

OBTENCIÓN DE BACs BASADOS EN EL VIRUS DE LA PSEUDORRABIA SIN LAS SECUENCIAS DE EMPAQUETAMIENTO POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN *E. COLI*

BACs OBTAINING BASED ON PSEUDORABIES VIRUS WITHOUT PACKAGING SEQUENCES BY HOMOLOGOUS RECOMBINATION IN *E. COLI*

*Lourdes Varela Prieto*¹

RESUMEN

Los vectores basados en herpes simplex presentan grandes ventajas, tales como ser neurotrópicos, eficiente infección, establecimiento de latencia, capacidad para transportar grandes cantidades de ADN, pero también presentan un gran inconveniente al ser un virus patogénico para humanos, que aunque sufra modificaciones para alterar su virulencia esta nunca puede ser descartada. Las secuencias de empaquetamiento (pac) son necesarias para el correcto corte y empaquetado del virus y se encuentran ubicadas en los fragmentos BamHI-13 y 14' respectivamente, con un tamaño de 3,2 Kpb. El objetivo del estudio fue obtener BACs basados en el virus de la pseudorrabia sin las secuencias de empaquetamiento (pac). La modificación de los BACs de PRV se hizo por recombinación homóloga en células DH10B y la recombinación se comprobó por análisis de hibridación.

Palabras clave: Amplicones, Pseudorrabia, Recombinación homóloga, Secuencias pac.

ABSTRACT

The herpes simplex virus-based vectors have great advantages such as being neurotropic, efficient infection, establishment of latency, capacity to transport large amounts of DNA, but also have a major drawback being a pathogenic virus for humans, even undergoing modification to alter its virulence it can never be ruled out. Packaging sequences (pac) are necessary for correct cutting and packaging of the virus and are located in BamHI fragments 13 and 14' respectively with a size of 3.2 Kpb. The objective of the study was to obtain BACs based on pseudorabies virus without packaging sequences (pac). PRV BACs modifying was made using homologous recombination into DH10B cells and recombination was verified by hybridization analysis.

Keywords: Amplicons, Pseudorabies, Homologous recombination, Pac sequences.

Recibido: Julio 4 de 2012

Aceptado: Octubre 22 de 2012

1 PhD(c). Centro de Investigaciones Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Libre Seccional Barranquilla. lvarela@unilibrebaq.edu.co

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se cuenta con una limitada colección de vectores para la transferencia de genes. Los basados en herpes simplex (HSV) presentan varias ventajas como su amplio rango de anfitriones, eficiente infección, establecimiento de latencia en neuronas, permanencia a largo plazo, capacidad para transportar grandes cantidades de ADN exógeno y capacidad para liberar genes en células post-mitóticas.

Los vectores basados en herpes incluyen tanto los virus recombinantes como el sistema de amplicones; este último se basa en crear virus herpes defectivo en plásmidos, que se pueden usar como vectores (1 - 4). Los amplicones basados en HSV-1 son plásmidos bacterianos con un origen de replicación de HSV-1 y las señales de empaquetamiento (*pac*) del virus (5); tiene además un origen de replicación de *E. coli* y un gen de resistencia a antibióticos. El empaquetamiento del ADN del amplicon involucra la expresión de varias funciones de un virus ayudante que debe ser defectivo (6), con el fin de que no pueda replicarse autónomamente en tejidos normales y solo pueda hacerlo en células permisivas.

El genoma completo del virus de la pseudorrabia se encuentra clonado como cromosoma artificial bacteriano (BACs de PRV) o plásmido "F" (6), lo cual permite su modificación, replicación y amplificación autónoma en *E. coli*. El BACs se mantiene estable en la célula huésped y se propaga como un clon infeccioso (6 - 8).

Las secuencias de empaquetamiento (*pac*) son necesarias para el correcto corte y empaquetado del virus y se encuentran ubicadas en los fragmentos BamHI-13 y 14' respectivamente, con un tamaño

de 3,2 Kpb. En el genoma de PRV los fragmentos terminales son el 14' por la izquierda y el 13 por la derecha. El objetivo de este estudio fue la construcción de BACs modificados, sin la secuencia que proporcione las funciones necesarias para que el amplicon pueda empaquetarse.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células y virus

Célula DH10B: línea celular derivada de *Escherichia coli*, deficientes en *RecA*, se cultivaron a 37°C durante 16 horas en medio Luria Bertani (LB) estéril.

Nia-3: cepa virulenta de PRV

pBecker-2: genoma del PRV clonado como BACs (6, 7).

Transformación de bacterias por electroporación

Se utilizaron cubetas de 2 mm de diámetro enfriadas previamente. Las células se descongelaron en hielo, en el que se mantuvieron hasta añadir el ADN plasmídico en una concentración de 50 ng y se incubaron por un minuto. Inmediatamente las células se expusieron a un pulso eléctrico, resuspendiéndolas más tarde en medio SOC (MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM, bactotropina al 2%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM) y se incubaron por 1 hora a 37°C. Después de la incubación las células se sembraron en diferentes medios de selección.

Recombinación del BACs de PRV en células DH10B

Las modificaciones del BACs de PRV (pBecker-2) se hicieron utilizando el plásmido pGETrec para facilitar la recombinación homóloga específica entre el BACs y el gen de resistencia a la kanamicina (8). Se prepararon células competentes doblemente resistentes e inducidas con L-Arabinosa al 0,2% (8). El gen de la kanamicina se obtuvo por digestión con BamHI del plásmido pCLSKan.

Aislamiento de ADN plasmídico

Se utilizaron columnas de la casa comercial Qiagen. Para las midipreparaciones se usó el kit de Qiagen-tip-100 y para aislar y purificar el ADN de los BACs el kit Qiagen-tip-500 sin exonucleasas.

Electroforesis de campo pulsante

Los análisis de los ADNs de los BACs de PRV se hicieron por medio de geles de agarosa (Sigma A5959 al 1%) en electroforesis de campo pulsante, en buffer TBE al 0,5X (9). Se utilizaron dos programas: 200 voltios por 16 horas a 14°C con tiempo constante de 5 segundos y otro de 200 voltios, 16 horas a 14°C usando una rampa de uno a tres segundos como pulso.

Marcaje radiactivo y purificación de sondas

La sonda de ADN (kanamicina) se marcó con a 32P-dCTP, usando el kit comercial Megaprime TM DNA labellingsystem, Amersham. Para la purificación se utilizaron columnas de sephadex G-50. Las columnas se empaquetaron por centrifugación a 1.500g durante cuatro minutos (9).

Southernblot

Los ADNs fueron digeridos con enzimas de restricción y los fragmentos se separaron en geles de agarosa al 0,75% en Loenning Buffer 1/2X a 38 voltios y temperatura ambiente. La transferencia en membranas de nitrocelulosa se hizo mediante capilaridad dejándolas toda la noche en buffer de transferencia (9). La membrana se neutralizó con SSC2X y se fijó con luz ultravioleta por cuatro minutos.

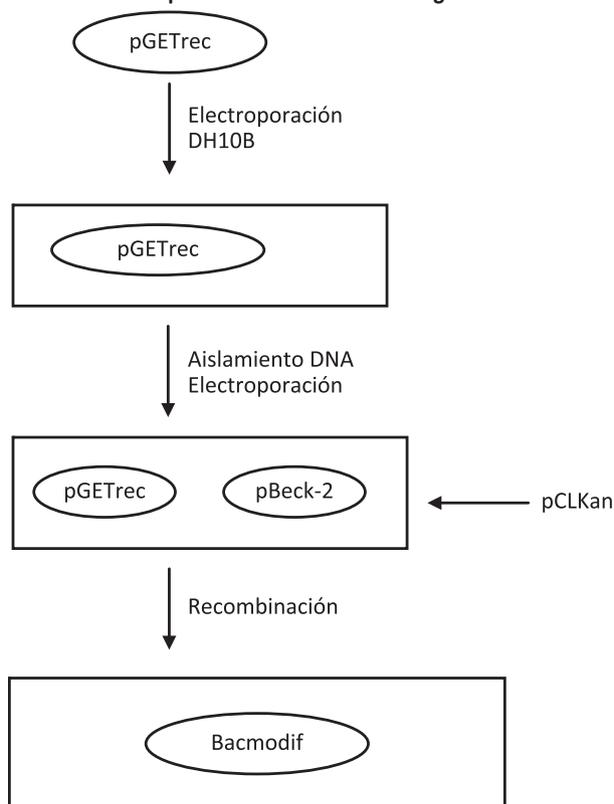
En la prehibridación se usó SSC 6X, solución Denhart a 65°C durante una hora (10) en el horno de hibridación. La hibridación finalizó 16 horas más tarde a 65°C. Se hicieron lavados con mezcla de SSC y SDS a diferentes concentraciones; seguidamente las membranas se expusieron a autorradiografías.

RESULTADOS

Obtención de BACs de PRV sin secuencias pac

La recombinación de las regiones homólogas entre las secuencias pac del BAC de PRV y el fragmento correspondiente al gen de la kanamicina generó varios clones recombinantes. Figura 1.

Figura 1. Estrategia de obtención de los BACs (PRV) por recombinación homóloga



Fuente: Elaboración del autor

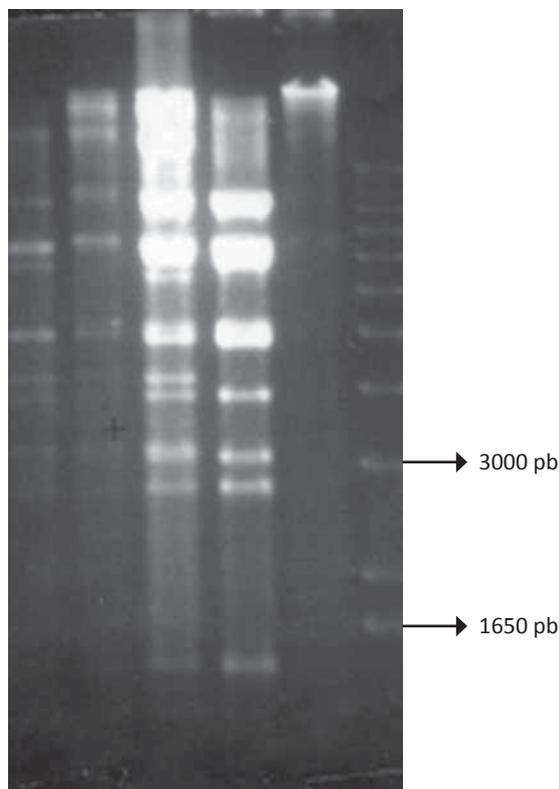
La estabilidad de estos clones modificados se comprobó por análisis de restricción con BamHI, usando como controles positivos ADNs de pBecker-2 (BAC de PRV) y Nia3 (virus silvestre). Figura 2.

En este ensayo de confirmación se observa que los patrones de restricción tanto del BAC 17 (canal 2) como del BAC 18 (canal 3) tienen correspondencia con los controles positivos (canales 1 y 5). En el BAC 25 (canal 4) se nota la pérdida de las bandas

de mayor tamaño. El fragmento donde se encuentran las secuencias pac tiene un tamaño de 3,2 Kb.

Asimismo, se demostró que la obtención de estos BACs modificados garantiza la obtención de grandes cantidades de ADN (Figura 2).

Figura 2. Electroforesis campo pulsado con bandas BamHI:
1. Nia3; 2. B17; 3. B18; 4. B25; 5. pBecker-2; 6. Ladder-1Kb

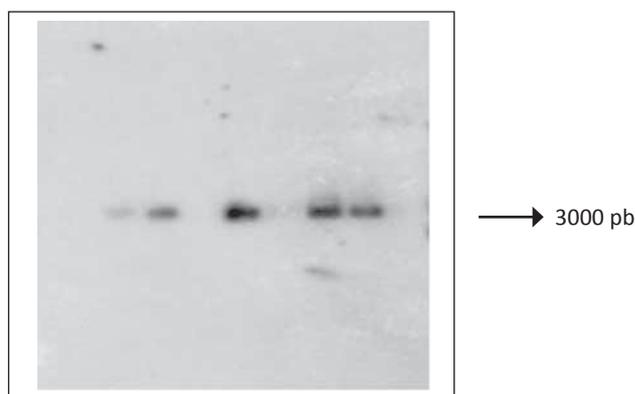


Análisis de la recombinación homóloga

La hibridación demostró la inserción de la secuencia del gen de resistencia a la kanamicina en los recombinantes estudiados. Los sitios específicos de hibridación se indican en la Figura 3.

Como era de esperarse, en los canales 1 y 8 no se observa ninguna banda a la altura de los 3000 pb, lo que indica que la secuencia correspondiente al gen de la kanamicina no está presente en los controles negativos. Se demostró que el gen de la kanamicina en los recombinantes está localizado en

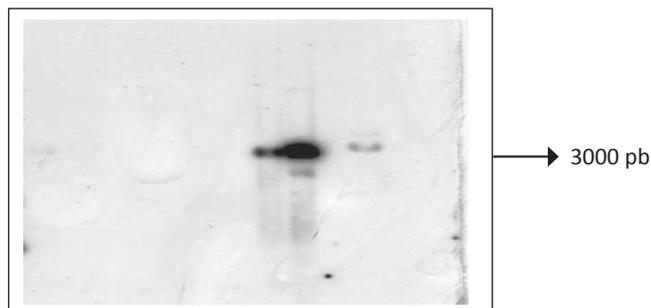
Figura 3. Análisis de hibridación para el gen de la kanamicina:
1. Nia3; 2. B17; 3. B18; 4. B25; 5. B30; 6. B18;
7. B44; 8. pBecker-2



el fragmento BamHI 13+14', que corresponde a una banda de tamaño aproximado de 3,2 Kb.

La presencia de las secuencias pac en los recombinantes y en los controles positivos se ilustra en la Figura 4, en la que se observa una banda de tamaño aproximado de 3 Kb en los canales 1, 5 y 6 que corresponden a Nia3, pBecker-2 y al plásmido pCLS respectivamente, el cual fue usado como control positivo ya que tiene clonado los fragmentos BamHI 13 y 14', donde se encuentran las secuencias de empaquetamiento.

Figura 4. Análisis de hibridación secuencias pac:
1. Nia3; 2. B17; 3. B18; 4. B25; 5. pBecker-2; 6. pCLS; 7. Nia3



De todos los clones seleccionados como posibles candidatos, el BAC 25, dio negativo en los ensayos de Southernblot.

DISCUSIÓN

Por medio de este estudio se evidencia que el plásmido pGETrec se puede utilizar para inducir recombinación homóloga, debido a la alta eficiencia específica que tiene para recombinar en *E. coli*, sin generar otro tipo de ordenamiento en las secuencias génicas (8).

Los resultados de la hibridación demostraron la recombinación específica entre las secuencias de empaquetamiento (pac) y el gen de la kanamicina. Vale la pena resaltar que la baja intensidad de la banda en el canal de Nia3, de la Figura 4 probablemente es debido a la calidad del ADN utilizado para la hibridación.

La utilidad de producir virus defectivos de PRV, para ser utilizados como virus ayudadores en el sistema de amplicones radica en que los vectores basados en PRV pueden ser una alternativa para terapia génica en humanos teniendo en cuenta que no producen patologías en ellos (11), mientras que los vectores de HSV que son utilizados en terapia génica (12, 13) tienen la desventaja de que se pueden recombinar con los virus latentes presentes en el individuo. Otra dificultad es la existencia de anticuerpos presentes en la población humana, dado que la mayoría de ella ha desarrollado infección por estos virus.

La calidad y cantidad de ADN obtenido a partir de los BACs modificados, facilitaría la transfección de células junto con plásmidos de amplicones de PRV y de esta manera conseguir títulos altos de amplicones.

CONCLUSIÓN

La recombinación homóloga se comprobó por Southernblot. De los recombinantes analizados, se propone a los clones BAC-17 y BAC-18 como virus helper en la producción de amplicones basados en PRV.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Libre Seccional Barranquilla, por el apoyo financiero para la ejecución del proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Frenkel N, Vlazny D, Locker H. Eukaryotic Viral Vectors. Edited by Y. Guzman. Cold Spring Harbor, N. Y.; 1982.
2. Kwong AD, Frenkel N. Herpes simplex virus amplicon: effect of size on replication of constructed defective genome containing eukaryotic DNA sequences. *J. Virol.* 1984; 51:595-603.
3. Fraefel C, Jacoby DR, Braekefield XO. Herpes simplex virus type 1-based amplicon vector systems. *Adv Virus Res.* 2000; 55:425-51.
4. Saeki Y, Braekefield XO, Chiocci EA. Improved HSV-1 amplicon packaging system using ICP27-deleted, oversized HSV-1 BAC DNA. *Methods. Mol Med.* 2003; 76:51-60.
5. Spaete R, Frenkel N. The herpes simplex virus amplicon: a new eucaryotic defective virus cloning-amplifying vector. *Cell.* 1982; 30(1):295-304.
6. Saeki Y, Ichikawa T, Saeki A, Chiocci EA, Tobler K, Ackermann M, et al. Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum Gen Ther.* 1998; 9:2787-94.

7. Smith GA, Enquist LW. A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpes virus pathogenesis. *Proc. Natl. Acad.* 2000; 97:4873-8.
8. Narayanan K, Williamson R, Zhang Y, Stewart AF, Ioannou PA. Efficient and precise engineering of a 200 Kb B-globin human/bacterial artificial chromosome in *E. coli* DH10B using an inducible homologous recombination system. *Gene Therapy*. 1999; 6:442-7.
9. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.; 2001.
10. Tabares E. Detection of DNA viruses by radioactive DNA probes: application to African swine fever virus. *Arch Virol.* 1987; 92:233-42.
11. Enquist LW, Husak PJ, Banfield BW, Smith GA. Infection and spread of alphaherpesviruses in nervous system. *AdvVirus Research*. 1998; 51:237-347.
12. Tyler CM, Wuertzer CA, Bowers WJ, Fedoroff HJ. HSV amplicons: Neuro applications. *Curr. Gene Ther.* 2006; 6:337-50.
13. Winkeler A, Sena-Estevés M, Paulis LE, Li H, Waerzeggers Y, Ruckriem B, et al. Switching on the lights for gene therapy. *Plos One*. 2007; 2:e528.