

**Título:** Producción de antígenos recombinantes y desarrollo de un método serológico para la detección de encefalitis virales de importancia local

**Integrantes:** Lorch, Matías Sebastián; Pubul, Martín Priscila; Varchavsky, Ivana

**Resumen:** En cuanto a los objetivos específicos, este primer año se centró en el primero de ellos: Producir en forma recombinante los epítopes inmunogénicos identificados para la proteína NS1 de SLEV. En primer término se diseñaron los oligonucleótidos para generar los insertos que contienen los epítopes inmunogénicos para células B predichos anteriormente. Al realizar la predicción inmunobioinformática para la secuencia proteica de NS1 de WNV, pudo observarse un elevado grado de similitud con lo evidenciado experimentalmente (Sun et al., 2012; Volpina et al., 2005). De la misma forma, se realizó la predicción sobre la secuencia de esta proteína de SLEV. Pudo verse que para la mayoría de los epítopes predichos se encuentran en la misma región que los señalados anteriormente para WNV, presentando en algunos de los casos una región más amplia involucrada. De todas formas, es posible encontrarnos con una co-localización de los epítopes, ya que las proteínas NS1 de ambos virus presentan un alto grado de homología, y perfiles similares de hidrofobicidad, por lo que las secuencias o zonas con mayor probabilidad de exposición hacia la superficie se mantienen en ambas. Por tanto, para SLEV se ha determinado la presencia de 8 epítopes, enumerados de 1 a 8. Para la amplificación y el clonado, los epítopes fueron agrupados de la siguiente manera: A. E1-E2-E3, B. E4-E5-E6 y C. E7-E8 . Para realizar la amplificación de los tres conjuntos de epítopes, se diseñaron primers solapantes. Es decir, los epítopes E1, E2 y E3 se amplificaron a partir de dos oligonucleótidos que presentan un solapamiento de 30 nucleótidos en la zona central. Además de las secuencias específicas que abarcan el rango de los epítopes señalados previamente, entre cada una de ellas se colocó una secuencia linker que codifica para 3 glicinas, siguiendo una estrategia publicada por Ravulapalli et al. (2005). Por otro lado, tanto en el extremo 5' como en el 3' de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de la región que codifica para los epítopes, se agregaron sitios de restricción que permitirán el clonado en el vector de expresión, ya sea como bloque de secuencias únicas, o combinados (por ejemplo: E1-E2-E3 más E4-E5-E6 o más E7-E8). De esta forma, es posible generar una serie de proteínas recombinantes conteniendo varias combinaciones de epítopes para estudiar cual es la combinación que maximiza la detección específica y diferencial de los virus en cada uno de los sueros testigo utilizados.

Una vez que se obtuvieron los primers señalados previamente, se procedió a la síntesis de cada uno de los fragmentos. Para ello, el par de oligonucleótidos fue ensamblado mediante extensión enzimática de ambos extremos (PCA, por Polymerase Cycling Assembly). En esta técnica, no se realiza amplificación, ya que no se emplean primers de los extremos, sino que una vez que ambos oligonucleótidos son agregados, la ADN Taq Polimerasa realiza la extensión de todos los híbridos que se formen, obteniéndose el producto en un solo paso. Se determinó la integridad y concentración de cada fragmento mediante electroforesis en gel de agarosa, y se los purificó mediante kits comerciales. Cada fragmento fue insertado en un vector de clonado y el análisis de

los clones recombinantes se realizó mediante el empleo de endonucleasas de restricción y PCR de colonias, verificando su integridad por secuenciamiento nucleotídico. Los clones de las distintas construcciones presentaron lecturas erróneas en ambos extremos. Los diferentes procedimientos experimentales fueron repetidos arribando a los mismos resultados. Aparentemente, hubo un error en la síntesis de los oligonucleótidos, por lo que, además de iniciar los reclamos a la empresa proveedora, se obtuvieron los fragmentos seleccionados previamente por medio de síntesis química, ya clonados en el vector pUC19. Actualmente, estos fragmentos están siendo transferidos al vector de expresión pQE30, lo que permitirá iniciar los ensayos de expresión.

Por otro lado, como se indicó previamente, se han expresado y purificado en condiciones desnaturizantes las proteínas NS1-HT\_SLEV y NS1-HT\_WNV. La primera aproximación a la identificación diferencial de las proteínas NS1 de ambos virus fue realizada mediante un Western blotting, empleando un suero obtenido del líquido ascítico de un ratón que fue inoculado con la cepa CbaAr-4005 de SLEV. En este experimento fue posible detectar la proteína NS1-HT\_SLEV, y no se detectó señal que indicara la presencia de la proteína NS1-HT\_WNV. En cambio cuando en el ensayo de Western blot se utilizó un suero policlonal que reconoce la cola de histidinas ( $\alpha$ -HT), se detectaron las proteínas NS1 de ambos virus.

Posteriormente, se iniciaron los estudios para preparar enzoinmunoensayos (EIEs) basados en los antígenos completos. Para ello, se utilizaron multiplacas de 96 pocillos, sobre las que se adhirieron 2  $\mu$ g de antígeno por pocillo (10  $\mu$ g/ml). Se utilizaron dos antisueros control, uno específico para WNV ( $\alpha$ -Tauro) y el otro específico para SLEV ( $\alpha$ -Ulloque). En cada placa (8 filas) se utilizaron 4 filas para adherir la proteína NS1-HTWNV como antígeno y 4 filas para adherir la proteína NS1-HTSLEV como antígeno. A su vez, de las 4 filas de cada antígeno, 2 se trataron con el suero específico, y otras dos con el suero cruzado. Es decir, para las 4 filas de NS1-HTSLEV, dos fueron tratadas con el suero específico  $\alpha$ -Ulloque, y las otras dos con el suero específico para WNV  $\alpha$ -Tauro. Los antisueros fueron agregados en diluciones seriadas al medio en diferentes columnas de la placa comenzando en una dilución de 1/200 del original. Lamentablemente, no fue posible detectar adecuadamente cada una de las proteínas utilizadas como antígenos por medio de estos ensayos, ya que todos los puntos presentaban una lectura de DO similar. Es probable que este resultado sea consecuencia de la naturaleza del antígeno utilizado. Las proteínas NS1 completas de ambos virus se obtienen en forma insoluble, y se utiliza un buffer que contiene una concentración necesaria de urea (BU) para mantenerla en su forma desplegada. Por ello, al realizar la dilución de la misma en el buffer Carbonato/Bicarbonato pH 9 (BCB) que se utiliza en el proceso de adhesión, la urea se diluye drásticamente. Teniendo en cuenta que la proteína recombinante se agregó en una concentración de 300  $\mu$ g/ml (NS1-HTWNV), se obtuvo una proporción de 70% de BCB y 30% BU. Esta disminución abrupta de BU puede haber contribuido a un plegado aberrante del antígeno, y una adhesión inferior en la multiplaca. Por ello, se decidió optimizar la proporción de BCB/BU que garantice la detección de la proteína adherida en la placa utilizando el antisuero control. Los ensayos se realizaron utilizando el antígeno NS1-HTWNV. Se

ensayaron diferentes proporciones de BCB/BU: 25%/75%; 50%/50%; y la probada inicialmente 70%/30%. Los mejores resultados se obtuvieron cuando la adhesión se realizó en la proporción de BCB/BU 25%/75%. A partir de este resultado, se ensayaron diferentes proporciones alrededor de este número: 40%/60%; 25%/75% y 15%/85%. Para estas últimas, no hubo diferencias significativas, por lo que se decidió seguir optimizando el ensayo con la condición de 25% BCB y 75% BU. Actualmente, hemos iniciado un nuevo ensayo de producción y purificación de los antígenos, de manera tal de obtener una masa suficiente para continuar con la optimización de los EIEs. En el futuro, la producción de los antígenos será escalada y optimizadas utilizando un fermentador.

En la próxima etapa se optimizará la expresión de las proteínas recombinantes conteniendo diferentes combinaciones de los epítopes de las proteínas NS1 de ambos virus. Además, mediante una pasantía en el Laboratorio de Arbovirus del Instituto de Virología (InViV) de la UNC, dirigido por la Dra. Marta Contigiani, se realizarán análisis más exhaustivo de los antígenos producidos y adheridos a las placas, utilizando un panel más complejo y completo de los sueros almacenados en la colección que poseen en este laboratorio. Por último, estos ensayos nos permitirán comparar la detección de los sueros con el método Gold Estándar empleado actualmente para la detección de estos agentes patógenos.

Sun, E et al. PLoS ONE 7(2): e31434. 2012.

Volpina, O.M. et al. Virus Research 112: 95-99. 2005.

Ruvapalli, A.R. et al. Protein Express Purif. 41:136-147. 2005.

.