



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE MORENO**

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA

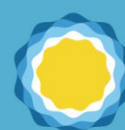
Código: PI-CAyT-01-2022

“INGENIERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA VP6 DE ROTAVIRUS PARA OPTIMIZAR LA PURIFICACIÓN DE VLPS RECOMBINANTES”

Director: PERALTA, Andrea Veronica

Integrantes: GARANZINI, Débora; RAIBENBERG, Fernando;
TOBOGA, Oscar; RAMIREZ, Luciana

Año: 2025



**UNM 2010
UNIVERSIDAD
DEL BICENTENARIO
ARGENTINO**

Informe Final de Proyectos de Investigación (PI) Universidad Nacional de Moreno

Identificación del proyecto

Tipo de proyecto y año de convocatoria:	PI convocatoria 2021
Nombre completo del proyecto:	Ingenierización de la proteína VP6 de Rotavirus para optimizar la purificación de VLPs recombinantes
Director/a:	Andrea Peralta
Lineamiento estratégico: ¹	Biología Molecular y Celular (Biotecnología celular y viral)
Fecha de inicio:	21/04/2022
Fecha de finalización:	20/04/2024
Unidad de localización: Departamento/Centro/ Programa	DCAyT / Programa para la Investigación e Innovación en Biotecnología / Licenciatura en Biotecnología
Resumen: <i>a(máx. 300 palabras)</i>	Las partículas semejantes a virus (VLPs) están formadas por proteínas de origen viral capaces de autoensamblarse en partículas multiméricas que imitan la estructura del virus del cual derivan. Como carecen de material genético, no son infecciosas y por lo tanto muy seguras en su producción y manipulación. Esto las convierte en un reactivo biológico muy atractivo tanto para la formulación de vacunas como su uso para kits de diagnóstico. En especial, las VLPs basadas en la proteína VP6 de rotavirus, se pueden utilizar como fuente de antígeno en ensayos de ELISA o para la producción de sueros específicos para el diagnóstico serológico. La obtención de VLPs de rotavirus se basa en la expresión de las proteínas VP6 y VP2 en el sistema baculovirus-células de insecto. Las proteínas VP2 y VP6 se autoensamblan formando VLPs. El paso crítico en la purificación de estas VLPs es separarlas de la progenie viral de baculovirus recombinantes que se producen en el sistema. Para esto se requiere de pasos de ultracentrifugación en colchón de sacarosa y gradiente de CsCl, lo que lo convierte en un sistema de purificación poco eficiente para la producción en gran escala. Existe bibliografía que demuestra que es posible insertar epitopes foráneos en posiciones aminoacídicas determinadas de la proteína VP6 sin afectar su capacidad de formar multímeros.

¹ Según Resolución UNM- CS 848/21 Lineamientos estratégicos de Investigación y Desarrollo Tecnológico 2022-2027.

	Este plan propone la inserción de un tag de 6X-His usado habitualmente en la purificación de proteínas recombinantes, en la posición aminoacídica 311 de VP6, la obtención de un baculovirus recombinante que exprese VP6-311His, comprobar que esta proteína recombinantes forma VLPs junto con VP2 y evaluar su purificación mediante la interacción con una resina de Niquel (IMAC) gracias a la presencia y exposición del tag de His.
Palabras claves:	ROTAVIRUS; VP6 RECOMBINANTE; VLPs; PURIFICACIÓN

Parte I

Informe de resultados para el repositorio²

1. Introducción y objetivos (*mínimo 1 página- máximo 2 páginas*)

- Realizar una presentación general del estudio (tema/problema) y una justificación de su relevancia (motivos para estudiarlo, aportes potenciales).
- Indicar el objetivo general de la investigación y los interrogantes efectivamente trabajados en el proyecto.

Los rotavirus (RVs) son patógenos importantes, identificados como la causa más común de severas gastroenteritis y diarrea acuosa en niños menores de 5 años (1,2). Así mismo afectan animales jóvenes de importancia económica, causando importantes pérdidas en el sector productor (3-5). Se estima que la infección por rotavirus es responsable de alrededor de ~ 453.000 muertes infantiles anuales en todo el mundo (6).

La cápside viral tiene una compleja estructura, formada por tres capas de proteínas estructurales concéntricas, que contienen en su interior el genoma viral junto con las enzimas responsables de la replicación. La capa más interna está formada por la proteína VP2, la cápside intermedia por la proteína VP6 mientras que la cápside externa está formada por VP7 y VP4 (7).

La proteína VP6 presenta características antigénicas, que permiten la tipificación de los rotavirus. De acuerdo a la reactividad frente a VP6, existen ocho grupos diferentes de rotavirus: A, B, C, D, E, F y G. El grupo A es responsable de la mayoría de las infecciones en humanos y el de mayor importancia epidemiológica (7,8).

El diagnóstico convencional más aceptado se realiza mediante la detección rápida del antígeno de rotavirus grupo A en materia fecal por un ensayo E.L.I.S.A dirigido contra la proteína VP6 (9). Para esto, es necesario el cultivo *in vitro* de rotavirus, tanto para la obtención de sueros policlonales o monoclonales que forman parte de los ensayos de ELISA, así como también para contar con antígeno control de esos mismos ensayos.

Si bien la mayoría de las cepas del grupo A son relativamente fácil de multiplicar *in vitro*, las cepas pertenecientes a los grupos B y C son prácticamente imposible de replicar en cultivos celulares (10). Por lo que se dificulta su diagnóstico y la estandarización de ensayos de ELISA.

Para evitar la manipulación de grandes volúmenes de virus (en el caso del grupo A) o la carencia de material biológico para multiplicar (grupos B y C) existe una estrategia biotecnológica: la obtención de partículas semejantes a virus (VLP por sus siglas en inglés *virus-like particles*). Las VLPs están formadas por proteínas de cápside que pueden autoensamblarse formando estructuras multiméricas muy similares a los virus de los cuales derivan. Al tratarse de una estructura formada únicamente por proteínas, las VLPs carecen de genoma, por lo tanto, no replican y no son infecciosas, resultando un antígeno seguro para manipular.

La proteína VP6 es capaz de autoensamblarse en partículas esféricas y láminas tanto en su forma nativa como cuando es expresada en forma de proteína recombinante en el sistema baculovirus-células de insecto (11,12). Si bien la proteína VP6 tiene la capacidad por sí sola de ensamblarse en formas esféricas, la correcta geometría de la partícula viral está determinada por la proteína VP2, que aporta el ambiente electrostático positivo necesario para formar partículas esféricas un pH neutro (13,14).

De esta forma, mediante la co-expresión de las proteínas VP2 y VP6 en células de insecto se han obtenido VLPs de rotavirus tanto para su evaluación como vacunas, así como también para usar en sistemas de diagnóstico (15).

A pesar de la gran ventaja biotecnológica de las VLPs, una de las desventajas de su producción en el sistema baculovirus-células de insecto es que en el proceso de purificación es necesario separar a las VLPs de la progenie viral recombinante que la produjo. Para esto, se requieren de varios pasos de ultracentrifugación diferencial empleando colchones de sacarosa y gradientes de densidad de cloruro de cesio (16). Resulta evidente que para una producción a gran escala es necesario simplificar el proceso de purificación.

Objetivo general: Ingenierizar la proteína VP6 de rotavirus para optimizar la producción de VLPs recombinantes.

Objetivos específicos:

- 1) Obtener la secuencia codificante para el tag 6XHis flanqueado por sitios de restricción XbaI, lo cual permitirá su clonado en el vector pBS-VP6-311 (ya existente en el grupo).
- 2) Obtener un baculovirus recombinante que exprese la fusión VP6-311-6xHis mediante el sistema Bac-to-Bac.
- 3) Titular y Evaluar la expresión de los baculovirus recombinantes VP6 (wt), VP2 y VP6-311-6xHis.
- 4) Realizar co-infecciones VP6+VP2 o VP6-311-6xHis + VP2 y evaluar la formación de VLPs.
- 5) Evaluar el rendimiento luego de purificar las VLPs clásicas (VP6+VP2) por ultracentrifugación diferencial y las VLPs quiméricas (VP6-311-6xHis + VP2) por IMAC.

2. Marco de referencia (min. 2 páginas- máx. 5 páginas)

Describir en qué campo (temático, disciplinar) se inserta la investigación, indicando:

- estudios antecedentes (propios o no) sobre el tema, avances y áreas de discusión.
- marco teórico o encuadre de referencia de la investigación: con qué enfoque, conceptos, dimensiones o modelos se abordó el tema/problema.

Las VLPs están formadas por proteínas de cápside que pueden autoensamblarse formando estructuras multiméricas muy similares a los virus de los cuales derivan. Al tratarse de una estructura formada únicamente por proteínas, las VLPs carecen de genoma, por lo tanto, no replican y no son infecciosas, resultando un antígeno seguro para manipular. Existen ejemplos de VLPs derivadas de distintas familias de virus

(*Caliciviridae*, *Picornaviridae*, *Flaviviridae*, *Retroviridae*, *Paramyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Parvoviridae*, *Circoviridae*, *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae*, *Hepadnaviridae*, entre otras) que han sido producidas y evaluadas para su empleo en kits de diagnóstico o como vacuna de nueva generación (29-32).

La proteína VP6 de rotavirus tiene la capacidad por sí sola de ensamblarse en formas esféricas, pero la correcta geometría de la partícula multimérica está determinada por la proteína VP2, que aporta el ambiente electrostático positivo necesario para formar partículas esféricas un pH neutro (13,14). Las VLPs de rotavirus (VP6+VP2) se obtienen en el sistema de expresión eucariota baculovirus-células de insecto ya que permite la expresión de varias proteínas simultáneamente (15, 24- 27).

Para aumentar la escala de producción de estas VLPs (VP6+VP2) es necesario optimizar el proceso de purificación. Una de las desventajas de su producción en el sistema baculovirus-células de insecto es que es necesario separar a las VLPs de la progenie viral recombinante que la produjo. Para esto, se requieren de varios pasos de ultracentrifugación diferencial empleando colchones de sacarosa y gradientes de densidad de cloruro de cesio. Sería ideal contar con una metodología que permitiera separar en un único paso a las VLPs de la progenie de baculovirus, así como también de otras proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo.

Dada la naturaleza espacial de las VLPs, se las ha utilizado como carrier de epitopes foráneos. Primero mediante acoplamiento químico y luego por ingeniería genética obteniendo una fusión traduccional entre la proteína que se ensambla y el epitope de interés (20,21). Conociendo esta posibilidad, se podría realizar una fusión traduccional entre VP6 y un epitope que quede expuesto en la VLPs recombinante permita la purificación de dicha VLPs. Un oligopeptido que se suele usar en los laboratorios para purificar proteínas recombinantes es el tag de 6x-Histidinas. En condiciones de protonación adecuadas, las proteínas marcadas con este tag pueden ser fácilmente purificadas mediante una cromatografía de unión a ion metálico (IMAC) níquel.

Otro de los puntos a considerar, es en qué posición aminoacídica de la proteína VP6 es posible realizar la inserción del tag 6X-His sin afectar su capacidad de formar VLPs y que además el tag quede expuesto en su superficie. Nosotros ya conocemos estas posiciones debido a que este análisis y caracterización formó parte de la Tesis doctoral de la Dra. Andrea Peralta (22). Además, uno de los sitios caracterizados en dicha tesis doctoral, fue confirmado y utilizado por otro grupo de trabajo en una investigación independiente (23). Por todo esto seleccionamos la posición aminoacídica 311 (ubicada en un loop expuesto de VP6) para realizar la inserción del tag 6xHis.

Tres de los investigadores de este proyecto tienen experiencia en la producción de VLPs de rotavirus (VP6+VP2) en el sistema baculovirus-células de insecto (19,22). Las VLPs obtenidas en la tesis de maestría del Mg. Fernando Raibenberg, a pesar de haber trabajado sólo a escala de laboratorio, produjo VLPs suficiente como para ser utilizadas como antígeno control en ensayos de ELISA de rotavirus realizados en el Instituto

Malbrán. Faltó escalar la producción para contar con más antígeno control y con cantidad suficiente como para inmunizar conejos y obtener sueros de captura.

Dada la situación económica actual, es de vital importancia reemplazar los reactivos de importación por reactivos producidos a nivel nacional. No sólo a escala de laboratorio, sino aumentando su nivel de producción para poder trasladar el producto final a las instituciones que lo soliciten.

3. Métodos y técnicas (min. 2 páginas- máx. 4 páginas)

Indicar el trabajo de campo, documental y/o de laboratorio realizado, la forma de recolección de datos y sus fuentes. Al respecto, describir los métodos, técnicas, instrumentos y materiales utilizados para indagar el problema de investigación. Explicar las unidades de análisis, los criterios de selección de muestras o casos. Indicar asimismo las formas de procesamiento y análisis de los datos recolectados.

1-Obtención de la secuencia codificante 6xHis:

En primer lugar, se generó la secuencia codificante para el tag de 6xHis. Dado de que se trata de un oligopéptido muy pequeño, se utilizó la estrategia de formación de dúplex entre dos oligonucleótidos parcialmente superpuestos. Brevemente, se diseñaron oligonucleótidos que codifican para la secuencia de aminoácidos: GAHHHHHGA flanqueado por sitio de reconocimiento para la enzima de restricción XbaI. Estos oligonucleótidos For y Rev se superponen parcialmente en la región central por 12 bases. Se incubaron 2µg de los oligonucleótidos For y Rev en presencia de 1X buffer T7 DNA pol (0,4M Tris-HCl pH8, 1M MgCl₂, 0,1M CaCl₂, 50nM DTT, 0,5g/ml BSA), en un volumen final de 20µl, durante 5min a 70°C y 5min a 40°C. Los segmentos simple cadena se rellenaron con 3U de la enzima Klenow (NEB) en presencia de 125µM de dNTPs por 30 min a 37°C. La enzima se inactivó incubando la reacción 10 min a 70°C y se procedió a digerir el dúplex con 20U de la enzima de restricción XbaI por 2h a 37°C en un volumen final de 100µl. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo y el dúplex se precipitó mediante el agregado de 0,1 volúmenes de acetato de amonio 7,5M y dos volúmenes de EtOH 100%. Finalmente el dúplex fue resuspendido en 25 µl de Tris-HCl 10mM pH8.

2-Construcción de la fusión traduccional VP6-311-6xHis:

Se digirió con la enzima de restricción XbaI el vector pBS-VP6-311 (ya disponible en el laboratorio) que consiste en la secuencia codificante para la proteína VP6 de Rotavirus humano grupo A, que fue modificada para que en la secuencia codificante para el aminoácido 311 tenga un sitio de blanco de XbaI. Una vez realizada esta digestión, se eliminaron los grupos fosfatos de los extremos del vector linealizado mediante la acción de 5U de la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP, New England Biolabs) agregadas directamente al volumen de reacción de digestión. La reacción se incubó por 15 minutos a 37°C. Finalmente, el plásmido linealizado fue purificado mediante electroforesis en gel de agarosa y elusión mediante el kit QIAEXII.

Se cuantificó en Nanodrop tanto el dúplex como el vector linealizado (ambos digeridos con XbaI) y se realizó una reacción de ligado molecular en una relación 3:1 (inserto: vector).

Con la ligación se transformaron bacterias *E.coli* DH5alpha mediante choque térmico y se analizaron las colonias resultantes. Brevemente, a partir de 3ml de cultivo de bacterias en medio LB/Ampicilina crecido toda la noche a 37°C, las bacterias se cosecharon por centrifugación y se resuspendieron en 200µl de Solución I (Tris-HCl 25mM pH8, EDTA 10mM, glucosa 50mM). Luego

se agregaron 200 μ l de Solución II (NaOH 0,2N , SDS 1%) y finalmente se agregó 200 μ l de Solución III (acetato de potasio 3M). Luego de centrifugar a 10.000 x g durante 10 minutos, se pasó el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga limpio donde se precipitó el ADN plasmídico por el agregado de 0,6 volúmenes de isopropanol y centrifugación a 10.000 x g durante 20 minutos. Se realizó un lavado con etanol 70%, y finalmente el ADN plasmídico se resuspendió en 50 μ l de H₂O conteniendo ARNasa (100 ug/ml).

Para verificar la presencia del inserto 6xHis, los plásmidos obtenidos fueron analizados mediante digestión con la enzima XbaI. A continuación, para comprobar la integridad de la secuencia, los plásmidos seleccionados fueron enviados al Servicio de Secuenciación del INTA.

3-Clonado de VP6-311-6xHis en el vector de transferencia pFastBac1:

Con el objeto de subclonar la secuencia de VP6-311-6xHis en el vector de transferencia pFastBac1, se procedió a la digestión de la construcción pBS-VP6-311-6xHis seleccionada anteriormente, con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*. De igual manera se trató al vector receptor pFastBac1. Ambas digestiones fueron resueltas mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % y se escindieron de la agarosa las bandas correspondientes al plásmido pFastBac1 linearizado (4775 pb) y al inserto VP6-311-6xHis (1200 pb). Luego, se cuantificó mediante Nanodrop y se procedió a la reacción de ligación en una relación 3:1. Con estas ligaciones se transformaron bacterias competentes *E. coli* DH5 α por el método químico anteriormente descrito.

Se analizaron 10 colonias resultantes. Para corroborar la inserción de VP6-311-6xHis en pFastBac1, se extrajo el ADN plasmídico de estos clones como se detalló en el punto anterior y se realizaron digestiones con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI*.

4-Construcción de los baculovirus recombinantes:

El grupo ya cuenta con los baculovirus AcVP6 y Ac-VP2 (como se mencionó anteriormente, forman parte de Tesis de Maestría y Tesis Doctoral de integrantes de este proyecto) por lo que a continuación se detalla la construcción del baculovirus Ac-VP6-311-6xHis.

Con el fin de expresar VP6-311-6xHis en el sistema de expresión baculovirus células de insecto, se utilizó la metodología, Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (*Invitrogen, Life Technologies*). Este sistema tiene dos componentes; el primero es el vector de transferencia pFastBac1 que contiene el gen de interés bajo el control de un promotor fuerte de baculovirus, rodeado de secuencias del transposón Tn7. El segundo componente utiliza un bacmido (shuttle vector bMON14272, 136 kb) que replica en *E.coli* DH10Bac como un plásmido y contiene todo el genoma del baculovirus, *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV), que fue modificado de manera tal que el locus polihedrina está knockeado por una secuencia que codifica para el péptido *lacZ* α y además posee un sitio receptor de transposición mini-*att*Tn7. Este elemento es el sitio blanco para el transposón bacteriano Tn7 contenido en el vector pFastBacTM1 de transferencia. Cuando se transforman las bacterias DH10Bac con el vector pFastBacTM1 la transferencia por transposición del cassette de expresión interrumpe el marco de lectura del péptido *lacZ*, por lo tanto, las colonias recombinantes serán blancas en contraste con las colonias que tengan el bacmido inalterado que serán azules.

Entonces, con la construcción pFastBac-VP6-311-6xHis seleccionada en el punto anterior, se transformaron bacterias de la cepa de *E. coli* DH10Bac para que tenga lugar la transposición. El

bacmido recombinante se amplificó solamente en las colonias de bacterias de *E. coli* DH10Bac de color blanco que son resistentes a kanamicina, gentamicina, y tetraciclina (28).

Dado que el ADN bácmido recombinante a analizar es mayor de 135 kb se dificulta el análisis por restricción por lo tanto se procedió a verificar la presencia del inserto en el bacmido a través de la utilización de una reacción de PCR. Para esto se realizaron reacciones de PCR con los primers M13For (que hibrida en el bácmido) y VP6-rev (que hibrida en nuestra secuencia de interés). De esta manera solo hay amplificación en los bácmidos recombinantes.

5-Transfección del bácmido recombinante en células Sf9 y producción de baculovirus:

Una vez confirmados y seleccionados los bacmidos que contienen VP6-311-6xHis se procedió con la transfección del bácmido recombinante a células de insecto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) en cultivo. Para esto, se sembraron las células de insecto en una placa de cultivo de 6 pocillos en una concentración de $\sim 9 \times 10^5$ células Sf9 por pocillo. Para cada transfección se preparará la mezcla de la siguiente manera: 1-2 μ g de bácmido recombinante en medio Grace's y 6 μ l del reactivo Cellfectina. Esta mezcla estuvo en contacto con las células durante 4-5hs. Luego se retiró y se agregó medio Grace's fresco suplementado con SFB (suero fetal bovino). Las células transfectadas fueron incubadas a 27°C durante 5 días. Transcurrido ese tiempo, se cosechó el sobrenadante (virus Pasaje 0).

6-Preparación de los Pasajes 1 y 2 de los baculovirus:

A partir del sobrenadante de transfección clarificado, se infectaron 2×10^6 células Sf9 creciendo en monocapa en frascos T25 con el fin amplificar la carga viral. A cada frasco se le agregó 100 μ l de inóculo y se dejó adsorber durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se agregaron 4 ml de medio de cultivo de crecimiento Grace's suplementado con 10% SFB sin retirar el inóculo. Los frascos se incubaron durante 5 días a 27° C controlando la aparición de signos de infección cada 24 horas.

Con los baculovirus AcVP6 y AcVP2 que posee el grupo conservados a -80°C, se descongeló un vial y se infectaron 2×10^6 células Sf9 con 100ul del baculovirus descongelado. Las células se incubaron durante 5 días a 27°C.

Finalizado el tiempo de incubación, se cosecharon los sobrenadantes, se clarificó a baja velocidad y se utilizó como inóculo para realizar un Segundo Pasaje Viral.

7-Análisis de expresión de los baculovirus recombinantes:

Se cosecharon las células del segundo pasaje, se realizó un lavado con PBS y se las concentró por centrifugación. Se agregó cracking buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.01% Azul de bromo-fenol, 1% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol) y las muestras fueron desnaturalizadas mediante incubación a 95°C durante 5min. Las muestras así procesadas fueron resueltas en un gel SDS-PAGE 10% (acrilamida/bisacrilamida) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Para evaluar la expresión de las proteínas VP6, VP2 y VP6-311-6xHis, se utilizó un suero policlonal anti-rotavirus grupo A (que debe reconocer a las tres proteínas recombinantes) y un monoclonal anti-His (que debe reconocer sólo a VP6-311-6xHis).

Una vez comprobada la expresión de las proteínas de interés, se realizó una amplificación mayor de los baculovirus AcVP6, AcVP2, y AcVP6-311-6xHis para obtener el stock de trabajo.

8-Titulación de los stocks de trabajo:

Se utilizó la línea celular Sf9-GFP (Línea celular obtenida en el IABIMO, INTA-Castelar) que posee el gen de la GFP bajo el control de un promotor de baculovirus. De esta manera, las células sólo son verde fluorescente si fue infectada por un baculovirus.

Brevemente, se preparó una suspensión celular de $2,5 \times 10^5$ cel/ml, se fraccionó en tubos eppendorfs y se agregaron diluciones al décimo de los virus a titular (diluciones 10^{-4} a 10^{-8}). Con 100ul de la mezcla virus+células se sembraron pocillos de una placa de 96 wells y se incubaron durante 5 días a 27°C . Luego, al microscopio de fluorescencia, se registraron los pocillos que contengan al menos un foco de célula verde fluorescente. Finalmente, para la obtención del título viral se aplicó la fórmula de Reed y Muench.

9-Producción y purificación de las VLPs:

Para evaluar la capacidad de formar VLPs de VP6+VP2 y VP6-311-6xHis + VP2, se prepararon células de insecto Sf9 en monocapa en 6 frascos T175 a 3×10^7 células cada una, las cuales se coinfectaron con una MOI (multiplicity of infection) en una relación de baculovirus recombinantes AcVP6/AcVP2 de 0,6 usando una MOI de 4 para VP6 y una moi de 7 para VP2 (datos obtenidos previamente por el grupo). Luego de 5 días de incubación, se cosecharon los sobrenadantes que fueron clarificados y se procedió a la purificación de las VLPs.

10-Purificación de VLPs VP6+VP2:

El sobrenadante clarificado se sometió a una ultracentrifugación en colchón de sacarosa 35 % (p/p) en buffer TMNC (10 mM Tris-HCl pH 7, 1mM MgCl_2 , 150 mM NaCl, 10 mM CaCl_2) a 24.000 rpm durante 90 minutos a 10°C en una ultracentrífuga BECKMAN rotor 45Ti. Cada pellet resultante se resuspendió en 300 μl de buffer TMNC pH 7 que se sembró en un gradiente de CsCl (densidad – $1,32 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Se realizó una ultracentrifugación a 39.000 rpm durante 18 hs a 10°C rotor SW 55, BECKMAN. Posteriormente se la banda opalescente, que se diluyó en buffer TMNC para eliminar el CsCl y se concentró por una subsiguiente ultracentrifugación a 24.000 rpm durante 90 minutos a 10°C rotor SW 41 BECKMAN. El pellet obtenido se resuspendió en buffer TMNC y se analizó mediante western blot.

11-Purificación de VLPs VP6-311-6xHis + VP2:

Al sobrenadante clarificado se le midió el pH y se intentó ajustar a pH8. Se incubó este sobrenadante con cantidad necesaria de resina Ni-NTA (QIAGEN) durante 2hs a temperatura ambiente. Todo el proceso de purificación por IMAC se realizó “in bach” lo que simplifica el proceso ya que se puede realizar empleando tubos de tipo Falcon y centrífugas de mesa.

4. Resultados y discusión (min. 5 páginas- máx. 15 páginas)

Desarrollar los resultados, en relación a los objetivos del proyecto, especificando (de ser posible) los siguientes aspectos:

- nuevos conocimientos obtenidos sobre los casos o unidades bajo estudio.
- avances en materia de conocimiento científico sobre el tema bajo estudio, formulación de enfoques originales e innovadores (modelos, conceptos, etc.).
- Contribuciones para la resolución de problemas específicos y/o formulación de herramientas de intervención, diseño o mejora de productos y procesos.

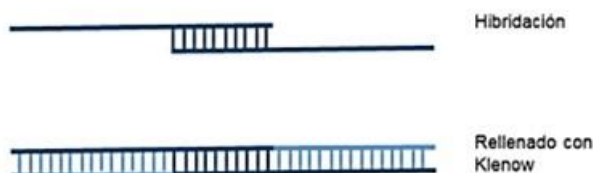
Por último, desarrollar las conclusiones y reflexiones finales a las que se llegó luego de la investigación, en relación a los interrogantes y objetivos planteados.

Síntesis de la secuencia codificante 6xHis:

Con el fin de generar la secuencia codificante para el tag de 6xHis que será incorporado en la región 311 de la proteína VP6, se formó un dúplex de dos oligonucleótidos parcialmente superpuestos.

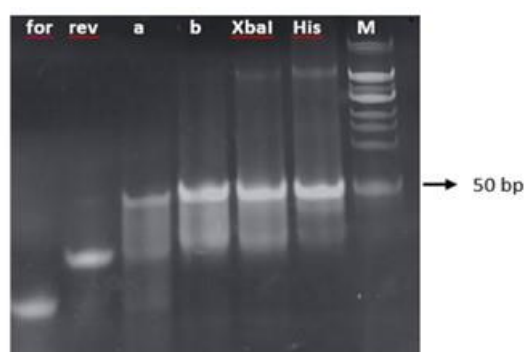
Oligonucleótidos	Secuencia 5' → 3'
311His-Forward	AATCTAGAGGTGGACATCACCACCACCAT
311His-Reverse	ATTCTAGATGCTCCGTGATGGTGGTGGTG

Tabla 1. Secuencia de primers para la síntesis del tag 6xHis. Las bases subrayadas indican la zona de complementación de bases. En verde se indican las bases que forman el sitio blanco para la enzima de restricción XbaI.



Estos oligonucleótidos diseñados se superponen parcialmente en la región central por 12 bases que, luego de rellenar con la enzima Klenow, se obtiene una secuencia corta que codifica para la secuencia de aminoácidos GAHHHHHHGA. El dúplex de 50pb que generamos, se encuentra flanqueado por el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción XbaI.

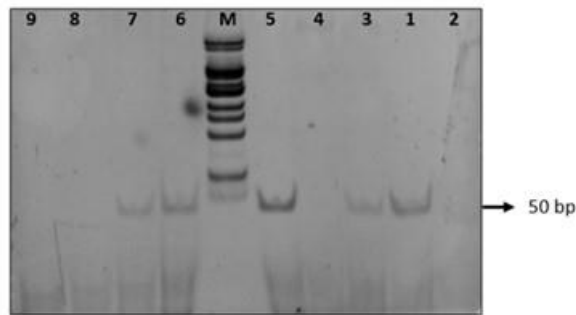
En la siguiente fotografía se presenta la tinción de un gel de poliacrilamida 12%, donde se evidencia la banda correspondiente al epítopo sintetizado 6xHis de un tamaño de 50 pb. De esta forma, logramos sintetizar el tag de 6xHis.



Síntesis de la secuencia codificante 6xHis. Referencias: (*for y rev*): oligos utilizados; (*a*): hibridación de los oligos, (*b*): rellenado con Klenow; (*XbaI*): digestión con XbaI, (*His*): purificación final. *M*: marcador de peso molecular de 50 bp

Obtención de la secuencia VP6-311-6xHis:

Una vez obtenido el dúplex 6xHis digerido con la enzima XbaI, también se digirió la construcción pBS-VP6-311 (construida previamente por nuestro grupo) con XbaI. Se realizó la ligación y transformación de bacterias *E. coli* DH5alpha. Se analizaron 10 colonias resultantes mediante minipreparaciones de ADN y análisis por digestión con la enzima de restricción XbaI.

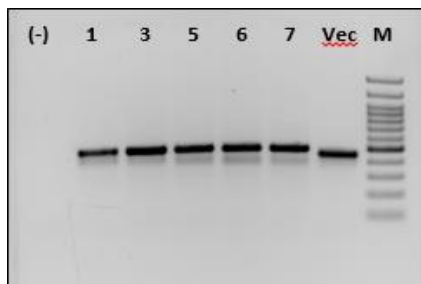


Se obtuvieron cinco clones con la secuencia de interés incorporada.

A continuación, para determinar el número de copias 6xHis incorporadas, se realizó una PCR utilizando los *primers* 235-up y 382-low que hibridan en la secuencia de VP6 como se indica en el siguiente esquema:



Debido a que la región amplificada por estos *primers* tiene un tamaño aproximado de 441 bp, se espera que aquellos clones que contienen una sola copia del inserto 6xHis amplifiquen un producto de tamaño de 491 bp (441 bp + 50 bp del inserto).

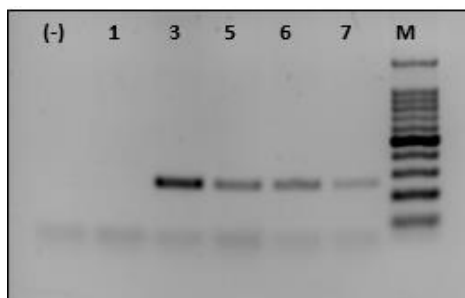


Los cinco clones amplifican 491pb, por lo que tendrían una sola copia del inserto 6xHis.

Por último, se utilizó una PCR con los *primers* 311His-For y 382-low para determinar la orientación del inserto en los clones evaluados:



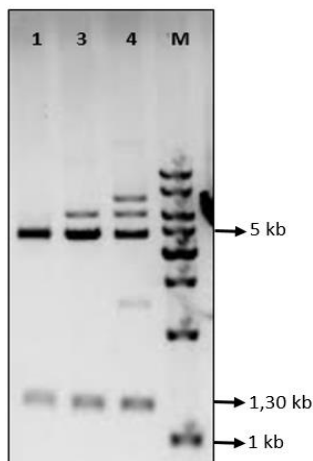
El resultado se puede observar en la siguiente figura:



Se observa que cuatro de los cinco clones poseen el inserto 6xHis en la orientación correcta. Para continuar con el trabajo, se seleccionó la construcción pBS-VP6-311-6xHis clon 5.

Clonado de VP6-311-6xHis en el vector pFastBac1:

Con el fin de obtener baculovirus que expresen nuestra proteína de interés, es necesario subclonar la secuencia VP6-311-6xHis desde el vector pBS hacia el vector pFastBac1. Para esto, se llevó a cabo la digestión de la construcción pBS-VP6-311-6xHis y del vector receptor pFastBac1 con la enzima de restricción *Bam*HI. Luego de la ligación y transformación de bacterias DH5alpha, se analizaron los plásmidos extraídos de las cuatro colonias resultantes mediante digestión con la enzima de restricción *Bam*HI.



Electroforesis de la digestión con *Bam*HI de los clones pFastBac-VP6-6xHis. Se observa el tamaño del inserto (VP6-6xHis) de 1300pb y del vector linealizado.

Luego, para determinar la orientación del inserto VP6-6xHis, se realizó una digestión con la enzima de restricción *Pst*I. De esta manera, se determinó que el clon pFastBac-VP6-6xHis correcto para continuar con el proyecto es el clon 3.

Obtención del baculovirus recombinante AcVP6His:

Una vez obtenido el clon pFastBac-VP6-6xHis se transformaron bacterias DH10bac para lograr la transposición del cassette de interés en el báculo que posee la bacteria.

Del cribado de bacterias por resistencia a los antibióticos kanamicina, gentamicina y tetraciclina y el fenotipo frente a X-Gal, se analizaron mediante PCR 15 colonias de fenotipo blanco más 1 colonia de fenotipo azul como control.

La primer PCR se realizó con los *primers* 14-up (que hibrida en la secuencia de VP6) y M13-for (que hibrida en el báculo). Esta PCR nos indicó que todos los clones blancos eran recombinantes. Pero la segunda PCR, que se realizó con los *primers* M13For y M13Rev (nos indica presencia de báculo wild type), nos señaló que sólo cuatro báculos no estaban contaminados con báculo wt.

Por este motivo, seleccionamos a uno de ellos: el báculo recombinante 8.

Con este báculo, se transfectaron células de insecto S9 en monocapa, tal como se indica en metodología.

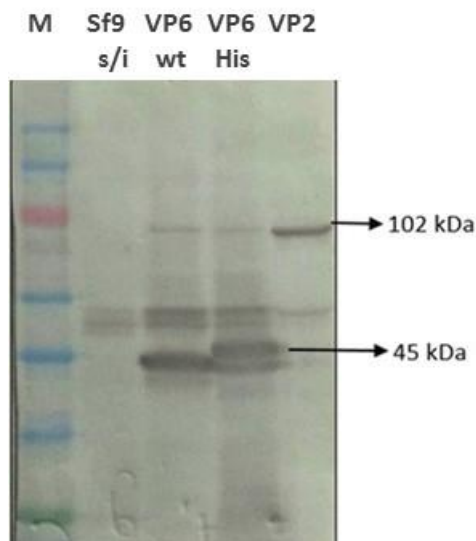
Luego de 5 días de incubación, se cosechó el sobrenante (SN) sin que las células presentaran signos de infección. Con este primer SN (pasaje 0) se infectaron células Sf9 creciendo en

botellas T25. Transcurridos 5dpi, las células sí presentaron el característico efecto citopático causado por baculovirus (células con borde rugoso y pérdida de adherencia). Se cosechó el SN (pasaje 1) y se realizó un segundo pasaje de la misma manera.

El grupo de trabajo ya poseía los baculovirus recombinantes AcVP2 y AcVP6 (que expresan las proteínas VP2 y VP6 *wild type* de rotavirus) conservados a -80°C. Con 100 µl de estos inóculos, se infectaron células Sf9 y se realizaron dos pasajes sucesivos.

Expresión de las proteínas recombinantes:

Con las células de los segundos pasajes, se obtuvo un extracto proteico que fue analizado mediante ensayo de western blot para determinar la expresión de las proteínas de interés.



Expresión de las proteínas recombinantes. Ensayo de western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti rotavirus.

El revelado del *Western blot* demostró que los baculovirus obtenidos expresan las proteínas VP6wt, VP6His y VP2. Una vez comprobado esto, se procedió a obtener un stock de trabajo de cada uno de los baculovirus.

Titulación del stock de trabajo:

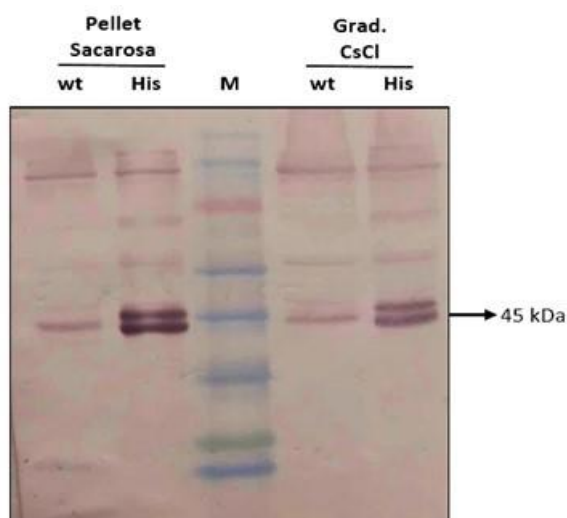
Se utilizó la línea celular Sf9-GFP, que posee el gen de la proteína GFP bajo el control de un promotor de baculovirus. De esta manera, sólo se observan células fluorescentes si fueron infectada por un baculovirus. Se trabajó en placas de 96 pocillos y con diluciones seriadas al décimo para cada virus. Al 5dpi, las placas se observaron bajo el microscopio de fluorescencia y se contaron el número de pocillos con al menos un foco verde fluorescente (pocillo positivo) y el número de pocillos negativos para cada dilución. Luego, se aplicó la fórmula de Reed y Muench.

A continuación, se muestran los títulos obtenidos para virus

AcVP2	2,6x10 ⁸ ufp/well
AcVP6wt	1,7x10 ⁸ ufp/well
AcVP6His	2,1x10 ⁸ ufp/well

Evaluación de formación de VLPs:

Para evaluar si VP6-His y VP2wt podían ensamblarse y formar VLPs, se realizaron coinfecciones con AcVP2 y AcVP6His en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos. Como control, se realizaron coinfecciones entre AcVp2 y AcVP6wt. A los 5 dpi se cosecharon los sobrenadantes de las coinfecciones. El sobrenadante clarificado se sometió a ultracentrifugación en colchón de sacarosa y posterior gradiente de CsCl. El pellet recuperado en el último paso, se analizó mediante ensayo de western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-rotavirus.



El análisis demostró que hay presencia de partículas multiméricas compatibles con VLPs en la muestra de VP6His + VP2, comportándose de igual manera que las proteínas VP6+VP2.

Logros alcanzados:

La mayor parte de los resultados fueron presentados como Trabajo Final Integrador (TFI) de la estudiante Luciana Ramírez, asociada a este proyecto. Con este plan, Luciana obtuvo una beca de Iniciación a la Investigación de la CIC-PBA. La nota obtenida en la defensa del TFI fue 10.

A pesar de las dificultades que encontramos, creemos que estamos ante una estrategia biotecnológica que podría ser desarrollada y aprovechada en el futuro.

5. Nuevos interrogantes y líneas de investigación a futuro

Consignar si la investigación hizo surgir nuevos interrogantes o si emergieron potenciales líneas de investigación a desarrollarse en el futuro a partir de los hallazgos.

Queremos determinar si realmente nuestras VLPs VP6His+VP2 exponen el epítopo 6xHis en la superficie y por lo tanto se facilita su purificación. Dadas las dificultades encontradas en ajustar el pH del sobrenadante (ver más adelante en Parte II sección 1), pensamos dos opciones:

Cosechar el SN y realizar una centrifugación a través de colchón de sacarosa. El pellet obtenido se puede resuspender en un buffer a pH8, ideal para determinar la interacción con la resina Ni-NTA.

Utilizar los multímeros VP6His que quedan retenidos en la célula. Pero además de resuspender las células en buffer nativo a pH8, se debe agregar un paso de sonicado para producir la lisis celular y que los multímeros no queden asociados a los restos de membranas celulares. En un futuro, queda probar estas dos opciones.

6. Bibliografía (mín. 2 página- máx. 4 páginas)

Consignar los textos y fuentes utilizados en la redacción de los campos anteriores.

1-Parashar, U.D., Gibson, C.J., Bresee, J.S., Glass, R.I., 2006. Rotavirus and severe child-hood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 304–306.

2- Liu, L., Johnson, H.L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J.E., Rudan, I., Campbell, H., Cibulskis, R., Li, M., Mathers, C., Black, R.E., Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF, 2012. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 379: 2151–2161.

3- He, B., Yang, F., Yang, W., Zhang, Y., Feng, Y., Zhou, J., Xie, J., Feng, Y., Bao, X., Guo, H., Li, Y., Xia, L., Li, N., Matthijssens, J., Zhang, H., Tu, C., 2013. Characterization of a novel G3P [3] rotavirus isolated from a lesser horseshoe bat: a distant relative of feline/canine rotaviruses. *J. Virol.* 87: 12357–12366

4-Kindler, E., Trojnar, E., Heckel, G., Otto, P.H., Johne, R., 2013. Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. *Infect. Genet. Evol.* 14: 58–67

5-Otto, P.H., Ahmed, M.U., Hotzel, H., Machnowska, P., Reetz, J., Roth, B., Trojnar, E., Johne, R., 2012. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. *Vet. Microbiol.* 156: 8–15

6- Tate, J.E., Burton, A.H., Boschi-Pinto, C., Steele, A.D., Duque, J., Parashar, U.D., 2012. WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network, 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 12: 136–141.

7-Fields B.N., Knipe D.M., and Howley P.M. 1996. *Virology*, third edition. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia.

8-Estes, M.K. and A.Z. Kapikian, *Rotaviruses*, in *Fields Virology*, B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley, Editors. 2007, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA.

9-Brandt, C.D., Kim, H.W., Rodriguez, W.J., Thomas, L., Yolken, R.H., Arrobio, J.O., Kapikian, A.Z., Parrott, R.H., Chanock, R.M., 1981. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J. Clin. Microbiol.* 13: 976–981.

10- Welter, M.W., et al., Adaptation and serial passage of porcine group C rotavirus in ST-cells, an established diploid swine testicular cell line. *Arch Virol*, 1991. **120**(3-4): p. 297-304.

11- Clapp L., and Patton J.T. (1991). Rotavirus morphogenesis: domains in the major inner capsid protein essential for binding of single-shelled particles and for trimerization. *Virology*. 180: 697-708.

12- Tosser G., Labbé M., Brémont M., and Cohen J. (1992). Expression of the major capsid protein VP6 of group C Rotavirus and synthesis of chimeric single-shelled particles by using recombinant baculoviruses. *J. Virol.* 66(10): 5825-5831.

13- Lepault J., Petitpas I., Erk I., Navaza J., Bigot D., Dona M., Vachette P., Cohen J., and Rey F.A. (2001). Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *The EMBO Journal*. 20(7): 1498-1507.

14- Mathieu M., Petitpas I., Navaza J., Lepault J., Kohli E., Pothier P., Venkataram Prasad B.V., Cohen J., and Rey F.A. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *The EMBO Journal*. 20(7): 1485-1497.

15- Crawford S.E., Labbe M., Cohen J., Borroughs M.H., Zhou Y.J., and Estes M.K. (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.*, **68**:

- 16-Peralta A., Molinari MP, Taboga O. 2009. Chimeric recombinant rotavirus-like particles as a vehicle for the display of heterologous epitopes. *Virology Journal*. 6:192.
- 17- Coste A., Sirard J.C., Johansen K., Cohen J., and Kraehenbuhl J.P. (2000). Nasal immunization of mice with virus-like particles protects offspring against rotavirus diarrhea. *J. Virol.* 74(19): 8966-8971.
- 18- Fernandez F.M., Connors M.E., Hodgins D.C., Parwani A.V., Nielsen P.R., Crawford S.E., Estes M.K., and Saif L.J. (1998). Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed dolostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccine. *Vaccine*. 16(5): 507-516
- 19- Tesis de Maestría: "Clonado y expresión de la proteína estructural de cápside VP6 de Rotavirus Humano A en el sistema baculovirus-células de insecto". 2015. Autor: Fernando Raibenberg, Directora: Andrea Peralta. Maestría en Microbiología Molecular ANLIS-USAM.
- 20- Frenchick P.J., Sabara M.I.J., Ready K.F.M., and Babiuk L.A. (1992). Biochemical and immunological characterization of a novel peptide carrier system using rotavirus VP6 particles. *Vaccine*. 10(11): 783-791.
- 21-Cheong WS, Reiseger J, Turner S, Boyd R, Netter HJ. (2009). Chimeric virus-like particles for the delivery of an inserted conserved influenza A-specific CTL epitope. *Antiviral Research* 81: 113-122.
- 22- Tesis doctoral: "Desarrollo de partículas semejantes a virus (VLPs) basadas en la proteína VP6 de rotavirus como sistema de presentación de antígenos heterólogos". 2006. Autora: Andrea Peralta, Director: Oscar Taboga. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- 23- De Lorenzo G., Eichwald C., Schraner E.M., Nicolin V., Bortul R., Mano M., Burrone O.R. and Arnoldi F. 2012. *Journal of General Virology*.
- 24- Loudon P.T., and Roy P. (1991). Assembly of five bluetongue virus proteins expressed by recombinant baculoviruses: inclusion of the largest protein VP1 in the core and virus-like proteins. *Virology*. 180(2):798-802.
- 25- Bräutigam S., Snezhkov E., and Bishop D.H. (1993). Formation of poliovirus-like particles by recombinant baculovirus expressing the individual VP0, VP3 and VP1 proteins by comparison to particles derived from the expressed poliovirus polyprotein. *Virology* 192: 512-524
- 26- An K., Gillock E.T., Sweat J.A., Reeves W.M., and Consigli R.A. (1999). Use of the baculovirus system to assemble polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *J. Gen. Virol.* 80: 1009-1016.
- 27- Hagiwara K., Higashi T., Namba K., Uehara-Ichiki T., and Omura T. (2003). Assembly of single-shelled cores and double-shelled virus-like particles after baculovirus expression of major structural proteins P3, P7 and P8 of Rice dwarf virus. *J. Gen. Virol.* 84: 981-984.
- 28- Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Technical manual, Version D 6 April 2004 10359. Invitrogen life technologies. Disponible en: www.lifetechnologies.com.
- 29-Jeong KH, Kim HJ, Kim HJ. Current status and future directions of fish vaccines employing virus-like particles. *Fish Shellfish Immunol*. 2020 May;100:49-57
- 30-Watanabe S, Fujimoto Z, Mase M. Development of immunogenic chimeric virus-like particles based on bovine papillomavirus type 6. *Vaccine*. 2020 Nov 17;38(49):7774-7779.
- 31-Guo Y, Guo R, Ma Y, Chang W, Ming S, Yang G, Guo Y. Chimeric Virus-like Particles of Universal Antigen Epitopes of Coronavirus and Phage Qbeta Coat Protein Trigger the Production of Neutralizing Antibodies. *Curr Top Med Chem*. 2021 Oct 5;21(14):1235-1250.
- 32-Rangel G, Bárcena J, Moreno N, Mata CP, Castón JR, Alejo A, Blanco E. Chimeric RHDV Virus-Like Particles Displaying Foot-and-Mouth Disease Virus Epitopes Elicit Neutralizing Antibodies and Confer Partial Protection in Pigs. *Vaccines (Basel)*. 2021 May 7;9(5):470.