamíferos, un potenciador de citomegalovirus (CMV) fusionado con el promotor del β-actina de pollo, o simplemente, promotor CMV; un promotor de baculovirus, p10 derivado del nucleopoliedrovirus de la polilla californiana del polvo (AcMNPV); y el promotor T7lac de *Escherichia coli* que es inducible por isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Las señales de iniciación de la traducción incluyen un sitio de unión al ribosoma (RBS) para la expresión bacteriana seguido por una secuencia consenso de Kozak óptima para la expresión en células de mamífero. Las regiones promotoras y de clonación están flanqueadas en cada lado por segmentos de ADN genómico de baculovirus que facilitan la generación de los baculovirus recombinantes [38]. Su estructura se observa en la Figura D.

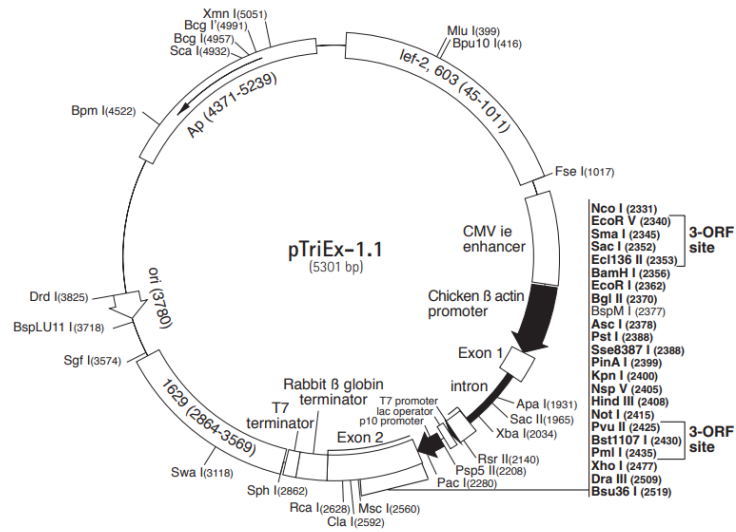


Figura D. Estructura vector pTriEx1.1. Los rectángulos representan elementos de secuencia importantes del vector* [39].

Fragmento recombinante

El fragmento génico se observa en la Figura E es proporcionado por la empresa *IDT*TM. Cuenta con dos secuencias flanqueantes para el ensamblaje de Gibson (a y d) también presenta la secuencia codificante del dominio S de la proteína VP1 del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) (b) fusionada con la ORF 102L del virus mixoma (c) que codifica la proteína de interés. La proteína resultante tiene una longitud total de 314 aminoácidos lo que resulta en un peso aproximado de 34 kDa. Además, incluye sitios de corte específicos para varias enzimas de restricción como *NcoI* y *XhoI*.

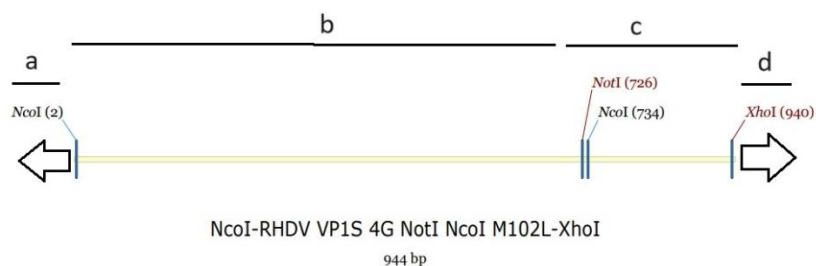


Figura E. Esquema del fragmento recombinante utilizado y sus posibles sitios de restricción enzimática. (a y d) secuencias flanqueantes para el Ensamblaje de Gibson. (b) secuencia codificante del dominio S de la proteína VP1 del virus RHDV fusionada con la ORF 102L del virus mixoma (c).

Construcción del vector de expresión mediante ensamblaje de Gibson

Como el fragmento recombinante ya cuenta con las secuencias flanqueantes necesarias, se lleva a cabo el Ensamblaje de Gibson siguiendo el protocolo Gibson Assembly® Protocol (E5510) con el kit comercial *Gibson Assembly® Cloning Kit* de la casa *New England Biolabs®*. Previamente,

se utiliza la página web NEBioCalculator para calcular los volúmenes del fragmento y del vector comercial previamente digerido con *NcoI* y *XhoI*. Este método implica la sobreposición de extremos complementarios de fragmentos de ADN y su unión por una enzima de recombinación T5 exonucleasa y ADN ligasa. La mezcla de ensamblaje se incuba a 50°C durante 1 hora. Pasado este tiempo las muestras se almacenan a -20°C hasta la subsecuente transformación.

Transformación de células de *E. coli* con ADN plasmídico

Tras el ensamblaje se sigue el protocolo para la transformación de células competentes NEB 5-alpha de *E. coli* Gibson Assembly® Chemical Transformation Protocol (E5510) empleando el kit comercial NEB® 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency) de la casa New England Biolabs®. Se lleva a cabo el método del shock térmico que consiste en mezclar las células competentes con el ADN plasmídico y mantenerlas en hielo durante 30 minutos, después se someten a un shock térmico a 42°C durante 30 segundos, y luego se dejan en hielo durante 2 minutos. Se añade medio SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression), una variante del medio LB más favorable para el cultivo de las células tras la transformación. Una vez añadido el medio SOC se incuban las células durante 1 hora a 37°C en agitación. Finalmente se recogen por centrifugación, se resuspenden en medio LB y se siembran en placas de medio LB suplementado con Ampicilina. Para verificar la transformación correcta de las células competentes se siembra una placa con las bacterias transformadas, una segunda placa con el vector diluido como control positivo y una última con células NEB5-α transformadas con agua que actúan como control negativo. Con estos controles se comprueba que el medio es adecuado y libre de contaminación y que las células son viables. Para la transformación de las cepas DH5-α y BL21 se sigue el mismo protocolo descrito anteriormente.

Aislamiento de ADN plasmídico y cuantificación.

Para el aislamiento del ADN plasmídico, se utiliza el kit comercial para el aislamiento de plásmidos *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit de Invitrogen™*. Este proceso consiste en lisar las células mediante un procedimiento alcalino/SDS, después el lisado se pasa a una columna de membrana de sílice que une selectivamente el ADN plasmídico. Los contaminantes se eliminan con el tampón de lavado y el ADN plasmídico se eluye en el tampón TE, que contiene 10mM de Tris, 1mM de EDTA y tiene un pH de 8,0. El ADN se recoge mediante centrifugación y se almacena a -20°C. Se realiza además una cuantificación fluorimétrica del ADN aislado mediante el fluorímetro Qubit de la casa comercial *Invitrogen*.

Digestión enzimática

Para verificar que el plásmido se ha construido de la manera diseñada se realiza una digestión enzimática con *XhoI* y *NcoI* del ADN plasmídico purificado a partir de los cultivos bacterianos. La restricción enzimática tiene lugar durante 1 h a 37 °C. A la mezcla de la digestión se le añade

un colorante de carga del ADN de la casa comercial *Thermo Scientific*. Este, contiene dos colorantes diferentes (azul de bromofenol y xileno cianol) para el seguimiento visual de la migración del ADN durante la electroforesis. Se corren las muestras en un gel de agarosa al 1% que contiene SafeView™ Classic de la casa comercial *abm*, un tinte de ácidos nucleicos para la visualización en geles de agarosa. Se escanea posteriormente mediante un transiluminador ultravioleta y se procesa el resultado mediante un equipo revelador de geles de la casa comercial *Carestream*.

Sobreexpresión del gen 102L

Se realizan varios ensayos de sobreexpresión tanto en cepas DH5- α como en BL21 transformadas como se ha descrito previamente. El vector pTriEx-1.1 cuenta con el promotor T7lac de *E. coli* que es inducible por IPTG, por ello, se va a usar este compuesto para inducir la sobreexpresión de la proteína de interés en ambas cepas. Se seleccionan varias colonias positivas de la transformación y se inoculan en tubos con 2 mL de medio LB con ampicilina que se incuban durante 4 horas en agitación a 37°C. Tras este tiempo, se separa el volumen en dos tubos y se induce uno de ellos conteniendo IPTG a una concentración final de 100 μ M. Se dejan incubar durante 2 y/o 4 h a 37°C en agitación y finalmente se recogen las células mediante centrifugación y se almacenan a -20°C hasta su análisis.

Test rápido para la detección de RHDV

Como método complementario se realizan a lo largo del proyecto distintos tests rápidos inmunocromatográficos CERTEST RHDV + RHDVb de la casa comercial *Certest Biotec S.L.* Estos test permiten verificar la presencia de la proteína que se ha producido en las células como resultado de la expresión del fragmento clonado gracias a la presencia de los anticuerpos 2D9, específico para la variante RHDVb, y el anticuerpo 3A10, que reconoce ambas variantes y que da positivo al detectar un epítipo contenido en la subunidad S de la VP1 del RHDV. De forma que añadiendo unas gotas del sobrenadante de las células Sf9 transfectadas con el plásmido o células HF supuestamente infectadas con los baculovirus recombinantes, se puede determinar rápidamente la presencia o no de infección viral.

Análisis por SDS-PAGE, *Western Blotting* y tinción con Azul de Coomassie.

Para el análisis de todas las muestras proteicas recogidas de los diferentes ensayos (transformación, inducción, transfección y purificación) se han utilizado las técnicas de *Western blot* y electroforesis con tinción del gel mediante Azul de Coomassie. Para su análisis se lleva a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS siguiendo el protocolo descrito por *Laaemml* [40]. Se cargan las muestras en un gel de poliacrilamida al 12% (v/v) y se dejan correr a un voltaje constante de 120V hasta que el frente del gel desaparece. Para la tinción con *Azul de Coomassie*, tras correr el gel, se incuba con la solución de tinción durante 30 minutos.

Pasado este tiempo, se retira la tinción y se realizan lavados sucesivos con metanol 30% (v/v). Una vez correctamente desteñido, se seca el gel mediante *Dry-Ease Mini-Gel Dryer System (Invitrogen)* usando una solución de metanol (30% v/v) y glicerol (5% v/v). El gel también puede ser previamente escaneado mediante el instrumento *Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR)*, Este escáner permite producir imágenes a partir de excitación y emisión de moléculas fluorescentes en el rango del infrarrojo cercano (IR), por lo que se usará también para el revelado de las membranas resultantes del análisis mediante Western blot.

El ensayo *Western Blot* involucra la transferencia de las proteínas separadas mediante electroforesis, SDS-PAGE, a una membrana, seguida de la detección específica de una proteína utilizando anticuerpos primarios específicos y secundarios conjugados con un fluoróforo. Tras la separación electroforética se realiza la transferencia semiseca de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa mediante el aparato *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad)* durante 1 h a intensidad constante. Posteriormente, la membrana se incuba con la solución de bloqueo (leche en polvo al 5% (p/v) en PBS) durante 1h para evitar la unión inespecífica de anticuerpos. Transcurrido este tiempo se deja incubar la membrana con el anticuerpo monoclonal primario anti-His de ratón durante 12 horas a 4°C. Se utiliza anti-Ig de ratón conjugado con un fluoróforo como anticuerpo secundario y se incuba en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, y entre anticuerpos, se lava la membrana con PBS-Tween-20 al 0,1% (v/v) varias veces. Para revelar la membrana se utiliza el escáner *Odyssey*. También se realizaron ensayos *Western Blot* con el anticuerpo anti-RHDV. Este anticuerpo se trata de un suero hiperinmune de conejo contra el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo. La membrana, tras el bloqueo, se deja incubar una hora en agitación a temperatura ambiente con el anticuerpo primario. Pasada esta hora, se incuba con el anticuerpo secundario anti-Ig de conejo unido a un fluoróforo durante otra hora. Finalmente, se analiza también utilizando el escáner *Odyssey*.

Transfección de células Sf9

Tras haber comprobado que el plásmido recombinante generado es el adecuado por restricción enzimática, se procede a su transfección en células de insecto para la producción de baculovirus recombinantes que porten nuestra proteína de interés. Para la transfección, primero se prepara el complejo de transfección que consiste, por un lado, en una solución denominada A en la que se añade el ADN viral de las muestras cuantificadas, el bÁcrido y agua ultrapura en *medio de Grace* (Ref:11667-037, Gibco), el bÁcrido es un sistema de baculovirus recombinante que permite la expresión del vector en las células. Por otro lado, se prepara una solución B en donde se adiciona *Cell Fecting Reagent* (Ref:10362-100, Gibco) en medio de Grace. Se mezcla el contenido de A y B y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añade la mezcla gota a gota sobre las células de insecto previamente sembradas en placas de 6 pocillos en

medio sin suero y se deja incubar durante 5 horas a 28°C. Pasado ese tiempo, se da un cambio de medio por medio fresco con suero. Las células y el sobrenadante se recogen a las 72 horas y se separan mediante centrifugación, constituyendo lo que se denomina pase 0 (P0). El sedimento de se guarda a -20°C y el sobrenadante conteniendo los baculovirus recombinantes se guarda a 4°C.

Infección de células Sf9 con los baculovirus recombinantes

El sobrenadante procedente del pase 0 se utiliza para infectar nuevamente células de insecto, constituyendo el pase 1 (P1), con el fin de conseguir un stock de baculovirus con un título viral suficiente para los siguientes ensayos. Para ello, se van a infectar frascos de cultivo T25 conteniendo $2 \cdot 10^6$ células Sf9 en 5 ml de medio de cultivo al 5% de SBF. Se elimina el medio del cultivo y se cambia por medio fresco sin suero. Se deja que las células se adapten al medio sin suero, una hora aproximadamente, y después se infectan con 500 μ L del sobrenadante de P0. Se deja que la infección transcurra durante 72 horas para después recoger tanto el pellet de células como el sobrenadante correspondiente a P1 igual que se hizo con P0. Los pellets correspondientes a P0 y P1, se analizarán mediante electroforesis en gel de poliacrilamida que posteriormente se revelarán mediante tinción con *Azul de Coomassie* o se transferirán a membrana para llevar a cabo un Western Blot. El sobrenadante de P0 y P1 se someterá a un test de detección rápida CERTEST RHDV + RHDVb para comprobar si la infección ha tenido lugar.

Titulación viral

Se determina el título viral de los sobrenadantes de P1 mediante el método de dilución a punto final. Se preparan dos placas de 6 pocillos para la titulación con $1 \cdot 10^6$ células Sf9 por pocillo en medio sin suero y se dejan incubar a 28°C durante 1h para que las células se asienten. A continuación, se llevan a cabo diluciones seriadas del sobrenadante conteniendo los baculovirus desde 10^{-1} a 10^{-8} en medio sin suero. Posteriormente, se quita el medio sin suero de las células y se añaden 500 μ L de las diluciones 10^{-4} hasta 10^{-8} , dejando un pocillo de células control en las que no se añade inóculo, sólo medio. Se incuban durante 1 h y media a 28 °C. Tras este tiempo, se quita el inóculo y se añade 2 ml de una solución de agarosa al 1% en medio de Grace con 10% SFB, se deja solidificar a temperatura ambiente y se añade 1 mL de medio completo. Luego se incuba durante 5 días a 28°C. Tras este periodo, se elimina el medio completo y se dejan tiñendo con una solución de rojo neutro hasta el día siguiente en oscuridad. El rojo neutro es un colorante que tiñe células vivas por lo que las células infectadas y lisadas no absorberán el tinte permitiendo la identificación de las placas virales. Tras 12 h aproximadamente, se elimina el colorante sobrante y se observan mediante un transiluminador la posible aparición de placas virales. Se realiza un conteo de las unidades formadoras de placas (UFP) en el pocillo de mayor dilución posible, y así se estima el título viral aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Titulo viral} = \frac{\text{Número de placas} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen infectado (ml)}}$$

Purificación de VLPs a partir de células High Five

Para la purificación de VLPs se utiliza la línea celular High Five en medio de cultivo de Grace suplementado con SBF 5% (v/v). Se calcula el volumen necesario mediante el título viral obtenido previamente para que la infección tenga una multiplicidad de infección (MOI) de 3, es decir, teóricamente 3 unidades formadoras de placa o partículas virales van a infectar una célula, se añaden entonces 2 ml del sobrenadante de P1 a cada T150 en 3 ml de medio sin suero para realizar una pre-infección en volumen reducido. Tras, este tiempo, se completa hasta un volumen final de 20 ml con medio sin suero y se dejan incubar 72 h a 28°C. Tras las 72 horas de infección se recoge la suspensión celular mediante centrifugación y se resuspende el sedimento en PBS con inhibidor de proteasas. En un sonicador Branson (*Branson*TM) se lisan las células mediante sonicación al 15% de amplitud durante un tiempo total de 3 minutos con pulsos de 10 segundos con 30 segundos de descanso. Para asegurar la ruptura celular, se pasa la muestra por jeringuillas de 21G varias veces. A continuación, se centrifuga la muestra a 24.000 g durante 1 hora a 4°C. Tras la centrifugación se toma una alícuota del sobrenadante que será el lisado celular clarificado (CLC) y se descarta el sedimento tomando antes una alícuota del mismo para su análisis.

La purificación de las posibles VLPs se realiza por columna de afinidad con resina de níquel, la interacción se basa en la unión específica entre el ion metálico Ni²⁺ y las etiquetas de histidina (*His-tag*) presentes en la construcción. Antes de cargar la muestra, se equilibra la columna con sucesivos lavados con PBS y finalmente con un lavado con tampón 50mM de imidazol. Se pasa el CLC dos veces a través de la columna y se realizan eluciones con concentraciones crecientes de imidazol recogiendo las fracciones correspondientes a cada concentración. Además, las fracciones 100mM, 250mM y 500mM de imidazol se toman por duplicado de manera que haya una réplica sin imidazol que se elimina mediante su dilución en PBS y ultracentrifugación a 45.000 rpm 2h y media a 4°C.

Reconocimiento de la proteína M102L por suero Anti-Mixoma mediante ensayo *Western Blot*

Se pretende verificar si la proteína M102L puede ser reconocida por sueros de conejos infectados por el virus Mixoma. Se realiza para ello un ensayo *Western Blot* siguiendo los procedimientos previamente descritos, con las muestras obtenidas de las fracciones tras el proceso de purificación de VLPs utilizando como control positivo células de la línea celular RK13 infectadas con la cepa *Lausanne* de MYXV. Como anticuerpo primario se utiliza suero de conejo infectado. Se utiliza anti-Ig de conejo conjugado con un fluoróforo como anticuerpo secundario.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transformación de cepas *E. coli*

La Figura C. muestra los resultados de los cultivos de las distintas cepas bacterianas tras la transformación y sus respectivos controles. Para la cepa NEB5- α B. se aprecia la ausencia total de colonias. Gracias a los controles negativo A. y positivo C. podemos interpretar este resultado y llegar a la conclusión que la falta de resultados se debe a un fallo en la transformación. Al no haber integrado el plásmido recombinante que portaba el gen de resistencia a ampicilina, las bacterias no son capaces de crecer en medio selectivo. Sin embargo, para el cultivo de las células transformadas de la cepa DH5- α se obtienen varias colonias, lo que significa que el Ensamblaje de Gibson ha funcionado y la transformación ha sido satisfactoria. Este mismo resultado se obtiene para las células de la cepa BL21. Al analizar estos resultados podemos suponer que las células NEB5- α no son la cepa de *E. coli* óptima para este proceso. En futuros ensayos, se podría considerar prescindir de su utilización.

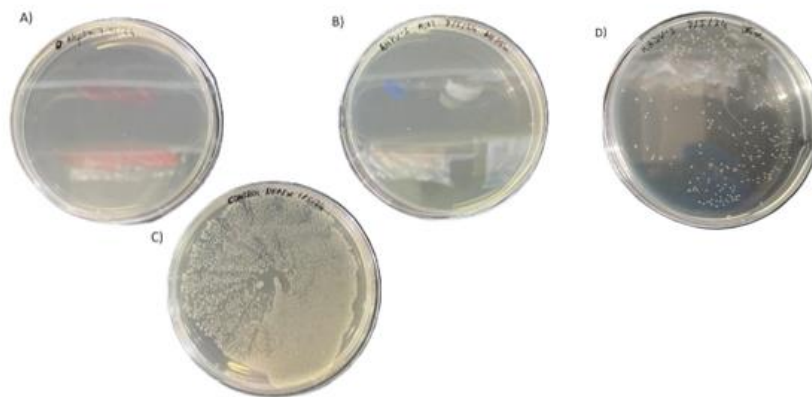


Figura F. Crecimiento de NEB5- α en agar LB + amp luego de transformación por choque térmico de (A) Control negativo (B) Bacterias transformadas (C) Control positivo. (D) Crecimiento de DH5- α luego de transformación por choque térmico.

Cuantificación del ADN plasmídico purificado

Se les otorga números del 1 al 6 a los resultados de la cuantificación del ADN extraído de seis colonias elegidas al azar de las placas tras la transformación. Estos resultados se muestran en la Tabla 1. Se puede apreciar como las concentraciones varían significativamente entre las distintas muestras, no obstante, todas presentan cantidades suficientes para proceder con los distintos experimentos exceptuando la muestra número 6, que se descarta, al revelar una concentración demasiado baja. Sería interesante analizar la pureza del ADN mediante espectrofotometría. Evaluando su absorbancia a distintas longitudes de onda se podría calcular la ratio A260/A280 y determinar la pureza de los plásmidos obtenidos y también la presencia de posibles contaminantes que puedan afectar a ensayos posteriores.

Muestra	Concentración (ng/μl)	μg (en 50μl)
1	148,0	7,40
2	65,0	3,25
3	77,8	3,89
4	123,0	6,15
5	57,0	2,85
6	23,2	1,16

Tabla 1. Cuantificación del vector con el dispositivo Qubit.

Digestión enzimática con *XhoI* y *NcoI*

En la Figura G se puede observar el vector pTriEx diluido (1) teóricamente debería tener una longitud de 5301pb por lo que el resultado, una única banda entre 7000 y 10000 pares de bases, se ajusta más o menos a lo esperado y sirve como referencia para el análisis de las muestras de ADN plasmídico. Por otro lado, todas las muestras presentan tres bandas muy claras. Una banda de mayor peso molecular y que muestra una mayor señal entre 5000 y 7000 pb que correspondería al fragmento del vector. Se observan asimismo dos bandas para cada calle, la primera con una longitud de entre 700 y 1000 pb que representaría el fragmento de mayor tamaño entre los sitios de corte de *NcoI* conformado por 734 pb. La segunda banda se observa entre 300 y 200 pb, esta longitud se ajusta al fragmento entre los sitios de corte para *NcoI* y *XhoI* de 214 pb. Los resultados observados se corresponden con el esquema de digestión esperado y, por lo tanto, se puede suponer que la construcción del plásmido recombinante ha sido correcta.

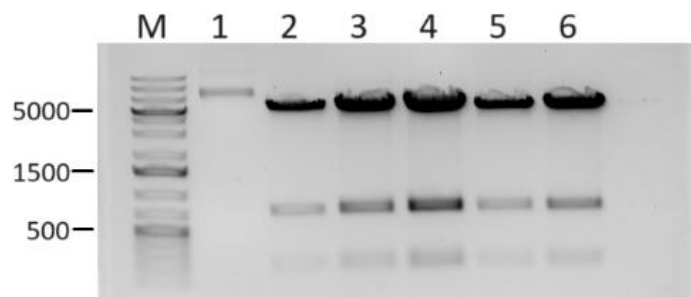


Figura G. Análisis mediante gel de agarosa al 1%. Las calles numeradas del 1 al 6 representan en orden: 1) Vector diluido 1:10; 2,3,4,5 y 6 ADN plasmídico purificado a partir de los cultivos bacterianos tras digestión enzimática con *Xho I* y *Nco I*. M=Marcador de masa molecular de la casa comercial Thermo Scientific™ cuyo tamaño (pares de bases) se indica a la izquierda del gel.

Ensayos de sobreexpresión

En la Figura H.A se observan las muestras, inducidas y no inducidas, obtenidas a partir de los inóculos de las células transformadas con DH5-alpha tras la tinción del gel con Azul de Coomassie. Las cuatro muestras se dividen en un patrón de bandas de diferentes tamaños. Destacan dos bandas más intensas en cada muestra. La primera banda más intensa se encuentra entre 34 y 43 kDa, tamaño, que parece corresponderse con el peso de la proteína recombinante de

interés. La segunda correspondería a un tamaño de proteína entre 43 y 55 kDa. Las dos primeras muestras, a pesar de ser las no inducidas, muestran una mayor señal y por tanto mayor cantidad de proteína que las inducidas. Esto podría deberse o bien a un error en la carga de las muestras, una degradación de la proteína de interés o bien que esta no se sobreexpresa. Otra posibilidad que explicaría este resultado sería la expresión constitutiva del gen. Para descartar que el fallo sea humano se repite el ensayo con las mismas muestras y se obtiene los resultados que se observan en la Figura H.B. Al analizar esta imagen se observa nuevamente la presencia de dos bandas más intensas para cada muestra, con tamaños similares a los obtenidos en la Figura H.A. En esta ocasión no se aprecia una gran diferencia en la intensidad entre muestras no inducidas e inducidas por lo que la hipótesis de la expresión constitutiva parece ser la más acertada, indicando que no se produce sobreexpresión del gen que codifica nuestra proteína recombinante.

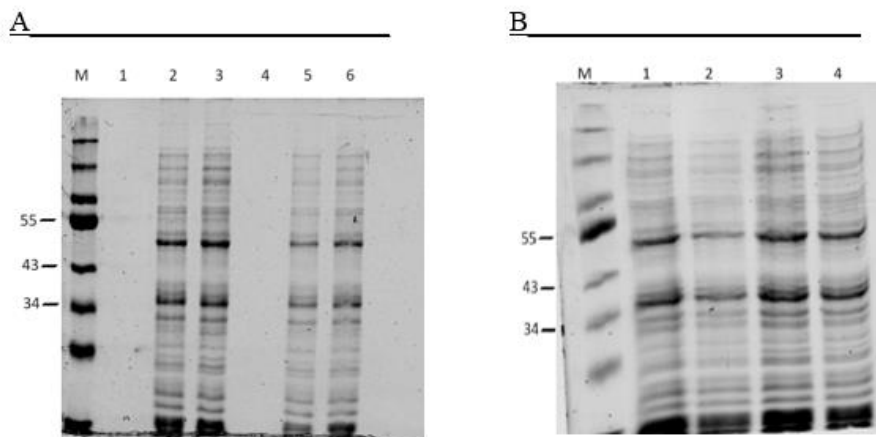


Figura H. Análisis mediante gel de poliacrilamida en presencia de SDS de extractos celulares de la cepa DH5- α que producen la proteína de interés en presencia de inductor: (A) 5 y 6; (B) 2 y 4 o ausencia de este: (A) 2 y 3; (B) 1 y 3.

La Figura I.A. representa el resultado tras la tinción del gel con Azul de Coomassie y el revelado en el escáner Odyssey de las muestras correspondientes a las células transformadas con BL21 tras realizar el ensayo de sobreexpresión con IPTG. Al igual que para los ensayos de la Figura H se observa un claro bandeo para cada muestra en la Figura I. En este caso destaca sobre todo una banda de entre 34 y 43 kDa que presenta una mayor intensidad y que parece ser la banda correspondiente a la proteína de interés. Al igual que en los ensayos anteriores no se observa diferencia entre las bandas de las muestras inducidas y no inducidas lo que apoyaría la hipótesis de una expresión constitutiva. Además, para este ensayo se analizan muestras tras 2 horas de incubación y también tras 4 horas con IPTG, sin embargo, no se observan diferencias significativas entre ellas. Este resultado podría indicar que el tiempo de incubación no afecta al nivel de inducción respaldando nuevamente la hipótesis de una expresión constitutiva.

El análisis mediante el anticuerpo anti-His (Figura I.B) permite confirmar que la proteína deseada es la observada entre los tamaños 34 y 43 kDa. Respecto a la sobreexpresión del gen que produce la proteína de interés, se observa como las muestras no inducidas no aparecen en el revelado. Las

inducidas, aunque sin diferencia entre las inducidas 2 horas y las inducidas 4 horas, dan una señal razonable. Estos hallazgos cuestionan la hipótesis planteada anteriormente sobre la sobreexpresión constitutiva y parecen demostrar que sí se observa sobreexpresión, aunque el tiempo de incubación no es significativo. Los resultados tras la incubación con anti-RHDV que se muestran en la Figura I.C son similares a los obtenidos anteriormente con el anticuerpo anti-HisTag, aunque sí parecen mostrar bandas más intensas sigue sin apreciarse un aumento de la intensidad proporcional al tiempo de incubación con IPTG.

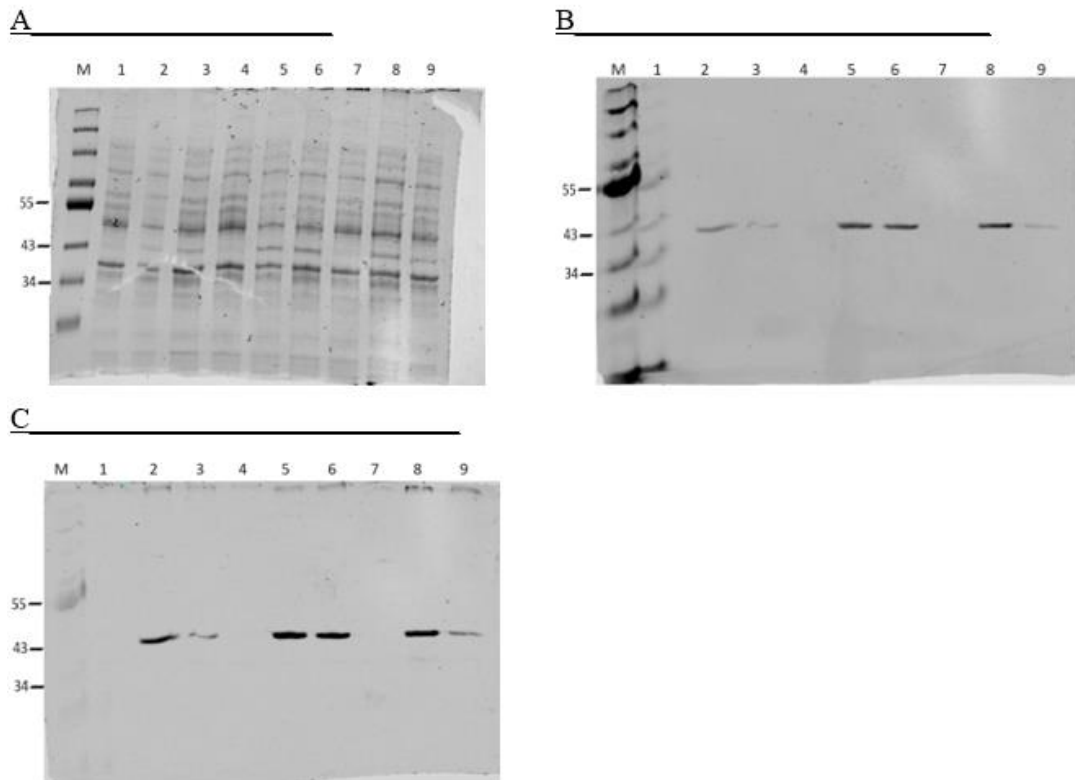


Figura I. Análisis mediante gel de poliacrilamida en presencia de SDS (A) de extractos celulares de la cepa BL21 que producen la proteína de interés en presencia de inductor tras incubación durante 2 horas: calles 2,5 y 8; incubación durante 4 horas: calles 3,6,9 o en ausencia de inductor: calles 1,4 y 7. Las mismas muestras incubadas con un anticuerpo anti-His (B) o con un anticuerpo anti-RHDV (C). M=Marcador de masa molecular de la casa comercial Thermo Scientific™ cuyo tamaño (kDa) se indica a la izquierda de cada gel.

Al analizar los resultados de inducción para ambas cepas, DH5- α (Figura H) y BL21 (Figura I) se puede llegar a la conclusión de que para las células DH5- α no se observa sobreexpresión mientras que para las BL21 sí se obtiene. Esto puede deberse a las características particulares de cada cepa y las mutaciones que presentan. Las células de la línea celular DH5- α son más adecuadas para el proceso de transformación debido a la mutación *recA1* que aporta una alta estabilidad del inserto reduciendo la recombinación homóloga. Además la mutación *endA* reduce la actividad de la endonucleasa I mejorando la calidad del ADN plasmídico [41]. Sin embargo, las células BL21 son más adecuadas para ensayos de sobreexpresión debido a sus características genéticas. Esta cepa de *E. Coli* no contiene la proteasa lon asimismo también es deficiente en la

proteasa de la membrana externa OmpT. La ausencia de estas dos proteasas clave reduce la degradación de las proteínas heterólogas expresadas favoreciendo la sobreexpresión [42].

Transfección en células de insecto Sf9 para producir baculovirus recombinantes P0.

Las micrografías de la Figura J muestran las células de insecto Sf9 72 horas después de la infección. Al compararlas con las células control Figura J.a, se observa como la morfología de la célula cambia debido a la infección viral. Las células infectadas aumentan su tamaño y el núcleo se expande volviéndose más oscuro debido a la poliedrina presente en los baculovirus generados. El control de transfección Figura J.b presenta una apariencia muy similar a las muestras de lo que se deduce que el agente transfectante no tiene efectos nocivos para la viabilidad o la multiplicación celular. Entre las distintas placas Figura F. c, d, e, f. no se observan diferencias significativas y todas parecen presentar el mismo grado de infección.

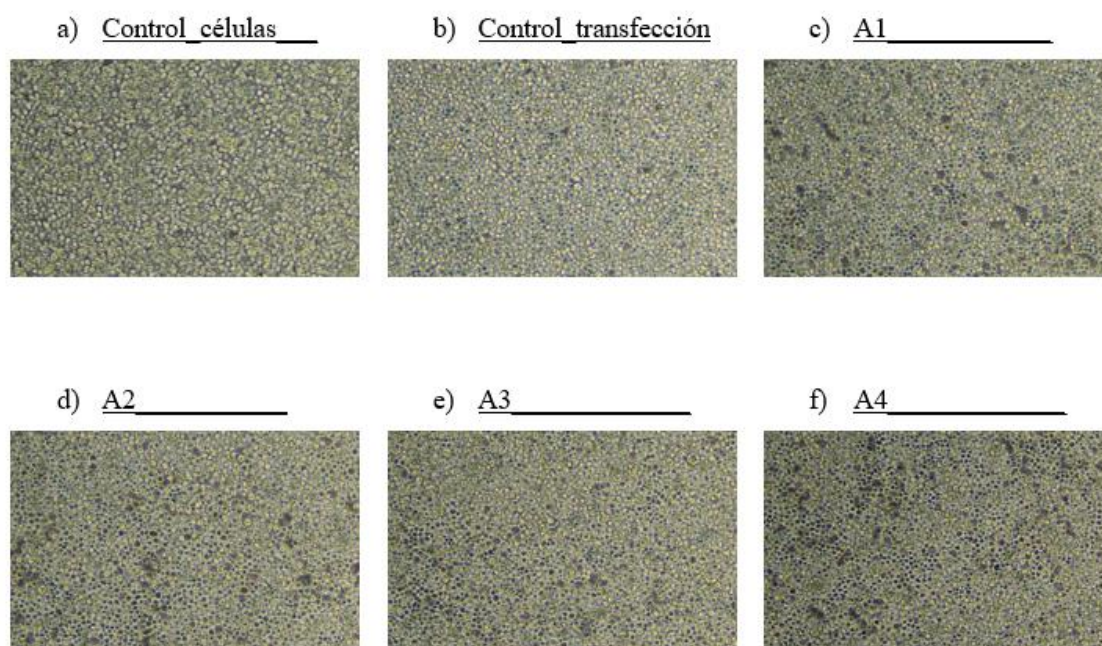


Figura J. Micrografías a 100 aumentos de cultivos de células Sf9 72 horas tras la infección con el baculovirus recombinante.

En la Figura K.A se observa como el Test CERTTEST RHDV + RHDVb da positivo para RHDV clásico. Aunque la intensidad es muy leve sí que se logra apreciar una banda positiva, lo que confirma la presencia de la construcción en las muestras, aunque en cantidades muy bajas.

En el gel teñido con Azul de Coomassie en la Figura K.B se observa un patrón de bandas de diferentes tamaños e intensidades que representan las proteínas presentes en cada muestra. Destacan por su intensidad las bandas comprendidas entre 34 y 43 kDa entre las que se encuentra la proteína de interés. Para identificarla se analizan los resultados de los ensayos *Western Blot*.

Ambos ensayos, utilizando el anticuerpo primario anti-HisTag (Figura K.C) y anti-RHDV (Figura K.D) no dan resultados para el P0. Este resultado es esperable ya que en experimentos similares con otros constructos llevados a cabo en el laboratorio tampoco se obtiene señal en este pase. Esto puede deberse a la baja cantidad de proteína que presentan las muestras que se encontraría por debajo del límite de detección del método. Sin embargo, gracias al test rápido sí que podemos afirmar que la construcción está presente en las muestras y se expresa en células Sf9, lo que puede deberse a una mayor sensibilidad por parte de estos tests. Para intentar aumentar la concentración de proteína de manera que sea visible por medio de estos ensayos se realiza una infección con el sobrenadante de la muestra 4A para intentar lograr una mayor producción de proteína, obteniendo así el P1.

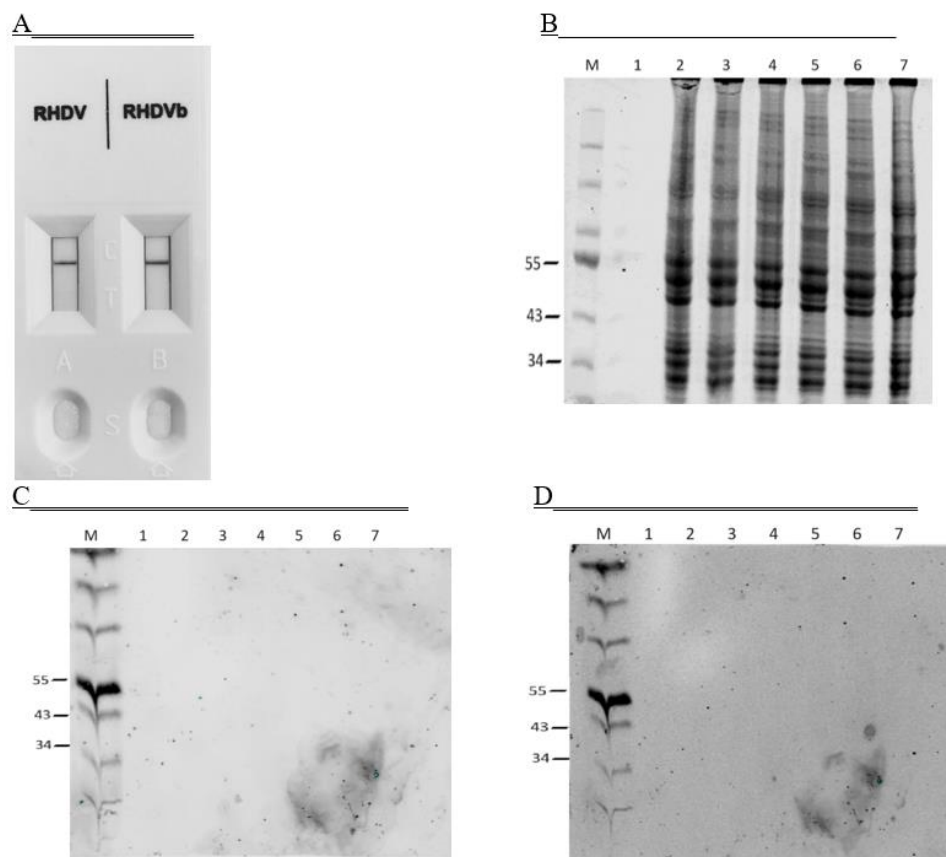


Figura K. Análisis mediante (A) Test CERTEST RHDV + RHDVb (B) gel de poliacrilamida en presencia de SDS de células de insecto Sf9 del pase 0 que producen la proteína de interés a las 72 horas tras la infección. Las mismas muestras incubadas con un anticuerpo anti-His (C) o con un anticuerpo anti-RHDV (D). M=Marcador de masa molecular de la casa comercial Thermo Scientific™ cuyo tamaño (kDa) se indica a la izquierda de cada gel.

Transfección en células de insecto Sf9 para producir baculovirus recombinantes P1.

Las micrografías tomadas tras la infección en P1 de las células de insecto Sf9 a las 72 horas se observan en la Figura L. Se puede observar, al igual que en la primera transfección, un cambio

morfológico en las células infectadas en la figura L. b, c, d, e, f. respecto a las no infectadas en la Figura L.a.

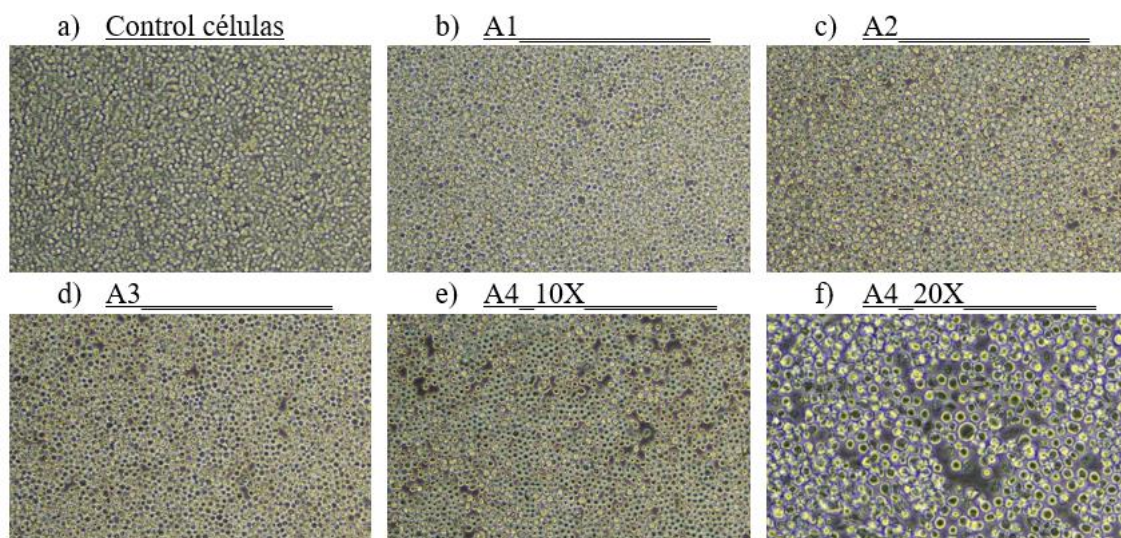


Figura L. Micrografías (a, b, c, d, e) a 100 aumentos (f) 200 aumentos de cultivos de células Sf9 72 horas tras la infección.

Para el resultado del test rápido con la muestra 4A del pase 1 tras la transfección que se muestra en la Figura M.A se observa claramente una banda positiva para RHDV de la versión clásica. El aumento en la intensidad de esta banda respecto al pase 0 de la Figura K.A nos indica un aumento de la concentración de la proteína, y por tanto, debería ser posible observarla mediante el ensayo *Western Blot*. Esto sucede al utilizar el anticuerpo anti-RHDV en la Figura M.D donde se detecta una banda a un peso de 43 kDa aproximadamente. Sin embargo, para el anticuerpo anti-HisTag en la Figura M.C no se logran resultados. La ausencia de banda en este caso puede tratarse en un fallo humano durante la realización del propio Western. Como la misma membrana se utiliza para la incubación con ambos anticuerpos se puede descartar un fallo en la transferencia de la proteína del gel a la membrana. Una hipótesis que podría concordar con estos resultados es que el anticuerpo primario HisTag o el secundario no sean funcionales y la unión a la proteína no tenga lugar. Esta sería una posible explicación para que no emitan señal al ser analizados. Igualmente podemos confirmar la presencia de la proteína tanto por los ensayos de inducción comentados anteriormente como por los obtenidos utilizando el anticuerpo anti-RHDV.

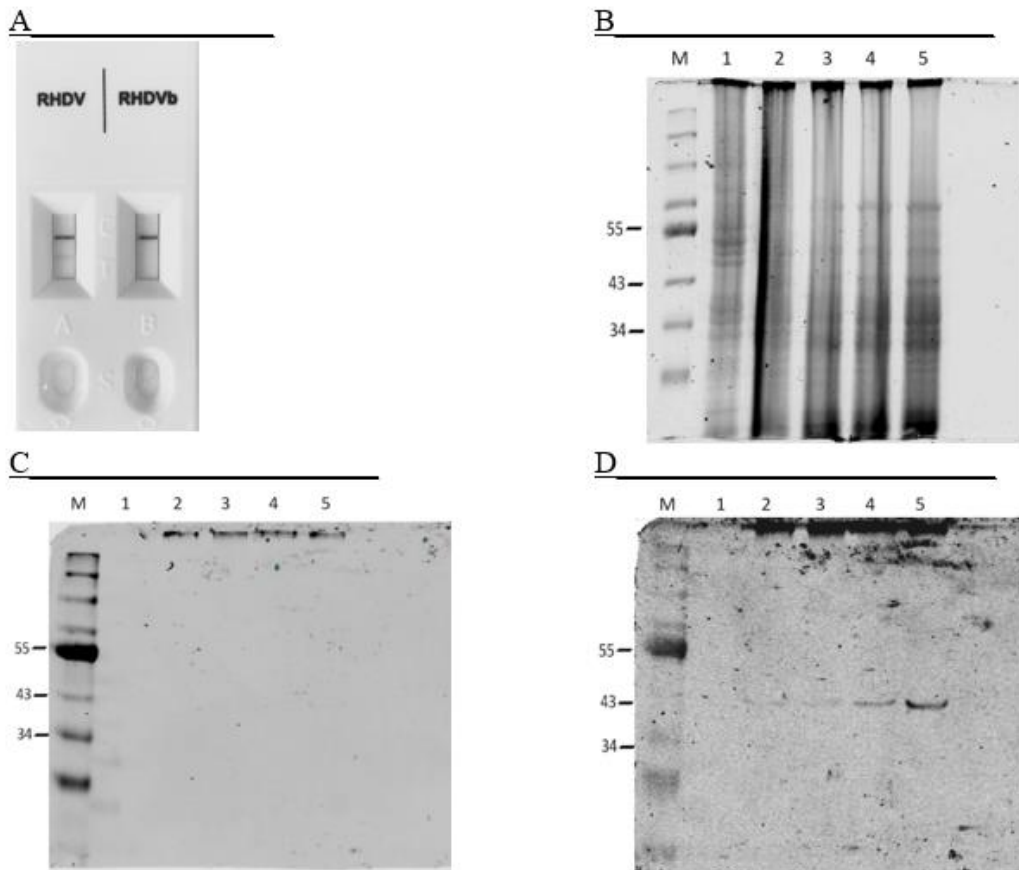


Figura M. Análisis mediante (A) Test CERTEST RHDV + RHDVb (B) gel de poliacrilamida en presencia de SDS de células de insecto Sf9 del P1 que producen la proteína de interés a las 72 horas tras la infección. Las mismas muestras incubadas con un anticuerpo anti-His (C) o con un anticuerpo anti-RHDV (D). M=Marcador de masa molecular de la casa comercial Thermo Scientific™ cuyo tamaño (kDa) se indica a la izquierda de cada gel.

Titulación viral

Una vez confirmada la presencia de la construcción en las muestras se realiza la titulación viral para cuantificar la cantidad de virus presente en las muestras. De esta forma se puede determinar la MOI para que los resultados posteriores sean reproducibles y estandarizar las condiciones experimentales. El resultado de la titulación se observa en la Figura N. A partir del conteo de unidades formadoras de placas del pocillo de dilución 10^{-6} utilizando la formula descrita en la página 11 se obtiene un título viral de $2,0 \cdot 10^7$ ufp/ml, un título bastante elevado y suficiente para utilizar estos baculovirus en la purificación de VLPs.

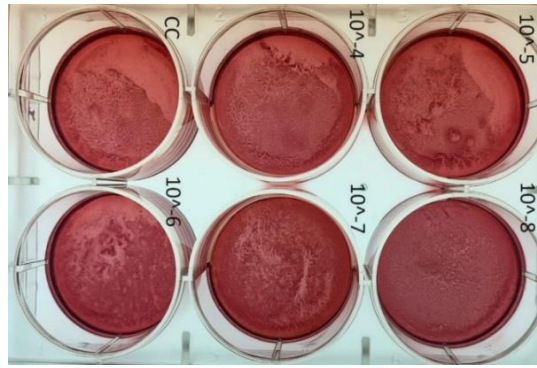


Figura N. Placas resultado de la titulación viral.

Purificación de VLPs a partir de High Five

A partir del título viral obtenido, se infectan las células de la cepa High Five a una MOI de 3. La Figura O muestra las micrografías de las células HF antes Figura O.A y después de la infección Figura O.B. Esta línea celular tiene dos tipos de morfologías muy definidas. Por un lado, hay células que presentan una forma redondeada con el núcleo en posición central mientras que otras son alargadas y el núcleo está desplazado formando una especie de “cabeza”. Un indicativo de que la infección ha sido exitosa es la desaparición de estas dos morfologías pasando a presentar todas las células formas más redondeadas. Además, la mayoría pierden adherencia y pasan a flotar en el medio.

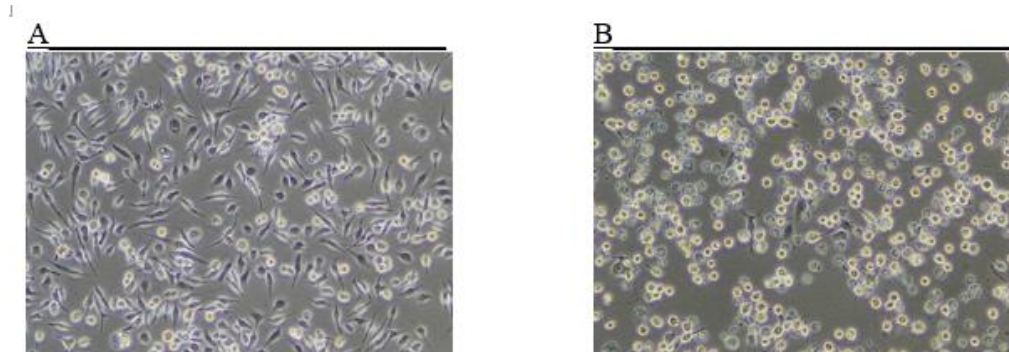


Figura O. Micrografías a 100 aumentos de cultivos de células High Five antes (A) y después de la infección con baculovirus recombinante (B)

El análisis mediante Test CERTTEST RHDV + RHDVb del sobrenadante viral de la Figura P.A da positivo para RHDV clásico al presentar una banda muy clara e intensa. Al observar los resultados de la Figura P.B se aprecian los diferentes patrones de bandas correspondientes a los distintos pasos del proceso de purificación. Primero, las células rotas de la muestra 4AP1 (1) dan un rastro de bandas extenso y muy intenso, esto tendría sentido ya que representaría todas las proteínas presentes en la muestra previa a la purificación, también la presencia de contaminantes podría ocasionar este efecto en el análisis. La fracción del sobrenadante (2) y de la fracción sólida (3) siguen un patrón de bandas similar al de las células rotas, pero presentan una notable

disminución de la intensidad. Esto podría indicar una pérdida de concentración de la proteína de interés en la centrifugación. El sobrenadante tras la ultracentrifugación de la fracción de elución 250mM de imidazol (4) no presenta ninguna banda lo que podría indicar que la ultracentrifugación provoca una pérdida notable en la cantidad de muestra. En el análisis de la fracción tomada de la matriz antes de eluir (5) se observan las proteínas que se han unido a ella. Se recoge también una fracción de la muestra que no se ha unido y como se observa en la calle 7 todavía se pueden apreciar un rastro de bandas, lo que significaría que parte de las VLPs no se han adherido a la columna. Para mejorar este proceso podría dejarse la muestra en la columna en movimiento a 4°C durante varias horas de esta manera se aseguraría una correcta unión y se reduciría la pérdida de la proteína de interés durante el proceso. Las fracciones tras la elución con imidazol 250mM (7) y 500mM (8) no presentan resultados esto podría deberse a que la muestra eluye en fracciones anteriores de menor concentración de imidazol. Para comprobar esta hipótesis se realiza otro ensayo en gel de poliacrilamida en el que se analizan también fracciones de menor concentración los resultados se observan en la Figura P.C. En este ensayo se comprueba como en la elución con imidazol 50mM (3) y en la elución con imidazol 100mM (4) es donde más cantidad de proteína se detecta, siendo la 100mM la más significativa. Para confirmar la presencia de las VLPs en la muestra se realizó un ensayo Western Blot, Figura P.D. Se puede apreciar una banda de proteína de unos 43 kDa para el sobrenadante de la muestra 4AP1 (2), para el sedimento de esta misma muestra, para la fracción de la muestra no pegada a la matriz, indicando la pérdida de proteína en este paso; y para la matriz antes de eluir, donde se detecta la mayor intensidad. Respecto a las eluciones se obtiene una señal muy similar para la elución 50mM de imidazol, para la fracción con 100mM con imidazol y para la fracción con 100mM sin imidazol tras ultracentrifugar, lo que confirma que es en esta última fracción donde se eluye la mayor cantidad de VLPs. Para el resto de fracciones no se obtienen resultados bien porque no hay presencia de las VLPs o porque las cantidades de estas se encuentran por debajo del límite de detección del método. Además, se puede observar una pequeña banda en las calles 3 y 5 a un peso por encima de 34 kDa aproximadamente. Esta podría deberse a procesos proteolíticos que han degradado las muestras produciendo este leve rastro al correr el gel.

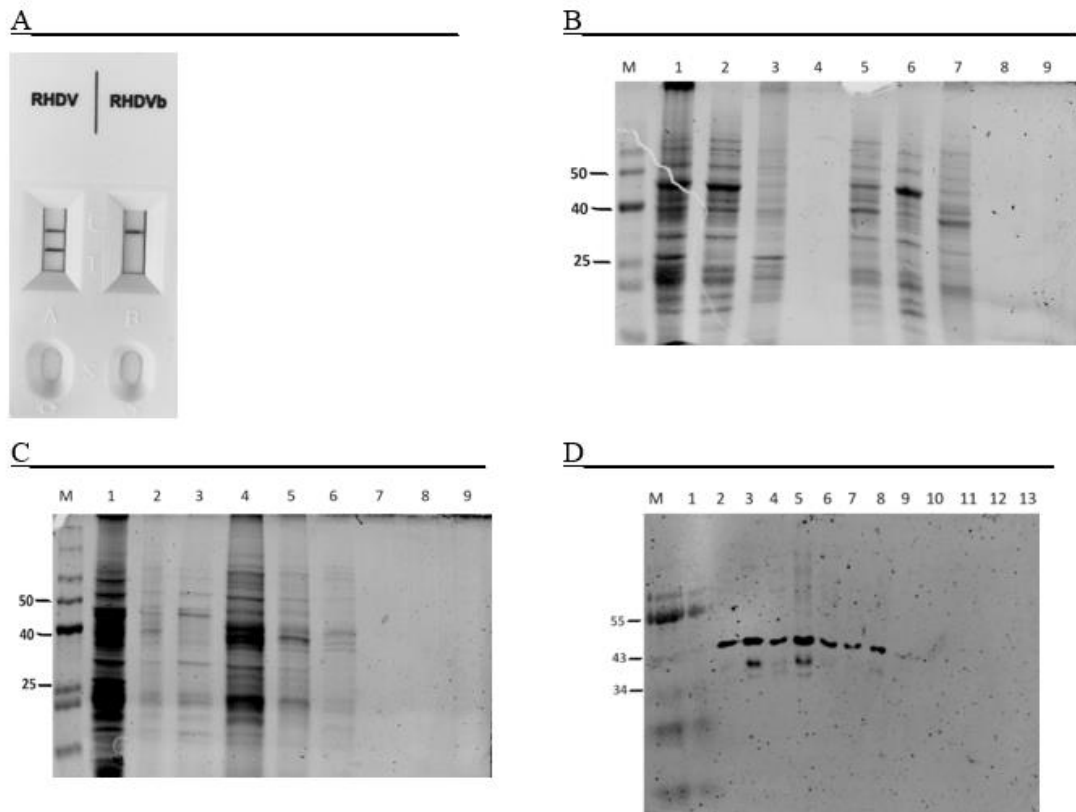


Figura P. Análisis mediante (A) Test CERTEST RHDV + RHDVb (B, C, D) gel de poliacrilamida en presencia de SDS de células de insecto High Five que producen la proteína de interés a las 72 horas tras la infección. (B) Muestras durante las distintas etapas proceso de purificación de VLPs mediante columna de Níquel. En orden: 1. Células rotas de 4API; 2. Sobrenadante 4API; 3. Sedimento 4API; 4. Sobrenadante ultracentrifugación elución 250mM imidazol; 5. Matriz antes de eluir; 6. No pegado; 7. Elución 250mM imidazol; 8. Elución 500mM imidazol; 9. Matriz después de eluir. (B) Muestras durante las distintas etapas del proceso de purificación de VLPs mediante columna de Níquel. En orden: 1. Células rotas 4API; 2. Matriz antes de eluir; 3. Elución 50mM imidazol; 4. Elución 100mM imidazol; 5. Elución 250mM imidazol; 6. Elución 250mM sin imidazol; 7. Elución 500mM; 8. Elución 500mM sin imidazol; 9. Matriz después de eluir. (C) Las mismas muestras incubadas con un anticuerpo anti-RHDV. En orden: 1. Células rotas 4API; 2. Sobrenadante 4API; 3. Sedimento 4API; 4. No pegado; 5. Matriz antes de eluir; 6. Elución 50mM imidazol; 7. Elución 100mM imidazol; 8. Elución 100mM sin imidazol; 9. Elución 250mM imidazol; 10. Elución 250mM sin imidazol; 11. Elución 500mM imidazol; 12. Elución 500mM sin imidazol; 13. Matriz después de eluir. M=Marcador de masa molecular de la casa comercial Thermo Scientific™ cuyo tamaño (kDa) se indica a la izquierda de cada gel.

Reconocimiento de la proteína de interés por suero Anti-Mixoma mediante ensayo *Western Blot*

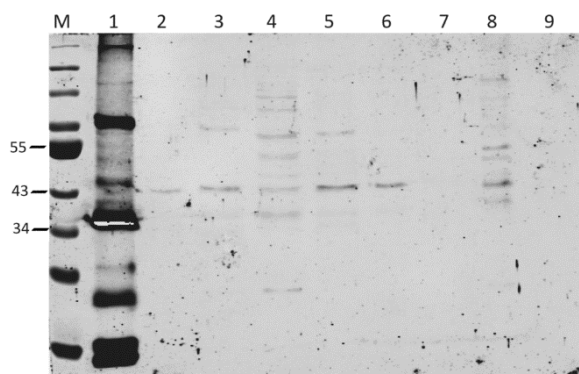


Figura Q. Análisis mediante ensayo *Western Blot* de extractos celulares de la línea celular *High Five* que producen la proteína de interés durante las distintas etapas del proceso de purificación de VLPs mediante columna de Níquel incubadas con un suero anti-Mixoma. En orden: 1. Control positivo; 2. Matriz antes de eluir; 3. Elución 50 mM imidazol; 4. Elución 100 mM imidazol; 5. Elución 100 mM sin imidazol; 6. Elución 250 mM imidazol; 7. Elución 250 mM sin imidazol; 8. Elución 500 mM imidazol; 9. Elución 500 mM sin imidazol. M=Marcador de masa molecular de la casa comercial *Thermo Scientific™* cuyo tamaño (kDa) se indica a la izquierda de cada gel.

Los resultados tras el análisis mediante el ensayo *Western Blot* de los extractos celulares de la línea celular *High Five* que producen la proteína de interés durante las distintas etapas del proceso de purificación de VLPs se observan en la Figura Q. La señal emitida por el control positivo (1) permite verificar la funcionalidad del análisis y el correcto rendimiento de los anticuerpos utilizados. En todas las muestras se aprecia un rastro de bandas exceptuando, la muestra correspondiente a la fracción de elución con 250mM sin imidazol (7) y 500mM sin imidazol (9). Este resultado podría deberse a la pérdida de muestra durante la etapa de ultracentrifugación ya que para las réplicas con imidazol de ambas muestras sí que se observan resultados. Se puede plantear que la ultracentrifugación, aunque sea una etapa necesaria que permite obtener una muestra de mayor pureza, para aquellas fracciones donde la proteína de interés no eluye en grandes cantidades puede suponer una pérdida total de esta. Para las muestras que sí presentan señal se observa una banda de mayor intensidad de aproximadamente un peso de 43 kDa, al comparar este resultado con los obtenidos en la Figura P.D podemos suponer que se trata de la proteína de interés y confirmar que es reconocida por el suero de conejo infectado por MYXV.

5. CONCLUSIÓN

Al comparar los objetivos planteados al comienzo de este Trabajo Fin de Grado con los resultados obtenidos se puede considerar que se ha logrado la construcción de un plásmido funcional capaz de sintetizar la proteína expresada por el gen M102L del MYXV pegada a la subunidad S de la proteína VP1 del RHDV y una cola de histidinas en dos cepas de *E. coli* distintas DH5- α y BL21, así como en células de insecto Sf9 y *High Five*. Respecto a la sobreexpresión del gen que codifica para esta proteína recombinante se ha comprobado que la cepa BL21 es más adecuada para este tipo de ensayo, además, que el tiempo de incubación con inductor no parece ser directamente

proporcional a la sobreexpresión. Por otro lado, se ha logrado la optimización del método de purificación de VLPs mediante columna de níquel obteniendo resultados prometedores. Sería interesante continuar investigando y profundizar en los resultados obtenidos. Por ejemplo, la expresión en células de mamífero en cultivo o la secuenciación del constructo aportaría información valiosa que permitiría completar y afianzar los resultados ya obtenidos. Además, sería necesario comprobar que la proteína recombinante obtenida a través de la columna de verdad genera VLPs, ya que los ensayos realizados han sido en condiciones desnaturizantes. Para ello, se deberían observar mediante microscopía electrónica de transmisión y medir su tamaño mediante la técnica DLS.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. Cameron *et al.*, «The complete DNA sequence of myxoma virus», *Virology*, vol. 264, n.º 2, pp. 298-318, 1999.
- [2] C. Cameron *et al.*, «The Complete DNA Sequence of Myxoma Virus», *Virology*, vol. 264, n.º 2, pp. 298-318, nov. 1999, doi: 10.1006/viro.1999.0001.
- [3] P. J. Chapple y J. C. N. Westwood, «Electron Microscopy of Myxoma Virus», *Nature*, vol. 199, n.º 4889, pp. 199-200, jul. 1963, doi: 10.1038/199199a0.
- [4] «Poxviridae ~ ViralZone». Accedido: 13 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://viralzone.expasy.org/174>
- [5] Fenner F, Ratcliffe F., «Myxomatosis», *University press*, 1965.
- [6] F. Fenner, «Deliberate introduction of the European rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, into Australia», *Rev Sci Tech*, vol. 29, n.º 1, pp. 103-111, abr. 2010, doi: 10.20506/rst.29.1.1964.
- [7] I. D. Marshall y F. Fenner, «Studies in the epidemiology of infectious myxomatosis of rabbits», *Epidemiology & Infection*, vol. 58, n.º 4, pp. 485-488, dic. 1960, doi: 10.1017/S0022172400038614.
- [8] F. J. Fenner, «The Florey Lecture, 1983 - Biological control, as exemplified by smallpox eradication and myxomatosis», *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, vol. 218, n.º 1212, pp. 259-285, ene. 1997, doi: 10.1098/rspb.1983.0039.
- [9] F. Fenner y I. D. Marshall, «A comparison of the virulence for European rabbits (», *Epidemiology & Infection*, vol. 55, n.º 2, pp. 149-191, jun. 1957, doi: 10.1017/S0022172400037098.
- [10] «CHANGES IN THE VIRULENCE AND ANTIGENIC STRUCTURE OF STRAINS OF MYXOMA VIRUS RECOVERED FROM AUSTRALIAN WILD RABBITS BETWEEN 1950 AND 1964 - Fenner - 1965 - Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science - Wiley Online Library». Accedido: 13 de mayo de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/icb.1965.69>
- [11] S. A. M. Saari, E. Rudbäck, M. Niskanen, P. Syrjälä, M. Nylund, y M. Anttila, «Contagious mucocutaneous dermatitis of the mountain hare (*Lepus timidus*): pathology and cause», *J Wildl Dis*, vol. 41, n.º 4, pp. 775-782, oct. 2005, doi: 10.7589/0090-3558-41.4.775.
- [12] B. Spiesschaert, G. McFadden, K. Hermans, H. Nauwynck, y G. R. Van de Walle, «The current status and future directions of myxoma virus, a master in immune evasion», *Veterinary research*, vol. 42, pp. 1-18, 2011.
- [13] C. Rosas *et al.*, «Evaluation of a vectored equine herpesvirus type 1 (EHV-1) vaccine expressing H3 haemagglutinin in the protection of dogs against canine influenza», *Vaccine*, vol. 26, n.º 19, pp. 2335-2343, may 2008, doi: 10.1016/j.vaccine.2008.02.064.
- [14] C. T. Rosas, B. K. Tischer, G. A. Perkins, B. Wagner, L. B. Goodman, y N. Osterrieder, «Live-attenuated recombinant equine herpesvirus type 1 (EHV-1) induces a neutralizing antibody response against West Nile virus (WNV)», *Virus Res*, vol. 125, n.º 1, pp. 69-78, abr. 2007, doi: 10.1016/j.virusres.2006.12.009.
- [15] G. R. Van de Walle, M. A. May, S. T. Peters, S. M. Metzger, C. T. Rosas, y N. Osterrieder, «A vectored equine herpesvirus type 1 (EHV-1) vaccine elicits protective immune responses against EHV-1 and H3N8 equine influenza virus», *Vaccine*, vol. 28, n.º 4, pp. 1048-1055, ene. 2010, doi: 10.1016/j.vaccine.2009.10.123.
- [16] B. Sodeik y J. Krijnse-Locker, «Assembly of vaccinia virus revisited: de novo membrane synthesis or acquisition from the host?», *Trends in Microbiology*, vol. 10, n.º 1, pp. 15-24, ene. 2002, doi: 10.1016/S0966-842X(01)02256-9.
- [17] R. Blasco y B. Moss, «Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein», *Journal of Virology*, vol. 65, n.º 11, pp. 5910-5920, nov. 1991, doi: 10.1128/jvi.65.11.5910-5920.1991.
- [18] B. Unger y P. Traktman, «Vaccinia Virus Morphogenesis: A13 Phosphoprotein Is Required for Assembly of Mature Virions», *Journal of Virology*, vol. 78, n.º 16, pp. 8885-8901, ago. 2004, doi: 10.1128/jvi.78.16.8885-8901.2004.
- [19] P. Traktman y B. Unger, *Biogenesis of the Vaccinia Virus membrane: insights into the role of the A13L phosphoprotein*. 2000.
- [20] T. Salmons *et al.*, «Vaccinia virus membrane proteins p8 and p16 are cotranslationally inserted into the rough endoplasmic reticulum and retained in the intermediate compartment», *Journal of Virology*, vol. 71, n.º 10, pp. 7404-7420, oct. 1997, doi: 10.1128/jvi.71.10.7404-7420.1997.
- [21] D. J. Pulford, H. Meyer, y D. Ulaeto, «Orthologs of the vaccinia A13L and A36R virion membrane protein genes display diversity in species of the genus Orthopoxvirus», *Arch. Virol.*, vol. 147, n.º 5, pp. 995-1015, may 2002, doi: 10.1007/s00705-001-0777-z.
- [22] T. G. Senkevich, B. M. Ward, y B. Moss, «Vaccinia Virus A28L Gene Encodes an Essential Protein Component of the Virion Membrane with Intramolecular Disulfide Bonds Formed by the Viral Cytoplasmic Redox Pathway», *Journal of Virology*, vol. 78, n.º 5, pp. 2348-2356, mar. 2004, doi: 10.1128/jvi.78.5.2348-2356.2004.
- [23] T. G. Senkevich, B. M. Ward, y B. Moss, «Vaccinia Virus Entry into Cells Is Dependent on a Virion Surface Protein Encoded by the A28L Gene», *Journal of Virology*, vol. 78, n.º 5, pp. 2357-2366, mar. 2004, doi: 10.1128/jvi.78.5.2357-2366.2004.

- [24] E. Rivera-de-Torre *et al.*, «Strategies for Heterologous Expression, Synthesis, and Purification of Animal Venom Toxins», *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, ene. 2022, doi: 10.3389/fbioe.2021.811905.
- [25] H. M. Amer, «Baculovirus expression vector system: An efficient tool for the production of heterologous recombinant proteins», *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, n.º 32, Art. n.º 32, 2011.
- [26] I. Hunt, «From gene to protein: a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression», *Protein Expression and Purification*, vol. 40, n.º 1, pp. 1-22, mar. 2005, doi: 10.1016/j.pep.2004.10.018.
- [27] M. Bleckmann *et al.*, «Identification of Essential Genetic Baculoviral Elements for Recombinant Protein Expression by Transactivation in Sf21 Insect Cells», *PLOS ONE*, vol. 11, n.º 3, p. e0149424, mar. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0149424.
- [28] «A novel baculovirus-derived promoter with high activity in the baculovirus expression system [PeerJ]». Accedido: 28 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://peerj.com/articles/2183/>
- [29] M. Kong *et al.*, «The interaction between baculoviruses and their insect hosts», *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 83, pp. 114-123, jun. 2018, doi: 10.1016/j.dci.2018.01.019.
- [30] F. Krammer, T. Schinko, D. Palmberger, C. Tauer, P. Messner, y R. Grabherr, «Trichoplusia ni cells (High Five™) are highly efficient for the production of influenza A virus-like particles: a comparison of two insect cell lines as production platforms for influenza vaccines», *Mol Biotechnol*, vol. 45, n.º 3, pp. 226-234, jul. 2010, doi: 10.1007/s12033-010-9268-3.
- [31] M. Hong *et al.*, «Genetic engineering of baculovirus-insect cell system to improve protein production», *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 10, sep. 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.994743.
- [32] N. Kushnir, S. J. Streatfield, y V. Yusibov, «Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development», *Vaccine*, vol. 31, n.º 1, pp. 58-83, dic. 2012, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.083.
- [33] R. D. Possee, A. C. Chambers, L. P. Graves, M. Aksular, y L. A. King, «Recent Developments in the Use of Baculovirus Expression Vectors», *Current Issues in Molecular Biology*, pp. 215-230, 2020, doi: 10.21775/cimb.034.215.
- [34] C. for B. E. and Research, «ENGERIX-B», *FDA*, oct. 2023, Accedido: 22 de abril de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/engerix-b>
- [35] Merck and Co, Inc., «RECOMBIVAX HB®»
- [36] GlaxoSmithKline, «Cervarix»
- [37] Merck & Co., «Gardasil®»
- [38] K. Karste, M. Bleckmann, y J. van den Heuvel, «Not Limited to E. coli: Versatile Expression Vectors for Mammalian Protein Expression», en *Heterologous Gene Expression in E.coli: Methods and Protocols*, N. A. Burgess-Brown, Ed., New York, NY: Springer, 2017, pp. 313-324. doi: 10.1007/978-1-4939-6887-9_20.
- [39] «pTriEx™-1.1 DNA - Novagen | 70840». Accedido: 10 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/pTriEx-1.1-DNA-Novagen,EMD_BIO-70840?bd=1#anchor_CITATION
- [40] U. K. Laemmli, «Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4», *Nature*, vol. 227, n.º 5259, pp. 680-685, ago. 1970, doi: 10.1038/227680a0.
- [41] «DH5α Competent Cells - ES». Accedido: 30 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/competent-cells-strains/dh5a-competent-cells.html>
- [42] «BL21(DE3) Competent Cells». Accedido: 30 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/es/en/EC0114>