

Tesis de Licenciatura

Expresión de la poliproteína Gag del Virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV) utilizando el sistema eucariótico del virus vaccinia : Mutagénesis del dominio Matriz

Del Pilar Celma, Cristina Cecilia

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Del Pilar Celma, Cristina Cecilia. (). Expresión de la poliproteína Gag del Virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV) utilizando el sistema eucariótico del virus vaccinia : Mutagénesis del dominio Matriz. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000608_DelPilarCelma

Cita tipo Chicago:

Del Pilar Celma, Cristina Cecilia. "Expresión de la poliproteína Gag del Virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV) utilizando el sistema eucariótico del virus vaccinia : Mutagénesis del dominio Matriz". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .

http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000608_DelPilarCelma

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES (UBA)
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES (FCEN)
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS DE LICENCIATURA

**EXPRESIÓN DE LA POLIPROTEÍNA GAG DEL VIRUS DE
INMUNODEFICIENCIA DE FELINOS (FIV)
UTILIZANDO EL SISTEMA EUCARIÓTICO DEL VIRUS VACCINIA.
MUTAGÉNESIS DEL DOMINIO MATRIZ**

AUTORA: CRISTINA CECILIA DEL PILAR CELMA

DIRECTOR: DR. JOSÉ LUIS AFFRANCHINO

LUGAR DE TRABAJO: CENTRO DE VIROLOGÍA ANIMAL (CEVAN)-CONICET

COORDINADOR: DR. NORBERTO IUSEM

FECHA: JULIO – 1998

1061

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis Affranchino y Dra. Silvia Gonzalez por su paciencia, disposición y por haberme guiado generosamente en mis primeros pasos en la investigación.

Al Dr. José La Torre por permitirme llevar a cabo este trabajo en el Centro de Virología Animal, el cual dirige.

A mi familia por el apoyo incondicional.

A mis amigas y en especial a Gustavo por su presencia permanente.

INDICE

RESUMEN

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

I.- RETROVIRUS	1
I.1.- ORGANIZACIÓN GENÓMICA	1
I.2.- CICLO DE VIDA	2
II.- LENTIVIRUS	3
II.1.- CLASIFICACIÓN	3
II.2.- ORGANIZACIÓN GENÓMICA	3
II.3.- ESTRUCTURA DEL VIRIÓN	4
II.4.- ENSAMBLADO	6
III.- VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA DE FELINOS (FIV)	7

OBJETIVOS	9
------------------	---

MATERIALES Y MÉTODOS

I.- OBTENCIÓN DEL FRAGMENTO <i>gag-PR</i> DE FIV	10
II.- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA POR PCR ASIMÉTRICO	11
III.- LIGACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR AL PLÁSMIDO PMJ601	13
IV.- TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES <i>Escherichia coli</i>	13
V.- PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO	13
VI.- SECUENCIACIÓN POR EL MÉTODO DE SANGER	14
VII.-CÉLULAS Y VIRUS	15
VIII.- TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CV-1	15
IX.- SELECCIÓN DE LOS VIRUS VACCINIA RECOMBINANTES	16
X.- MARCACIÓN METABÓLICA	16
XI.- PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS SEUDOVIRALES	17
XII.- INMUNOPRECIPITACIÓN Y ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO	17

RESULTADOS

I.-	AMPLIFICACIÓN Y CLONADO DE LOS GENES <i>gag-PR</i> DE FIV	18
II.-	ANÁLISIS DE LA TRANSFORMACIÓN CON LA MEZCLA DE LIGACIÓN	19
III.-	ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA PROTEÍNA MA DE FIV	20
IV.-	MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA PROTEÍNA MA DE FIV	22
V.-	ANÁLISIS DE LA TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS <i>E. coli</i> COMPETENTES CON LAS MEZCLAS DE LIGACIÓN DE LOS FRAGMENTOS MUTADOS AL VECTOR PMJ601	24
VI.-	SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS MUTADOS	25
VII.-	CONSTRUCCIÓN DE LOS VIRUS VACCINIA RECOMBINANTES PORTADORES DE LOS GENES <i>gag-PR</i> , MA-1, MA-2 O MA-3 DE FIV	26
VIII.-	SELECCIÓN DE LOS VIRUS VACCINIA RECOMBINANTES	28
IX.-	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GAG DE FIV EN EL SISTEMA DEL VIRUS VACCINIA	29
X.-	EFEECTO DE LAS MUTACIONES MA-1, MA-2 Y MA-3 SOBRE EL ENSAMBLADO DEL PRECURSOR GAG DE FIV	31

DISCUSIÓN	33
------------------	-----------

BIBLIOGRAFÍA	35
---------------------	-----------

RESUMEN

El virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV), miembro de la Familia Retroviridae, causa en sus huéspedes (gatos, pumas, leones) una enfermedad similar al SIDA de humanos. El genoma de FIV está formado por los genes *gag*, *pol* y *env*. El gen *gag* se localiza en el extremo 5' del genoma y codifica para un precursor poliproteico Gag. Este precursor es clivado por la proteasa viral (PR) para dar las proteínas matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC).

Un aspecto fundamental del ciclo de replicación de FIV como es el ensamblado de Gag en partículas virales no ha sido estudiado aún. El desarrollo de este tema contribuirá al conocimiento de cómo han evolucionado los mecanismos de morfogénesis en los virus de inmunodeficiencia. Por lo tanto nos propusimos, por un lado, construir un virus vaccinia recombinante que dirija la síntesis, procesamiento, transporte y ensamblado del precursor Gag en partículas virales y, por el otro, comenzar con el estudio del rol de la proteína matriz en el ensamblado de FIV a través de la mutagénesis dirigida del gen que codifica para esta proteína.

Como primer paso se construyó un virus vaccinia recombinante portador del gen *gag* y de la región PR del gen *pol* de FIV. Esta construcción permitió expresar eficientemente en células de mamífero el precursor Gag de FIV. Tanto el precursor Gag como sus productos de clivaje MA y CA pudieron ser detectados en la fracción particulada purificada a partir del medio de cultivo de células de mamífero infectadas con el virus vaccinia recombinante, lo cual sugiere que el precursor Gag de FIV producido utilizando este sistema resultó capaz de ensamblarse en partículas que son liberadas al medio extracelular.

Posteriormente se introdujeron mutaciones en regiones específicas de la proteína MA de FIV. Estas regiones incluían dos zonas de carácter hidrofóbico y una de carácter básico en la región amino-terminal de la proteína. La mutación que afectó la zona de carácter básico provocó una inhibición total en la producción de partículas, mientras que las mutaciones en las dos regiones hidrofóbicas provocaron una inhibición significativa de este proceso. Por lo tanto los resultados obtenidos sugieren que estas regiones están involucradas en el proceso de ensamblado ya que los cambios introducidos afectaron la formación de partículas.

Abreviaturas utilizadas en este trabajo:

• ADN	ácido desoxirribonucleico
• ARN	ácido ribonucleico
• ARN _t	ácido ribonucleico de transferencia
• BSA	seroalbúmina bovina
• D-MEM	modificación de Dulbecco del medio mínimo esencial de Eagle
• dNTP	deoxinucleótido trifosfato
• ddNTP	dideoxinucleótido trifosfato
• DTT	ditiotreitól
• EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
• Kb	mil pares de bases
• KDa	mil daltons
• LB	medio Luria-Bertani
• NP40	nonidet P-40
• PBS	buffer fosfato salino
• PCR	reacción en cadena de la polimerasa
• PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonilo
• SDS	dodecil sulfato de sodio
• Tris	2 amino-2 hidroximetil-1,3 propanodiol
• UFP	unidades formadoras de placas
• X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

INTRODUCCIÓN

I.- RETROVIRUS

Los retrovirus son virus con envoltura lipídica y con un genoma formado por dos moléculas de ARN simple cadena. En las células infectadas la transcriptasa reversa viral copia el ARN en ADN doble cadena el cual se integra como provirus en el genoma de la célula huésped.

I.1- ORGANIZACIÓN GENÓMICA

El genoma de todos los retrovirus está formado por los genes *gag*, *pol* y *env* (Fig.1). El gen *gag* se localiza en el extremo 5' del genoma y codifica para un precursor poliproteico Gag. Este precursor es clivado por la proteasa viral para dar las proteínas matriz (MA), cápside (CA) y nucleocápside (NC). En algunos retrovirus, el procesamiento proteolítico de Gag da origen a polipéptidos de bajo peso molecular adicionales.

El gen *pol* codifica para la proteasa viral (PR), responsable del clivaje de las poliproteínas Gag y Gag-Pol, y para dos proteínas necesarias para las primeras etapas de la infección, la transcriptasa reversa (TR) y la integrasa (IN). La primera permite el pasaje del ARN genómico a ADN doble cadena, mientras que la segunda permite su integración al genoma de la célula huésped. La región *pol* se transcribe generalmente como un mensajero único junto con *gag*.

La región *env* codifica para la glicoproteína de envoltura del virus (Env). La glicoproteína Env está formada por dos subunidades: la subunidad de superficie (SU) responsable de la unión del virus al receptor celular y la subunidad transmembrana (TM) que media la fusión de la membrana viral con la celular durante la infección.

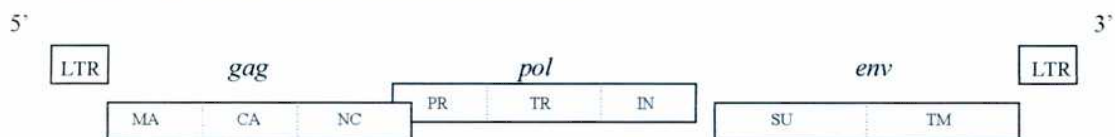


Figura 1. Organización genómica de los retrovirus. Las regiones LTR son elementos de regulación de la transcripción y parecen tener un rol importante en la integración del genoma viral. El gen *gag* codifica para las proteínas estructurales, la región *pol* contiene la información para las enzimas virales y el gen *env* codifica para la glicoproteína de la envoltura viral.

1.2- CICLO DE VIDA

El ciclo replicativo de los retrovirus es un proceso muy complejo. Luego de la entrada del “core” del virión al citoplasma de la célula infectada se sintetiza el ADN doble cadena a partir del ARN genómico viral; posteriormente se transfiere el llamado complejo de preintegración al núcleo donde el ADN se integra al genoma celular. Estos eventos están mediados por las enzimas virales transcriptasa reversa e integrasa.

En una etapa posterior se produce la síntesis y procesamiento de mensajeros virales, producción de proteínas virales y síntesis del ARN genómico. Finalmente, ocurre el ensamblado del virión. En la membrana plasmática de la célula infectada se produce la interacción de las proteínas Gag, Gag-Pol y Env, que resulta en el ensamblado de partículas que encapsidan al ARN genómico.

Por último, ocurre la liberación del virión por brotación y la maduración de la partícula por el procesamiento proteolítico de los precursores Gag y Gag-Pol.⁽¹⁾ (Fig. 2)

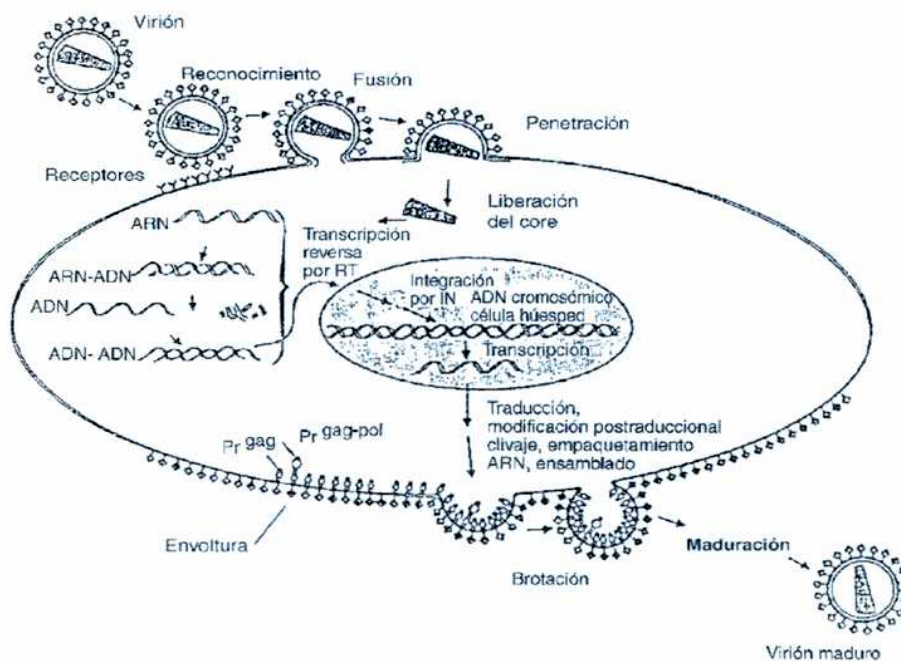


Figura 2 Representación esquemática del ciclo de vida de los retrovirus.

II.- LENTIVIRUS

Los lentivirus son un género importante dentro de la familia *Retroviridae* que producen una infección persistente y enfermedades crónicas debilitantes que comprometen al sistema inmune. Este grupo cobró especial importancia cuando en 1983 se aisló el virus de inmunodeficiencia de humanos (HIV) y se comprobó que era el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

II.1-CLASIFICACIÓN

Basándose en su tropismo celular y en las manifestaciones clínicas de las enfermedades que producen, los lentivirus se dividen en dos grupos:

- Virus que causan inmunodeficiencia e infectan linfocitos T y células de la línea monocitos/macrófagos entre los cuales se encuentran los virus de humanos HIV-1 y HIV-2, de simios (SIV), de felinos (FIV) y de bovinos (BIV).
- Virus que causan enfermedades específicas en distintos órganos mediadas por el sistema inmune⁽²⁾, como el virus Maedi-visna y el de artritis-encefalitis caprina (CAEV).

II.2- ORGANIZACIÓN GENÓMICA

El genoma de los lentivirus, como el del resto de los retrovirus, codifica para los productos de los genes *gag*, *pol* y *env* (Fig. 3).⁽³⁾ Además, poseen marcos de lectura abiertos adicionales entre los genes *pol* y *env* y en el extremo 3' del gen *env* que codifican para proteínas regulatorias del ciclo viral tales como Tat y Rev y que contribuyen a la patogénesis del virus (Fig. 3).⁽²⁾

La expresión de los genes *pol* ocurre a través de un corrimiento en el marco de lectura ribosomal. Este cambio en -1 permite la expresión de las proteínas PR, TR e IN en una proporción 1:20 respecto de los genes *gag*.

involucrado en el empaquetamiento específico del ARN genómico viral y en la asociación del ARN_i a dicho genoma.⁽⁶⁻¹⁰⁾

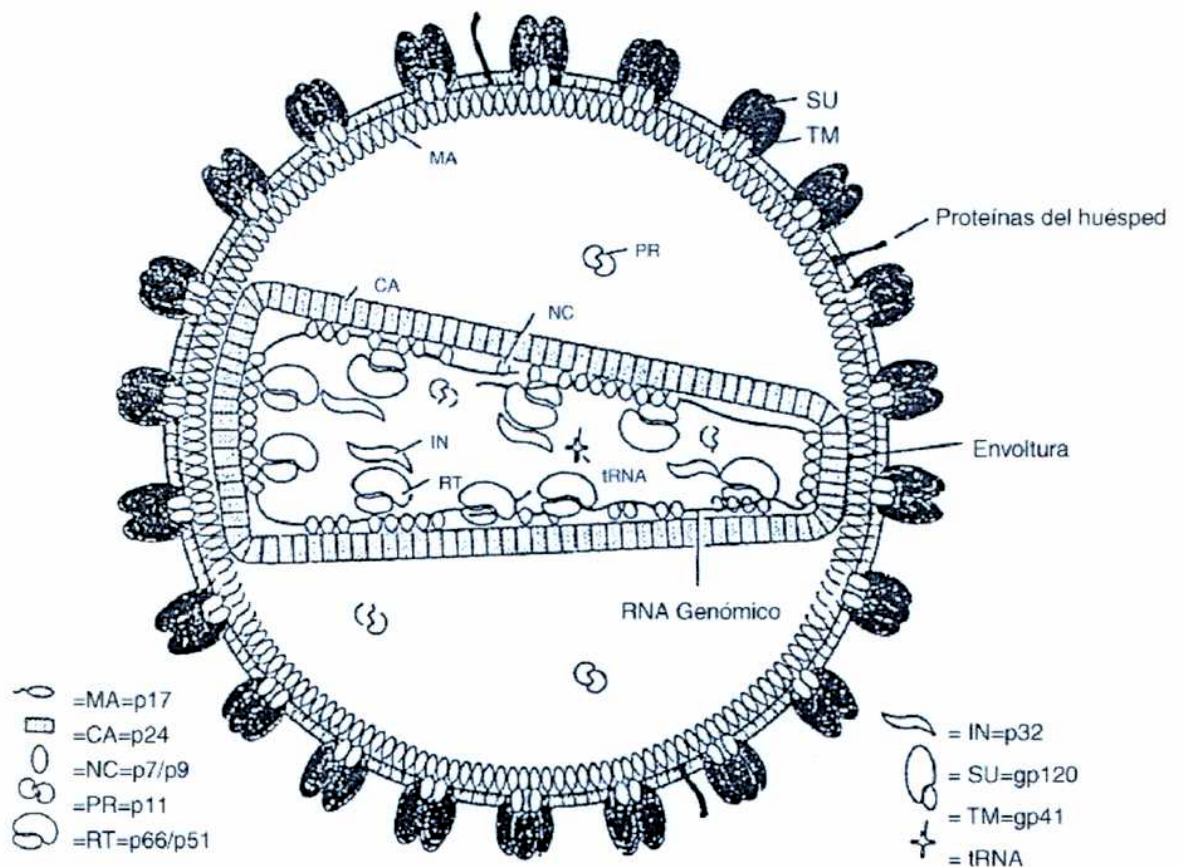


Figura 4. Modelo de la estructura del virión de HIV como ejemplo de partícula lentiviral.

La transcriptasa reversa, la integrasa y la proteasa están también asociadas al “core” viral. Rodeando al “core” se halla la MA asociada a la envoltura del virus. Esta envoltura deriva de la membrana celular y contiene la glicoproteína Env con sus subunidades SU y TM.

II.4- ENSAMBLADO

Los conocimientos obtenidos hasta el momento acerca del ensamblado de los lentivirus se basan fundamentalmente en estudios realizados sobre los virus de inmunodeficiencia de humanos (HIV) y de simios (SIV). Las partículas de los lentivirus se ensamblan en la membrana plasmática de las células infectadas a partir de los precursores Gag y Gag-Pol. Durante o inmediatamente después de la brotación del virión ocurre la maduración que involucra dos procesos: el clivaje del precursor Gag por la proteasa viral (PR) para dar las cuatro proteínas: matriz (MA), cápside (CA), nucleocápside (NC) y p6⁽⁴⁾ y la incorporación a los viriones de la glicoproteína viral Env.

La poliproteína Gag de los retrovirus posee la capacidad de autoensamblarse en partículas virales cuando es expresada sola en ausencia del resto de las proteínas del virus.⁽⁴⁾ Nuestro laboratorio ha demostrado que el sistema recombinante de vaccinia puede ser utilizado para la expresión del precursor Gag de SIV junto con el dominio proteasa del gen *pol*, que resulta en la síntesis, procesamiento y ensamblado de Gag en partículas pseudovirales que son morfológicamente indistinguibles de las típicas partículas lentivirales.^(11, 12)

Para que el ensamblado de las partículas virales ocurra es necesario alcanzar una concentración crítica de precursores en el sitio de ensamblado. Este nivel crítico es alcanzado en la membrana plasmática de las células infectadas donde los precursores se ensamblan en partículas inmaduras incorporándose a su vez otros componentes virales.⁽¹³⁾

La proteína MA se encuentra en la región amino-terminal del precursor Gag y forma la cubierta proteica inmediatamente por debajo de la envoltura viral.⁽¹⁴⁾ La MA es modificada cotraduccionalmente por la adición de un ácido mirístico en la glicina en posición 2 luego de ser removida la metionina iniciadora.⁽¹⁵⁾ Esta modificación está involucrada en la asociación del precursor Gag con la membrana de la célula infectada.⁽¹³⁾ Sin embargo, el ácido mirístico no provee suficiente energía para mantener esta asociación⁽¹⁶⁾ indicando que deben existir otros elementos que intervienen. Estudios de nuestro laboratorio realizados sobre la proteína MA de SIV demostraron que existe una región de aminoácidos básicos en el extremo amino-terminal de MA necesaria para la asociación del precursor Gag con la membrana.⁽¹¹⁾ Esta región proveería energía adicional para la estabilización de la asociación entre Gag y la membrana estableciendo interacciones electrostáticas con fosfolípidos ácidos de la membrana plasmática.⁽¹⁷⁾ Además de

estas dos señales, el ácido mirístico y la región polibásica, en la misma proteína se ha identificado una zona hidrofóbica que comprende los diez primeros aminoácidos en SIV⁽¹⁸⁾ y los primeros catorce en HIV.⁽¹⁷⁾ Esta zona actúa de manera coordinada con la región básica para favorecer la interacción de Gag con la membrana. En el caso de SIV nuestro laboratorio ha demostrado que la proteína MA cumple además un papel fundamental en el proceso de ensamblado del precursor Gag, en la incorporación de Env a las partículas y participa también en el proceso de liberación de partículas al medio extracelular.^(11,12,18,19)

La proteína CA es el principal componente de la estructura cónica del “core” que rodea el complejo de ARN genómico. Existe una secuencia de unos 20 aminoácidos muy conservada conocida como “principal región de homología”(MHR) que estaría involucrada en la formación de partículas, en la replicación y en la morfogénesis del cono electrodensado del “core”.⁽²⁰⁾

El dominio NC se encuentra ubicado en la partícula viral en el interior del cono que forma la CA en contacto con el ARN genómico. Esta proteína contiene dos copias de un motivo muy conservado de cisteínas e histidinas similar al conocido como “dedos de cinc”, que estaría involucrado en el reconocimiento específico y la incorporación del ARN genómico a las nuevas partículas, así como en la transcripción reversa del genoma del virus durante la infección.^(21, 22)

Finalmente, p6 parece facilitar la brotación de las partículas virales de HIV-1 desde la membrana hacia el medio extracelular.⁽²³⁾ En el caso de SIV nuestro laboratorio ha presentado evidencias que indican que la proteína MA de este virus participaría también en el proceso de brotación.⁽¹¹⁾

III.- VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA DE FELINOS (FIV)

Para obtener un mayor conocimiento del ciclo de vida y la patogénesis del virus HIV, se han estudiado virus animales muy relacionados como los virus de inmunodeficiencia de simios (SIV) y más recientemente los virus de inmunodeficiencia de felinos (FIV). Los virus FIV causan en sus huéspedes naturales (gatos, leones y pumas) una enfermedad similar al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en humanos. El sistema gato doméstico-FIV ha

despertado gran interés como modelo para el desarrollo de vacunas y de estrategias antivirales contra el HIV-1.

El FIV se asemeja a los lentivirus de primates HIV y SIV en muchos aspectos. Éstos incluyen la morfología del virión, la organización y variabilidad genómicas, el ciclo de replicación, el potencial patogénico y la susceptibilidad a drogas antivirales.^(24,25) Sin embargo, existen diferencias entre ambos ya que FIV no utiliza aparentemente el antígeno CD4 como su receptor celular⁽²⁴⁾ pero, al igual que ciertas cepas de HIV-1, emplea las moléculas CXCR4 como co-receptor celular.

Hasta el momento la mayoría de los estudios sobre FIV se han concentrado en su variabilidad genómica y patogenicidad. Un aspecto importante de su ciclo de vida, como es el ensamblado viral no ha sido estudiado aún. El análisis de la morfogénesis de FIV es fundamental para establecer los mecanismos que comparte con los lentivirus de primates HIV y SIV, así como aquellas características de FIV que lo diferencian de estos virus.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El gen *gag* de FIV tiene 1350 bases que codifican para un precursor poliproteico de 450 aminoácidos. Este precursor es clivado por la proteasa viral PR para dar las proteínas MA de 135 aminoácidos, CA de 230 aminoácidos y NC de 85.⁽²⁶⁾ A diferencia de los lentivirus de primates HIV-1 y SIV, la poliproteína Gag de FIV carece del polipéptido C-terminal p6 y de los pequeños péptidos p2 y p1, que se hallan localizados entre CA y NC, y entre NC y p6, en el precursor Gag de HIV-1 y de SIV, respectivamente.

Un aspecto fundamental del ciclo de replicación de FIV como es el ensamblado de Gag en partículas virales no ha sido estudiado aún. Por lo tanto, como primer paso en la caracterización de los eventos moleculares que tienen lugar en las últimas etapas del ciclo de replicación de FIV, se propone:

- a) La construcción de un virus vaccinia recombinante que exprese el gen *gag* de FIV y la proteasa viral (PR) de manera de reproducir en células de mamífero la síntesis, procesamiento, transporte y ensamblado del precursor Gag en partículas virales.
- b) Comenzar con el estudio del rol del producto matriz (MA) del gen *gag* en el ensamblado de FIV. Se realizará un estudio del tipo estructura-función de la proteína MA a través de la mutagénesis dirigida del gen *gag*, seguida de la expresión de los mutantes de MA en células de mamífero utilizando el sistema recombinante de vaccinia. Se analizará el efecto de las substituciones aminoacídicas introducidas en esta proteína sobre la formación de partículas virales de FIV.

MATERIALES Y MÉTODOS

I.- OBTENCIÓN DEL FRAGMENTO *gag*-PR DE FIV

La amplificación del gen *gag* y de la región del gen *pol* que codifica para PR se realizó a través de la técnica de PCR.⁽²⁷⁾ Como templado se utilizó el ADN del provirus de FIV (aislamiento 2489) que fue cedido gentilmente por el Dr. James I. Mullins (University of Washington, Seattle, EEUU). Se diseñaron como “primers” de la reacción los siguientes oligonucleótidos:

- Primer 5' *gag* $\xrightarrow{\text{Sal I}}$ 5' TAC GTC GAC ATG GGG AAT GGA C^{3'}

- Primer 3' PR $\xrightarrow{\text{Hind III}}$ 5' CCT AAG CTT TCA TAT TGG AAT^{3'}

Los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *SalI* y *HindIII* se introdujeron para facilitar el posterior clonado del fragmento a amplificar en el vector de transferencia pMJ601.

La reacción se realizó según el siguiente esquema: un primer ciclo de 5 minutos a 94°C para la desnaturalización completa del templado y luego 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 55°C y 60 segundos a 72°C. El producto de amplificación se analizó por electroforesis en gel de agarosa 0,8% en buffer 1xTBE (90mM Tris-Borato; 2mM EDTA, pH 8,3).

La reacción de PCR se trató con proteinasa K (100µg/ml) durante 2 horas a 37°C y 10 minutos a 68°C para inactivar la enzima. Posteriormente, se realizó una extracción con fenol y una con cloroformo. El fragmento de ADN se precipitó agregando 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M, pH 5,2 y 2 volúmenes de etanol 100%. El fragmento de ADN se recuperó por centrifugación a 12.000xg durante 15 minutos. El pellet de ADN se lavó con etanol 70%, se secó al vacío y se resuspendió en agua bidestilada.

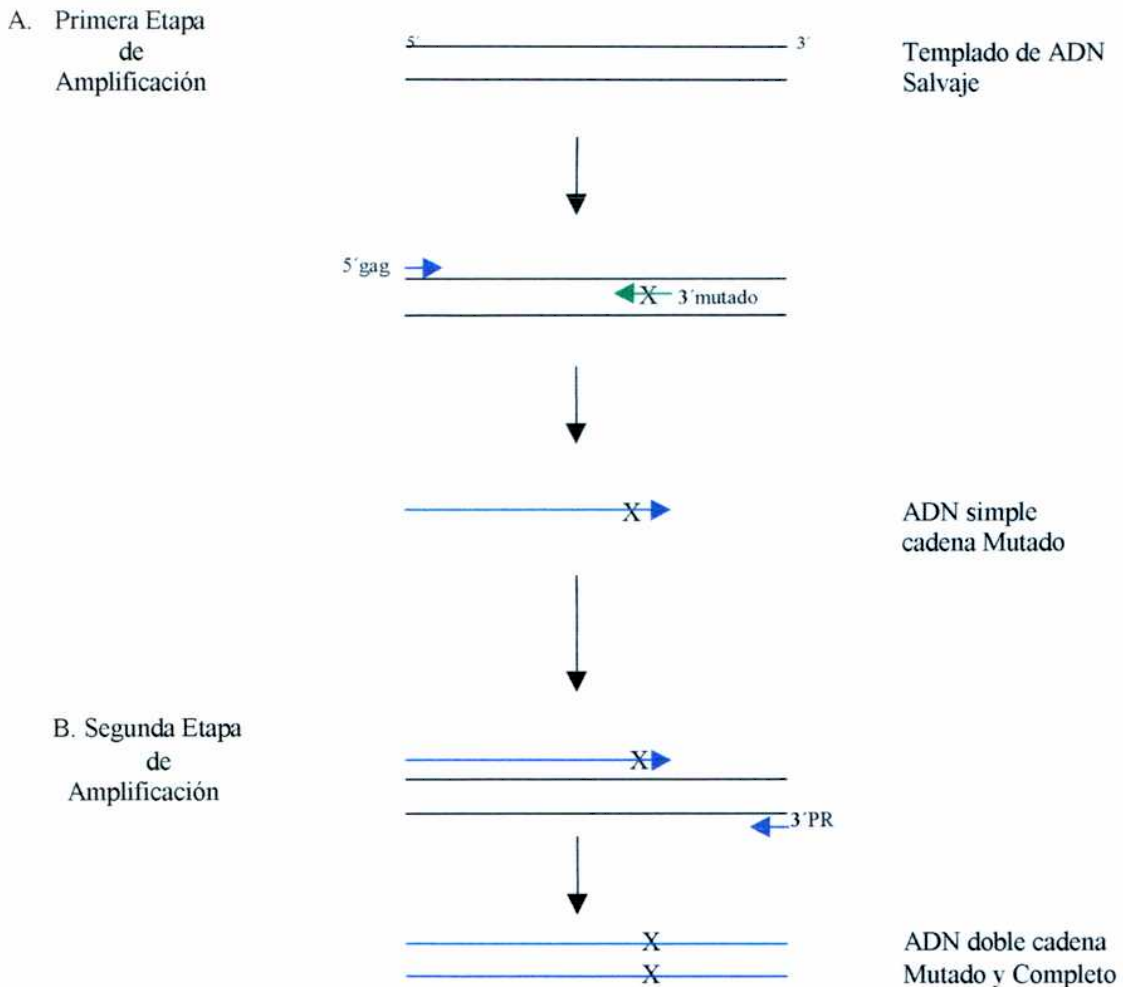
El producto de la amplificación por PCR fue digerido con las enzimas *SalI* y *HindIII*. Como ambas enzimas requieren concentraciones salinas diferentes para su actividad, se realizó una primera digestión con *HindIII* en un volumen total de 15µl y una concentración de NaCl de 50mM. Luego de 2 horas de incubación a 37°C, se modificó la concentración salina a 150mM. Se agregó la enzima *SalI* y se continuó la incubación durante 2 horas a 37°C.

El producto de PCR digerido por las enzimas de restricción se purificó a partir de un gel de agarosa por el método de Tautz y Renz.⁽²⁸⁾ Una vez realizada la electroforesis, la banda de ADN se cortó del gel y se incubó en una solución de acetato de sodio 0,3M, pH7 durante 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente, la sección de agarosa se colocó en un tubo eppendorf de 500µl con un orificio en el fondo y cubriendo este orificio, lana de vidrio. Luego de congelar el tubo con la agarosa se introdujo dentro de otro tubo de 1,5ml y el dispositivo se centrifugó por 10 minutos a 12.000xg. La agarosa quedó retenida por la lana de vidrio mientras que la solución con el ADN pasó hacia el otro tubo. El fragmento de ADN así recuperado se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto durante toda la noche a -20°C. Finalmente el fragmento de ADN se recuperó por centrifugación a 12.000xg como se describió antes. El fragmento de *gag-PR* de FIV fue clonado en los sitios *SalI* y *HindIII* del vector pUC19.

II.- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA POR PCR ASIMÉTRICO

Para introducir mutaciones específicas en la región de la matriz de *gag* de FIV se utilizó la reacción de PCR asimétrico descrita por Perrin y Gilliland⁽²⁹⁾ con algunas modificaciones.⁽¹¹⁾ Como templado se utilizó el fragmento *gag-PR* de FIV, amplificado como se describió anteriormente, y luego clonado en el vector pUC19. El método consta de dos etapas: en la primera se utiliza un “primer” 5’ que hibridiza en el extremo 5’ del gen *gag* de FIV y un “primer” 3’ mutagénico que lleva la mutación deseada. La relación molar entre el “primer” 5’ y el 3’ mutado es de 100:1 de manera de obtener un producto ADN simple cadena portador de la mutación. En la segunda etapa se utiliza el producto mutado de la primera como “primer” 5’ en una relación equimolar con un primer 3’ que hibridiza en el extremo 3’ del gen PR.

Representación esquemática de la técnica de mutagénesis dirigida por PCR asimétrico:



Los oligonucleótidos utilizados como “primers” fueron:

- 5'gag y 3'PR son los descriptos en el punto I de esta sección.
- 3' mutados:

Nombre	Secuencia	Mutación
MA-1	5' CT CTT <u>ATT</u> GGC <u>CTG</u> TTT CCA GTC ^{3'}	M11Q/I13N
MA-2	5' CCC <u>TIG</u> CCC <u>GTT</u> AGC <u>ACC</u> ATT ATT ACA ^{3'}	V19G/V21N/V23Q
MA-3	5' CC AAA <u>TTC</u> <u>TTC</u> ACT <u>CTC</u> GGT CCC T ^{3'}	K26E/K28E/K29E

En el recuadro se muestran las mutaciones realizadas indicando el nombre que recibió cada una, con una línea se destacan los cambios nucleotídicos introducidos y en la última columna los cambios aminoacídicos que introducen.

La reacción de PCR se realizó en las mismas condiciones que las utilizadas para la amplificación del fragmento *gag-PR* descritas en el punto anterior, así como también el tratamiento con proteinasa K, la digestión con las enzimas de restricción *Sall* y *HindIII* y la purificación de los productos por el método de Tautz y Renz.

III.- LIGACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR AL PLÁSMIDO pMJ601

Los productos de PCR *gag-PR*, MA-1, MA-2 y MA-3 purificados se ligaron al vector pMJ 601 digerido por las enzimas *Sall* y *HindIII*. La ligación se realizó utilizando 0,5 unidades de la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 en buffer de ligación (20mM Tris-ClH, pH 7,6; 5mM MgCl₂; 5mM DTT; 50µg/ml seroalbúmina bovina). El volumen final de ligación fue de 10µl y las mezclas de ligación se incubaron toda la noche a 16°C.

IV.- TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES *Escherichia coli*

Para transformar bacterias de *E.coli* (cepa DH5α) con las mezclas de ligación de los fragmentos *gag-PR*, MA-1, MA-2 y MA-3 al vector pMJ601, se utilizaron bacterias competentes obtenidas siguiendo el protocolo de Hanahan.⁽³⁰⁾ Las bacterias competentes se descongelaron a temperatura ambiente y se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. Se agregaron 50µl de estas bacterias a las mezclas de ligación (10µl) y las preparaciones resultantes se incubaron 30 minutos en hielo. Posteriormente se incubaron a 42°C por 90 segundos y 2 minutos en hielo para luego agregar 250µl de medio SOC (Gibco BRL; 2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄ y 20mM glucosa) a cada una. Las bacterias en medio SOC se incubaron a 37°C durante 1 hora. Las bacterias fueron finalmente plaqueadas en medio LB-agar (1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl, 1,5% agar) conteniendo 100µg/ml de ampicilina para la selección de los recombinantes. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C.

V.- PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Las minipreparaciones de ADN plasmídico de los clones provenientes de cada

transformación con *gag*-PR, MA-1, MA-2 y MA-3 de FIV se realizaron siguiendo una modificación del método de la lisis alcalina⁽³¹⁾. Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 12.000xg por 2 minutos y se resuspendieron en 100µl de buffer TELT (50mM Tris-HCl, pH 7,5; 62,5mM EDTA; 0,4% Tritón X-100; 2,5M LiCl; 100µg/ml lisozima). Las suspensiones se incubaron primero 5 minutos a temperatura ambiente, luego se hirvieron por 1 minuto y finalmente se enfriaron en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, se centrifugaron por 15 minutos a 12.000xg y se descartó el sedimento de ADN cromosomal de cada clon. El ADN plasmídico se precipitó de cada sobrenadante agregando un volumen de isopropanol. Luego de 20 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron nuevamente y los precipitados se resuspendieron en agua bidestilada. El ADN plasmídico de cada clon fue digerido con las enzimas *Sall* y *HindIII* para liberar los insertos. Las mezclas de digestión se resolvieron por electroforesis en geles de 1% agarosa.

VI.- SECUENCIACIÓN POR EL MÉTODO DE SANGER⁽³²⁾

A) PREPARACIÓN DEL TEMPLADO

El ADN plasmídico utilizado como templado fue purificado por el método de la lisis alcalina (Wizard plus SV Minipreps Kit, Promega). A 2µg de ADN plasmídico se le agregó 1/10 de volumen de solución desnaturizadora (2 M NaOH; 2 mM EDTA). Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol 100%. Se incubó a -70°C durante 10 minutos para precipitar el ADN. Finalmente se centrifugó 10 minutos a 12.000xg y el pellet se resuspendió en 10µl de agua bidestilada.

B) REACCIÓN DE HIBRIDIZACIÓN

Al ADN desnaturizado en la etapa A se le adicionaron 2µl de buffer de hibridización (300 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM Cl₂Mg; 160 mM DTT) y 2µl de una solución 5µM del “primer” de secuencia. Las mezclas se incubaron por 5 minutos a 65°C, 10 a 37°C y finalmente 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 1,6U de ADN-polimerasa del fago T7 modificada (Pharmacia), 1µl de [α ³⁵S]dATP (1000 Ci/mmol; 10µCi/µl) y 3µl de una mezcla de 1,5µM de dGTP, dCTP, y dTTP. La reacción se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

C) ELONGACIÓN Y TERMINACIÓN DE LA CADENA

Se prepararon cuatro tubos eppendorf rotulados G, A, T y C conteniendo cada uno 2,5µl de la solución específica de nucleótido terminador (80µM dGTP, 80µM dATP, 80µM dTTP, 80µM dCTP y 8µM ddGTP o ddATP o ddTTP o ddCTP según corresponda). A cada tubo G, A, T y C se le agregó 4,5 µl de la mezcla de elongación. Se incubaron los tubos a 37°C por 5 minutos y la reacción se detuvo con 5µl de una solución terminadora (95% formamida, 20mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol y 0,05% xilen-cianol FF). Las reacciones de secuenciación se analizan por electroforesis en gel de poliacrilamida 5%, urea 8M en buffer TBE.

VII.- CÉLULAS Y VIRUS

Para la obtención de los virus vaccinia recombinantes se utilizaron células de riñón de mono verde africano (CV-1). Para la selección y purificación de los virus vaccinia recombinantes se usaron células RAT-2 deficientes en el gen de la timidina kinasa (TK⁻). Ambas líneas celulares fueron crecidas en medio D-MEM (Gibco BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina (100U/ml) y estreptomycin (100µg/ml). La cepa WR del virus vaccinia salvaje fue utilizada para generar los virus recombinantes.

VIII.- TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CV-1

Para la generación de los virus vaccinia recombinantes, las células CV-1 fueron tripsinizadas y sembradas en cuatro botellas de 25 cm² de superficie 24 horas antes de la transfección y se las incubó a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Las células (1-1,5 x 10⁶) fueron infectadas con el virus vaccinia parental a una multiplicidad de infección (moi) de 0,05. Dos horas después de la infección el inóculo viral fue removido y luego de lavar la monocapa con medio D-MEM (sin suero ni antibióticos) cada botella de células fue transfectada con el ADN de los clones *gag-PR*, MA-1, MA-2 y MA-3 en el vector pMJ601.

La mezcla de transfección consistió de 3µg de ADN, 18µl de lipofectamina (Gibco BRL) y 600µl de medio D-MEM sin suero ni antibióticos. Las células se incubaron con las mezclas de transfección durante 4-5 horas. Posteriormente, se removió el medio de transfección de cada

botella y se agregó D-MEM 6% SFB. A las 48 horas post-infección las células se lisaron con tres ciclos de congelamiento y descongelamiento para recuperar el virus intracelular. El lisado obtenido se mantuvo a -70°C hasta la selección de los recombinantes de vaccinia en las células RAT-2.

IX.- SELECCIÓN DE LOS VIRUS VACCINIA RECOMBINANTES

La progenie viral resultante de cada infección-transfección fue seleccionada en células deficientes en timidina kinasa, en presencia de 5-bromo-deoxiuridina (BrdU) como agente de selección y X-Gal como sustrato cromogénico de la enzima β -galactosidasa. Las células RAT-2 crecidas en placas de 60mm de diámetro fueron infectadas con diluciones de cada lisado viral. Una hora post-infección se retiraron los inóculos y se agregó una capa de 1% agarosa de bajo punto de fusión en D-MEM conteniendo 2% SFB y 25 $\mu\text{g/ml}$ de BrdU a cada placa. Las células se incubaron por 48 horas y se les agregó una segunda capa de agarosa con 300 $\mu\text{g/ml}$ de X-Gal. A las 16 horas los virus recombinantes *gag-PR*, MA-1, MA-2 y MA-3 fueron identificados por su capacidad de formar placas de lisis azules. Las placas de los virus vaccinia recombinantes se recogieron en 1ml de medio sin suero y fueron sometidas a tres ciclos de congelamiento y descongelamiento. La amplificación del virus de cada placa de lisis azul se realizó infectando células Rat-2 en presencia de BrdU. Los recombinantes obtenidos en cada caso fueron sometidos a dos ciclos adicionales de selección en células Rat-2.

X.- MARCACIÓN METABÓLICA

Placas de 35mm de diámetro conteniendo monocapas confluentes de células CV-1 fueron infectadas a una moi de 3-5 UFP/célula con cada uno de los recombinantes de vaccinia aislados: *gag-PR*, MA-1, MA-2 y MA-3. Luego de una hora de adsorción viral se retiraron los inóculos y se incubaron las células en medio D-MEM 7% SFB por 14 horas. Posteriormente se ayunaron las células incubándolas en medio deficiente en metionina y cisteína suplementado con 3% SFB. Luego de 1 hora de ayuno se agregó una mezcla de [^{35}S]metionina/cisteína (100 $\mu\text{Ci/ml}$, $>1000\text{Ci/mmol}$, Express, NEN) y se incubaron las células en presencia del precursor radioactivo durante 5 horas. Luego del pulso, las células se lavaron dos veces con PBS frío, se recogieron

por centrifugación a baja velocidad y se lisaron con 100µl de buffer de lisis TNN (50mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 1% NP40; 1mM PMSF y 10µg/ml aprotinina) durante 15 minutos. Los lisados se centrifugaron a 12.000xg durante 5 minutos para remover la fracción nuclear y los restos celulares. Los sobrenadantes resultantes fueron sometidos a inmunoprecipitación.

XI.- PURIFICACIÓN DE PARTÍCULAS SEUDOVIRALES

Los medios de cultivo de las células que fueron infectadas con cada vaccinia recombinante y sometidas a marcación metabólica fueron clarificados centrifugando dos veces a baja velocidad. Los medios clarificados se sometieron a ultracentrifugación en colchón de sacarosa 20% (p/v) en PBS a 100.000xg durante 90 minutos a 4°C. El pellet correspondiente a la fracción particulada del medio extracelular se resuspendió en 100µl de buffer TNN y se sometió a inmunoprecipitación.

XII.- INMUNOPRECIPITACIÓN Y ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS

Las muestras de lisados celulares y de las fracciones particuladas purificadas del medio extracelular se inmunoprecipitaron con 1µl de suero de gatos infectados con FIV en presencia de 100mM Tris-HCl; 250mM NaCl; 1% NP40; 1% BSA; 1mM PMSF; 10µg/ml aprotinina durante 1 hora a 4°C. Se agregaron 40µl de Proteína A-Sepharosa CL4B 10% (p/v) para luego incubarlo durante 1 hora a 4°C con rotación "cabeza-cola". Posteriormente, los inmunocomplejos se lavaron tres veces con solución de lavado (100mM Tris-HCl, pH8; 500mM LiCl; 1,5% NP40; 0,1% BSA; 1mM PMSF; 10µg/ml aprotinina). Los complejos antígeno-anticuerpo se disociaron por calentamiento a 95°C durante 4 minutos en 1x buffer Laemmli⁽³³⁾

Las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron por electroforesis en un gel de poliacrilamida 0,1% SDS – 12% poliacrilamida. La visualización de las proteínas marcadas radioactivamente fue realizada por fluorografía del gel y autorradiografía.

Los sueros de gatos infectados con FIV, utilizados en los ensayos de inmunoprecipitación, fueron gentilmente cedidos por el Dr. Edward Hoover (Colorado State University, EEUU).

RESULTADOS

I.- AMPLIFICACIÓN Y CLONADO DE LOS GENES *gag-PR* DE FIV

Con el objeto de construir un virus vaccinia recombinante que exprese la poliproteína Gag y la proteasa viral PR de FIV y que permita caracterizar los eventos moleculares involucrados en el ensamblado del precursor Gag en partículas virales, se amplificó una región de 1,7 Kb correspondiente al gen *gag* y al dominio PR del gen *pol*. La amplificación se realizó por la técnica de PCR utilizando como templado el ADN del provirus de FIV (aislamiento 2489) y oligonucleótidos específicos llevando los sitios de corte para las enzimas *SalI* y *HindIII*.

Como puede observarse en la figura 5, el producto de PCR obtenido fue un fragmento del tamaño esperado de acuerdo con la secuencia conocida para dichos genes y se lo llamó *gag-PR*. Este fragmento se digirió con las enzimas de restricción *SalI* y *HindIII* con el objeto de clonar el fragmento en el vector de transferencia de vaccinia pMJ601 digerido también con las mismas enzimas. La ligación del vector con el fragmento *gag-PR* se llevó a cabo como se describe en Materiales y métodos.

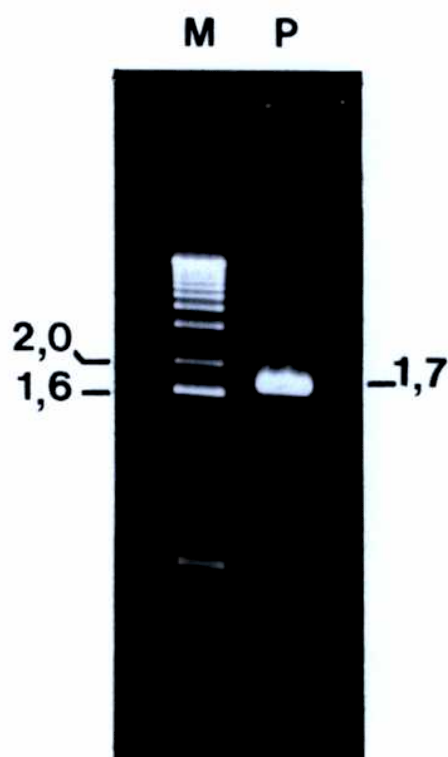


Figura 5: Producto de la amplificación por PCR del fragmento *gag-PR* analizado por electroforesis en un gel de agarosa 1% y teñido con bromuro de etidio. El marcador de peso molecular utilizado fue 1Kb (Gibco BRL).

II.- ANÁLISIS DE LA TRANSFORMACIÓN CON LA MEZCLA DE LIGACIÓN

Con el propósito de seleccionar clones recombinantes llevando los genes *gag-PR* en el plásmido pMJ601 la mezcla de ligación del vector pMJ601 con el fragmento *gag-PR* fue utilizada para transformar bacterias *E.coli* competentes. El ADN plasmídico fue purificado de algunas colonias bacterianas resistentes a ampicilina y digerido con las enzimas *SalI* y *HindIII*, con el fin de identificar los clones recombinantes. En la figura 6 pueden visualizarse los productos de digestión de 6 clones independientes. Los clones 1 a 5 poseen la banda correspondiente al inserto *gag-PR* de 1,7 Kb y otra de 7,1 Kb correspondiente al vector pMJ601 linealizado. En cambio, el clon 6 sólo presenta la banda correspondiente al vector linealizado.

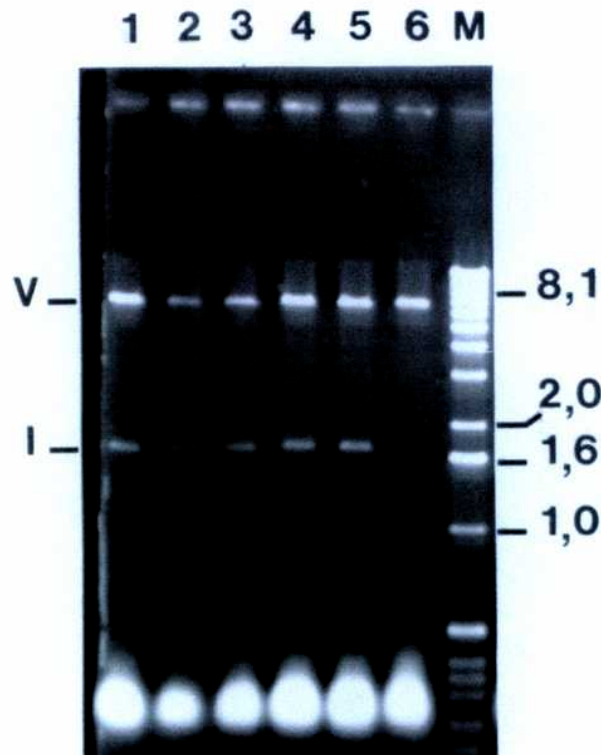


Figura 6: Análisis de la presencia del inserto *gag-PR* en el ADN plasmídico purificado de colonias bacterianas resistentes a ampicilina. El ADN plasmídico fue digerido con las enzimas de restricción *SalI* y *HindIII*. El marcador de peso molecular utilizado fue 1 Kb (Gibco BRL).

III.- ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA PROTEÍNA MA DE FIV

La proteína MA de FIV tiene 135 aminoácidos. Al realizar un alineamiento (asistido por el programa PCgene) de la estructura primaria de la proteína MA de los virus FIV, BIV, SIV, HIV-2 y HIV-1 (Figura 7) puede observarse que presenta una baja homología, de alrededor del 15% si se consideran aminoácidos idénticos y de un 36% si se consideran los aminoácidos similares, respecto de los lentivirus de primates (SIV y HIV). Si se compara con el virus de bovinos BIV la homología de aminoácidos idénticos y similares, 24% y 50% respectivamente, es sensiblemente mayor. A modo de comparación, las proteínas MA de HIV-1 y SIV presentan un 51% de homología (identidad a nivel de aminoácidos). Estos datos indican que FIV está relativamente más alejado de los virus de inmunodeficiencia de primates que del virus de bovinos.

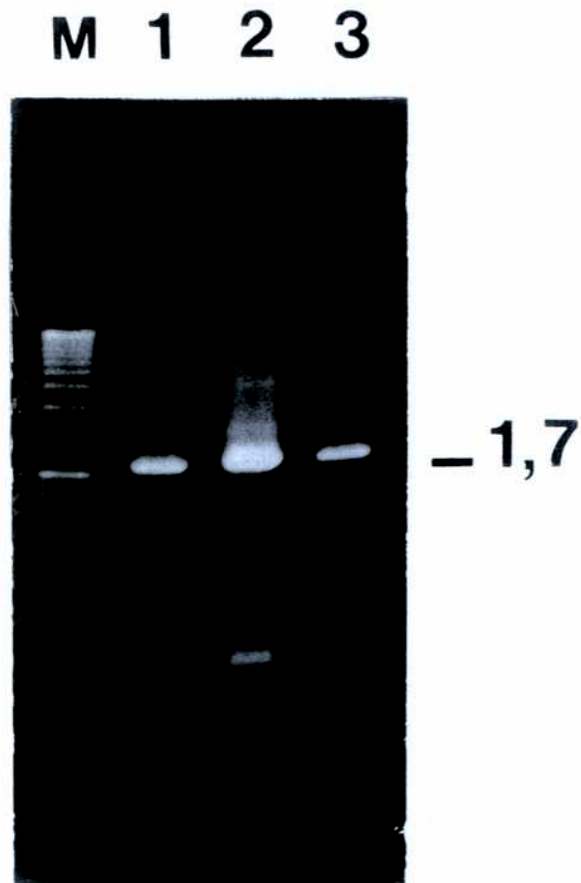


Figura 8 Producto de la segunda etapa de mutagénesis dirigida por PCR. Las calles 1, 2 y 3 corresponden a los productos MA-1, MA-2 y MA-3, respectivamente. El marcador de peso molecular utilizado fue 1Kb (Gibco BRL).

V.- ANÁLISIS DE LA TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS *E.coli* COMPETENTES CON LAS MEZCLAS DE LIGACIÓN DE LOS FRAGMENTOS MUTADOS AL VECTOR pMJ601

Los productos de PCR MA-1, MA-2 y MA-3 fueron digeridos con las enzimas de restricción *SalI* y *HindIII* y ligados al vector de transferencia pMJ601. Con cada mezcla de ligación se transformaron bacterias competentes *E.coli*. Se seleccionaron 4 colonias por cada mutación de las cuales se purificó el ADN plasmídico y se lo digirió con las mismas enzimas de restricción. En la figura 9 se observa el resultado de la digestión. La banda de mayor peso molecular corresponde al plásmido linealizado (7,1 Kb), mientras que la banda de menor peso (1,7 Kb) corresponde a los fragmentos MA-1, MA-2 y MA-3. Para las mutaciones MA-1 y MA-2 se detectaron 2 clones recombinantes que presentaban el inserto (calles 1 y 2 para MA-1 y 1 y 4 para MA-2), mientras que para MA-3 se encontraron 3 clones con inserto (calles 1, 2 y 3).

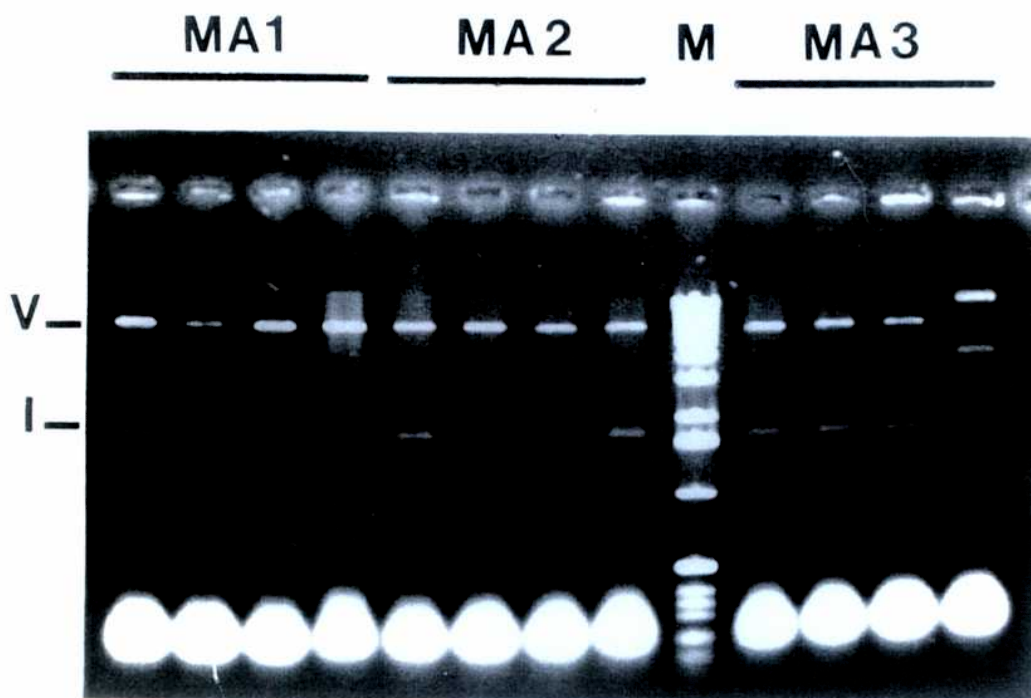
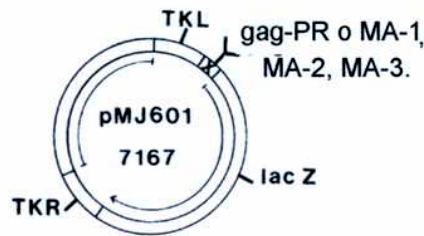


Figura 9 El ADN plasmídico de los cuatro clones seleccionados para cada mutación fue digerido con las enzimas de restricción *SalI* y *HindIII* para determinar la presencia del inserto. Para las mutaciones MA-1 y MA-2 se encontraron dos clones con inserto, mientras que para MA-3 se detectaron 3. El marcador de peso molecular utilizado fue 1Kb (Gibco BRL).

VII.- CONSTRUCCIÓN DE LOS VIRUS VACCINIA RECOMBINANTES PORTADORES DE LOS GENES *gag-PR*, MA-1, MA-2 O MA-3 DE FIV

Se utilizó el sistema de expresión eucariótico del virus vaccinia para expresar las proteínas derivadas de los genes *gag-PR* salvaje y sus versiones mutadas en el dominio MA: MA-1, MA-2 y MA-3. La gran capacidad de insertar ADN exógeno, el amplio rango de huésped “in vivo” e “in vitro”, la termoestabilidad del virión y la capacidad del virus de crecer a altos títulos son características que hacen que este sistema sea muy útil para la expresión de proteínas.

La producción de un virus vaccinia recombinante que exprese los genes *gag-PR* tanto salvaje como mutados, comprendió dos etapas: la primera, como se describió antes, fue el clonado en el plásmido de transferencia pMJ601 de los genes *gag-PR*, MA-1, MA-2 y MA-3 de FIV. Estos fragmentos se insertaron en el sitio de clonado múltiple de dicho vector de tal forma que quedó flanqueado por secuencias pertenecientes al gen de la timidina kinasa (TK) del virus vaccinia presentes en el vector (Figura 11). En la segunda etapa, estas construcciones se utilizaron para transfectar células CV-1 previamente infectadas con el virus vaccinia salvaje. Dentro de la célula ocurre la recombinación homóloga entre las secuencias virales TK presentes tanto en el plásmido pMJ601 como en el genoma viral de forma tal que el gen de la timidina kinasa presente en el genoma es interrumpido por el inserto. De esta manera, puede lograrse la inserción de los genes *gag-PR* salvaje o mutados dentro del genoma del virus vaccinia generándose así recombinantes virales con un fenotipo timidina kinasa negativo (TK⁻). Este fenotipo permite seleccionar a los virus vaccinia recombinantes por su capacidad de crecer en células TK⁻ en presencia del agente de selección 5-bromo deoxiuridina (BrdU).



Detalle de la región X

```

Promotor Tardío Sintético      mRNA>>>      SalI
5' AATTGGATCAGCTTTTTTTTTTTTTTTTGGCATATAAATAAGGTCGACCCCGGGCTTAAGGGCG
                                     HindIII      Promotor temprano 7.5kD
CCTCCGAGGATCCGGGCCCGCTAGCCCGGGGTACC AAGCTTCGACAAGCTCGTAAAAGTAGA
                                     mRNA>>
AAATATATTCTAATTTAATGCACTCGAGCATG'
    
```

Figura 11: El fragmento *gag*-PR salvaje o mutado fue clonado en los sitios *SalI/HindIII* de la región de clonado múltiple del vector de transferencia pMJ601. La secuencia de la timidina kinasa se encuentra flanqueando al inserto. Este vector contiene además la secuencia que codifica para la β -galactosidasa. Dicha enzima puede utilizar el X-Gal como sustrato para generar un compuesto de color que en este sistema facilita la subsiguiente visualización de las placas de lisis de los virus recombinantes.

VIII.- SELECCIÓN DE LOS VIRUS VACCINIA RECOMBINANTES

La selección de los virus vaccinia recombinantes se basó en su fenotipo TK⁻, producto de la inserción del fragmento *gag-PR* de FIV en el gen TK del genoma del virus. Como agente de selección se utilizó la BrdU ya que es un antiviral activo sólo luego de ser fosforilado por la enzima TK. Por esta razón, la BrdU permanece en su forma inactiva en aquellos virus vaccinia que han incorporado el fragmento *gag-PR* salvaje o mutado y presentan un fenotipo TK⁻.

Además de la selección con BrdU se realizó conjuntamente una selección basada en la capacidad de los virus recombinantes de formar placas de lisis azules en presencia de X-Gal debido a la expresión de la enzima β -galactosidasa.

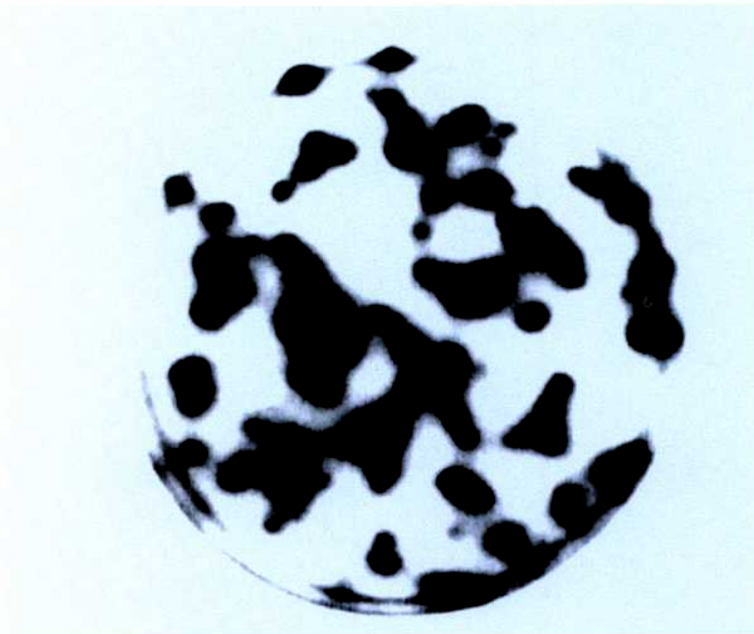


Figura 12: Placas de lisis de virus vaccinia recombinantes obtenidas durante la segunda etapa de selección. La selección se realizó en células RAT-2 (TK⁻) en presencia de BrdU como agente de selección. Las placas se visualizaron luego de 3 a 6 horas de agregado el X-Gal.

Para asegurar la ausencia de virus vaccinia salvaje en la preparación de los virus recombinantes se realizó el proceso de selección dos veces. En la figura 12, donde se presenta el resultado de la segunda selección de los recombinantes de vaccinia, se observan las placas de lisis azules en una monocapa de células Rat-2 (TK⁻), correspondientes a los virus vaccinia recombinantes que han incorporado a su genoma los genes *gag-PR* de FIV.

IX.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GAG DE FIV EN EL SISTEMA DEL VIRUS VACCINIA

Como primer paso se estudió la síntesis y procesamiento de la poliproteína Gag salvaje de FIV. Para ello, se infectaron células CV-1 con el virus vaccinia recombinante llevando los genes *gag-PR* de FIV. Las células se marcaron metabólicamente con una mezcla de [³⁵S]metionina-cisteína. Luego de la marcación se recogió el sobrenadante de la monocapa para analizar la formación de partículas pseudovirales extracelulares, mientras que las células se lisaron en buffer TNN. Con el fin de estudiar el patrón de expresión de las proteínas de FIV en el sistema vaccinia, los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con suero de gatos infectados con FIV. Los inmunoprecipitados fueron analizados en un gel de poliacrilamida 12%.

En la figura 13 A, en la calle correspondiente a los lisados de células infectadas con el virus vaccinia recombinante portador del fragmento *gag-PR* (WT), se observan bandas de 46KDa y 39,5KDa correspondientes al precursor Gag y a un intermediario del procesamiento del precursor Gag por la proteasa viral PR, respectivamente. La especificidad de estas bandas queda demostrada por la ausencia de las mismas en lisados de células infectadas con un virus vaccinia que expresa solamente β -galactosidasa (calle VV, Figura 13 A).

En la figura 13 B se muestra el análisis de la fracción particulada purificada por ultracentrifugación a partir del sobrenadante de las células infectadas con el virus recombinante portador del fragmento *gag-PR* (WT). En la fracción particulada del medio de cultivo de las células que expresan esta construcción se observan las bandas correspondientes al precursor Gag (46KDa), al intermediario de procesamiento (39,5 KDa), a la CA (25KDa) y a la MA (15KDa). Este resultado demuestra que el precursor Gag de FIV expresado a partir del fragmento *gag-PR* en el sistema de vaccinia, se ensambla en partículas que son liberadas al medio extracelular.

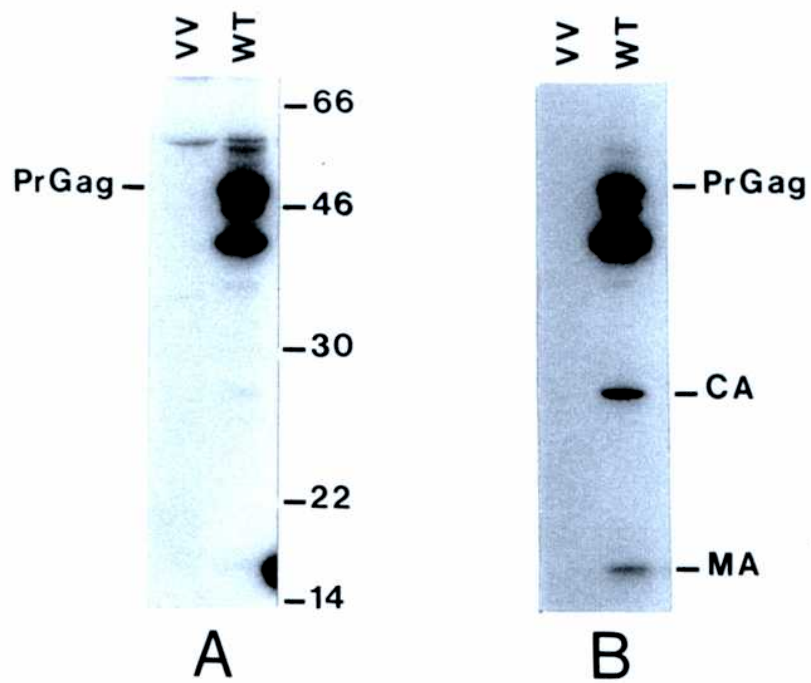


Figura 13: Inmunoprecipitación de las proteínas producidas en células de mamífero por el virus vaccinia recombinante portador del fragmento *gag*-PR (WT). **A)** Análisis de los lisados celulares (exposición de la autorradiografía por 1 día). **B)** Análisis de la fracción particulada del medio de cultivo (exposición de la autorradiografía por 7 días). Como control se utilizó el lisado celular y la fracción particulada de un virus vaccinia que solo expresa β -galactosidasa (VV).

X.- EFECTO DE LAS MUTACIONES MA-1, MA-2 Y MA-3 SOBRE EL ENSAMBLADO DEL PRECURSOR GAG DE FIV

Con el objeto de analizar el efecto de las mutaciones introducidas en el dominio MA de FIV sobre la síntesis, procesamiento y ensamblado del precursor Gag, se infectaron células CV-1 con los mutantes MA-1, MA-2 y MA-3. Las células se marcaron metabólicamente y se prepararon lisados celulares así como fracciones particuladas a partir del medio de cultivo. Estas fracciones fueron sometidas a inmunoprecipitación.

En la figura 14 A se observa el resultado de la inmunoprecipitación de los lisados celulares correspondientes a los virus vaccinia recombinantes MA-1, MA-2 y MA-3. Como control se utilizó el virus recombinante WT (correspondiente al fragmento salvaje *gag-PR* de FIV). En todas las calles se distinguen niveles intracelulares similares de la banda de 46 KDa correspondiente al precursor Gag así como de las bandas de menor peso molecular que corresponden a intermediarios del procesamiento de Gag por la proteasa viral. Esto indica que las mutaciones introducidas en la MA de FIV no afectan la síntesis del precursor Gag.

En la figura 14 B se muestra el patrón de proteínas inmunoprecipitadas a partir de la fracción particulada de cada mutante. En la calle correspondiente a Gag salvaje (WT) se observan las bandas correspondientes al precursor Gag y al intermediario de procesamiento así como las de los productos maduros de clivaje CA y MA. En el caso de los mutantes MA-1 y MA-2 se observa una importante inhibición de la cantidad de partículas liberadas al medio como se deduce de la menor cantidad de precursor Gag y productos de procesamiento detectado por inmunoprecipitación. En el caso del mutante MA-3 la formación de partículas extracelulares parece estar completamente bloqueada ya que no se detectan las proteínas derivadas de Gag en el medio extracelular.

Al cuantificar por densitometría las bandas correspondientes a Gag en la fracción particulada de Gag salvaje, MA-1 y MA-2, se determinó que las mutaciones MA-1 y MA-2 provocaron una inhibición de la producción de partículas del 63% y del 80%, respectivamente.

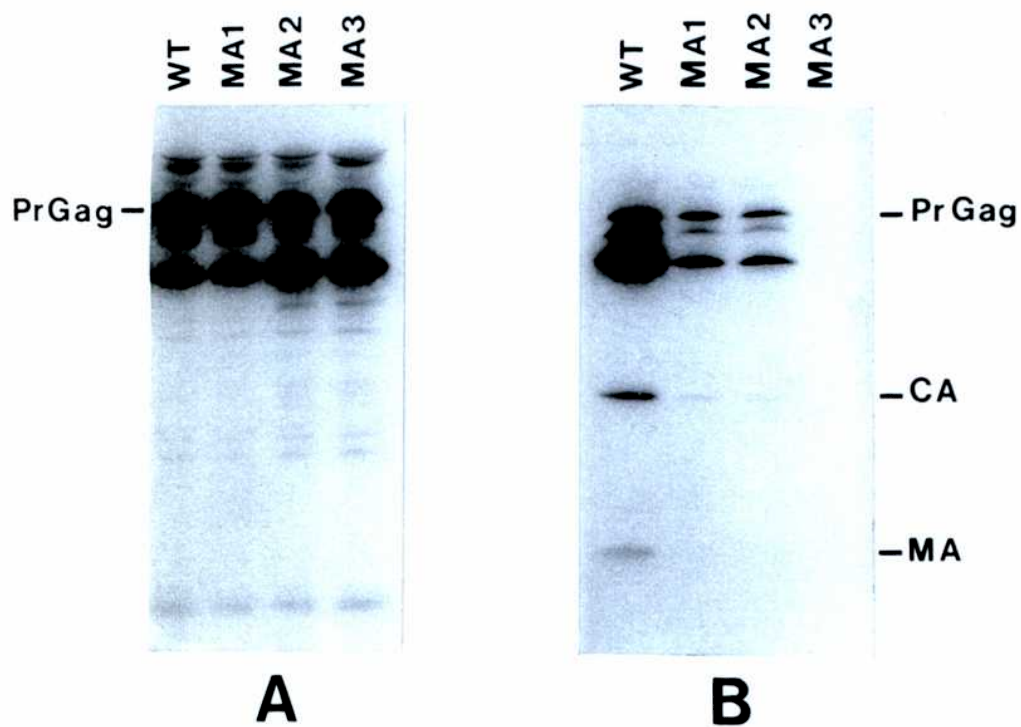


Figura 14 Resultado de la inmunoprecipitación de las proteínas expresadas por los virus vaccinia recombinantes *gag-PR* (WT), MA-1, MA-2 y MA-3. En la parte A se observa el patrón de bandas obtenido al analizar los lisados celulares, mientras que la parte B corresponde a la fracción particulada purificada de los sobrenadantes de cultivo.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Acorde con lo propuesto en los objetivos se construyó un recombinante del virus vaccinia que dirige la síntesis del precursor Gag de FIV. La construcción utilizada incluye a los genes *gag* y al dominio PR del gen *pol* y respeta el corrimiento en el marco de lectura ribosomal que durante la infección con FIV asegura la expresión del gen *pol*. La eficiencia de este mecanismo permite la expresión de *pol* en una proporción de 1/20 respecto del gen *gag*.

En las células CV-1 infectadas con el virus vaccinia recombinante portador de la construcción *gag-PR* de FIV, se observa la síntesis del precursor Gag y su procesamiento por la proteasa viral. El peso molecular aparente observado para el precursor Gag de FIV y sus productos de clivaje en este sistema coincide con los descritos en células infectadas con FIV.⁽²⁹⁾

Sin embargo, el análisis del patrón de bandas obtenido revela que el precursor Gag es parcialmente procesado en los productos maduros MA y CA, acumulándose un intermediario de 39,5KDa. La proteasa viral deriva, por clivaje autocatalítico, del precursor Gag-Pol. Se ha demostrado que PR requiere para su activación de la dimerización del precursor Gag-Pol.⁽³⁴⁾ Es posible que en FIV la expresión de Gag-PR no sea suficiente para lograr que se active por completo PR y que se requiera incluir en la construcción otras regiones de *pol*. En este sentido construiremos un virus vaccinia recombinante que exprese el gen *gag* y una región más extensa del gen *pol* de manera que el precursor Gag-Pol que se forme permita una activación completa de PR.

Cabe destacar que tanto Gag como sus productos de clivaje MA y CA pudieron ser detectados en la fracción particulada purificada a partir del medio de cultivo de las células, lo que sugiere que el precursor Gag de FIV producido en células CV-1 utilizando el sistema de vaccinia resultó capaz de ensamblarse en partículas que son liberadas al medio extracelular.

Los resultados presentados demuestran que el sistema recombinante de vaccinia permite reproducir en células de mamíferos la síntesis, procesamiento y ensamblado del precursor Gag de FIV. Por lo tanto, este sistema se utilizó para comenzar el estudio del rol que desempeñan los distintos dominios del precursor Gag de FIV en las diferentes etapas de la morfogénesis viral.

Se inició entonces el análisis de la proteína matriz de FIV introduciendo mutaciones en regiones específicas de la misma. Estas regiones incluían dos zonas de carácter hidrofóbico y una de carácter básico en la región amino-terminal de la proteína.

La mutación que afectó la zona de carácter básico (K26E/K28E/K29E) bloqueó la producción de partículas, mientras que las mutaciones en las dos regiones hidrofóbicas (M11Q/I13N y V19G/V21N/V23Q) provocaron una inhibición significativa de este proceso. Los resultados obtenidos sugieren que estas regiones están involucradas en el proceso de ensamblado ya que los cambios introducidos afectaron la formación de partículas.

En la mayoría de los retrovirus es necesaria la interacción del precursor Gag con la membrana plasmática para que ocurra el ensamblado de partículas virales. Estudios de nuestro laboratorio en SIV^(11,18) y de otros autores en HIV-1⁽¹⁷⁾, demostraron que la asociación de Gag con la membrana celular requiere de tres elementos presentes en la proteína MA: el ácido mirístico, la región polibásica que se extiende desde el aminoácido 26 al 32 y dos residuos hidrofóbicos valina y leucina en posición 7 y 8, respectivamente. La proteína MA de FIV también se halla modificada por miristilación⁽²⁹⁾ pero carece de una región polibásica extensa como la de HIV-1 y SIV. Sin embargo, en FIV, los residuos básicos en posición 26, 28 y 29 junto con la región hidrofóbica delimitada por los residuos de valina en posición 19, 21 y 23 podrían participar de la interacción del precursor con la membrana plasmática. Para verificar esta hipótesis se realizarán ensayos de fraccionamiento subcelular para comparar el grado de asociación a la membrana plasmática de los precursores Gag mutados (MA-1, MA-2 y MA-3) con respecto al del precursor Gag salvaje.

BIBLIOGRAFÍA

1. Coffin, J.M. (1996). "Retroviruses" En: "Virology" Eds. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P. 3^{ra} ed., vol 2. Lippincot-Roven NY.
2. Clements, J.E. & Wong-Staal, F. (1992). Molecular biology of lentiviruses. *Sem. Virology*. **3**, 137-147.
3. Joag, S.V., Stephens, E.B., and Narayan, O. (1996). "Lentiviruses" En: *Virology*. 3^{ra} ed, vol 2. Lippincot-Roven NY.
4. Hunter, E. (1994). Macromolecular interactions in the assembly of HIV and other retroviruses. (1994) *Sem. Virology* **5**: 71-83.
5. Linial, M.L., Miller, A.D. (1990). Retroviral RNA packaging: sequence requirements and implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* **157**: 125-152.
6. Gorelick, R.J., Henderson, L.E., Hanser, J.P., and Rein, A. (1988). Point mutant of Moloney Murine Leukemia virus that fails to package viral RNA: Evidence for specific RNA recognition by zinc-finger-like protein sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8420-8424.
7. Gorelick, R.J., Nigida, S.M., Jr., Bess, J.W., Jr., Arthur, L.O., Henderson, L.E., and Rein, A. (1990). Noninfectious HIV type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J. Virol.* **64**: 3207-3211.
8. Meric, C., Gouilloud, E., and Spahr, P.F. (1988). Mutations in Rous Sarcoma virus nucleocapsid protein p12 (NC): Deletions of Cys-His boxes. *J. Virol.* **62**: 3328-3333.
9. Meric, C., and Spahr, P.F. (1986). Rous Sarcoma virus nucleic acid-binding protein p12 is necessary for viral 70s RNA dimer formation and packaging. *J. Virol.* **60**: 450-459.
10. Meric, C., and Goff, S.P. (1989). Characterization of Moloney Murine Leukemia virus mutants with single amino-acid substitutions in the Cys-His box of the nucleocapsid protein. *J. Virol.* **63**: 1558-1568.
11. González, S.A., Affranchino, J.L., Gelderblom, H.R., and Burny, A. (1993). Assembly of the matrix protein of simian immunodeficiency virus into virus-like particles. *Virology* **194**: 548-556.
12. González, S.A., Affranchino, J.L. (1995). Mutational analysis of conserved cysteine residues in the simian immunodeficiency matrix protein. *Virology* **210**: 501-507.
13. Delchambre, M., Gheysen, D., Thines, D., Thiriart, C., Jacobs, E., Verdin, E., Horth, M., Burny, A., Bex, F. (1989). The Gag precursor of simian immunodeficiency virus assembles into virus-like particles. *EMBO J.* **8**: 2653-2660.

14. Gelderblom, H.R., Hausmann, E.H.S., Ozel, M., Pauli, G., Koch, M.A. (1987). Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* **156**: 171-176.
15. Henderson, L.E., Benveniste, R.E., Sowder, R.C., Copeland, T.D., Schultz, A.M., and Oroszlan, S. (1988). Molecular characterization of Gag proteins from simian immunodeficiency virus (SIV_{mne}). *J. Virol.* **62**: 2587-2595.
16. McLaughlin, S., and Aderem, A. (1995). The myristoyl-electrostatic switch: A modulator of reversible protein-membrane interaction. *Trends. Biochem. Sci.* **20**: 272-276.
17. Zhou, W., Parent, L.J., Wills, J.W. and Resh, M.D. (1994). Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type-1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J. Virol.* **68**: 2556-2569.
18. González, S.A., Affranchino, J.L. (1998). Substitution of leucine 8 in the simian immunodeficiency virus matrix protein impairs particle formation without affecting N-myristylation of the Gag precursor. *Virology* **240**: 27-35.
19. González, S.A., Burny, A., Affranchino, J.L. (1996). Identification of domains in the simian immunodeficiency virus matrix protein essential for assembly and envelope glycoprotein incorporation. *J. Virol* **70**: 6384-6389.
20. Dorfman, T., Bukovsky, A. Ohagen, A. Höglund, S. & Göttlinger, H.G. (1994). Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **68**: 8180-8187.
21. Aldovini, A., & Young, R.A. (1990). Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol.* **64**: 1920-1926.
22. Darlix, J.L., Gabus, C., Nugeyre, M.T., Clavel, F., & Barré-Sinoussi, F. (1990). *Cis* elements and *trans*-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J. Mol. Biol.* **216**: 689-699.
23. Huang, M., Orenstein, J.M., Martin, M.A., & Freed, E.O. (1995). P6 Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J. Virol.* **69**: 6810-6818.
24. Pedersen, N.C., Ho, E.W., Brown, M.L. & Yamamoto, J.K. (1987). Isolation of T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* **235**: 790-793.
25. Bendinelli, M., Pistello, M., Lombardi, S., Poli, A., Garzelli, C., Matteucci, D., Cecherini-Nelli, L., Malvaldi, G. & Tozzini, F. (1995). Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**: 72-112.

26. Elder, J.H., Schnölzer, M., Hasselkus-Light, C.S., Henson, M., Lerner, D.A., Phillips, T.R., Wagaman, P.C., and Kent, S.B.H. (1993). Identification of proteolytic processing sites within the Gag and Pol polyproteins of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* **67**: 1869-1876.
27. Saiki, R.K., Schaf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Ehrlich, H.A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
28. Tautz, D., and Renz, M. (1983). An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal. Biochem.* **132(1)**: 14-19.
29. Perrin, S., and Gilliland, G. (1990). Site-specific mutagenesis using asymmetric polymerase chain reaction and a single mutant primer. *Nucleic Acids. Research.* **8**, **24**: 7433-7438.
30. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol* **166**: 577-585.
31. Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
32. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. USA* **74**: 5463-5467.
33. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
34. Miller, M., Sathyanarayana, B.K., Toth, M.V., Marshall, G.R., Clawaon, L., Selk, L., Schneider, J., Kent, S.B.H., & Wlodawer, A. (1989). Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3Å resolution. *Science* **246**: 1149-1152.



CRISTINA CECILIA CELMA



JOSE L. AFFRANCHINO