

***Capítol 5. Estudis de l'antigenicitat de
l'epítóp neutralitzant del VHE.***



5.1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

El VHE és la principal causa d'hepatitis agudes en països subdesenvolupats, però no existeix fins al moment cap vacuna disponible. La incapacitat de fer créixer el VHE en cultiu cel·lular i el baix títol de partícules víriques excretades en femta no han permès una bona caracterització bioquímica del virus. Mitjançant tècniques moleculars s'han identificat 4 grans genotips i un únic serotip. Els únics models disponibles per estudiar la resposta contra el VHE són models animals, principalment el primats no-humans com ximpanzés i macacs. Tsarev i col (1994b) van dissenyar una vacuna recombinant consistent en una forma truncada de la proteïna de la càpside que va estimular en macacs una resposta humoral protectora contra la infecció per soques del mateix genotip (genotip 1) i d'altres (genotips 2 i 3). Altres investigadors van observar que la inoculació de sèrum anti-VHE provinent d'un animal convaléscent d'una infecció per VHE disminuïa considerablement l'excreció del virus en femta i evitava la malaltia per infecció amb una soca homòloga. Aquests resultats suggereixen que preparats d'immunoglobulines similars als utilitzats pel VHA, podrien protegir contra la infecció pel VHE.

L'epítóp neutralitzant del genoma del VHE descrit fins ara està codificat per la regió ORF2. Es troba localitzat cap a l'extrem C-terminal de la proteïna de la càpside. Meng i col. (2001) determinaren que el fragment mínim de la proteïna de la càpside del VHE que pot modelar eficaçment l'epítóp neutralitzant té una longitud de 166 aa, i està localitzat entre els aa 452 i 617 de la soca birmana. Schofield i col (2000), mitjançant l'ús d'una llibreria fàgica d'anticossos van demostrar que l'epítóp neutralitzant estava localitzat entre els aa 578 i 607 de la soca pakistaní. Partint d'aquesta llibreria fàgica d'ADNc dels gens $\gamma 1/\kappa$ derivada dels limfòcits de la mèdulla òsea d'un ximpanzé (*Pan troglodytes*) inoculat amb la soca Sar55, identificaren anticossos que reaccionaven contra diferents regions de la proteïna de l'ORF2. Uns anticossos reaccionaven amb l'extrem C-terminal de la proteïna, a la regió identificada com a essencial per l'activitat neutralitzant. Estudis de neutralització amb 2 d'aquests anticossos mostraren que eren neutralitzants.

Meng i col. (2001) van descriure que anticossos induïts per un fragment que contenia els aa 452 a 617 de l'ORF2 del genoma d'una soca birmana neutralitzaven soques dels genotips 1, 2 i 3, indicant l'existència, en aquesta regió, d'epítops compartits per les diferents soques. Els estudis realitzats per Schofield i col. (2000 i 2003) per analitzar el comportament dels anticossos obtinguts contra Sar55 davant altres soques (la soca Mex14 i la porcina Meng aïllada als Estats Units pertanyents a diferents genotips) van mostrar

Capítol 5. Estudis de l'antigenicitat de l'epítop neutralitzant del VHE.

diferències. Gairebé tots els anticossos s'unien a la soca Meng amb la mateixa intensitat que a la soca Sar55. Alguns, però, no van reconèixer la soca Mex14 del genotip 2.

Per avaluar l'efecte sobre l'antigenicitat dels canvis puntuals observats a la seqüència d'aa de les soques del VHE es va seleccionar la regió que contenia l'epítop neutralitzant i es van dissenyar una sèrie d'experiments. Aquests experiments es van realitzar durant una estada al *Laboratory of Infectious Diseases* (LID) del *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) dels *National Institutes of Health* (NIH), sota la direcció del Dr. Robert Purcell i la Dra. Sue Emerson. Primer es determinaren quines posicions aminoacídiques del fragment comprès entre els aa 449 i 607 de l'ORF2 de la soca Sar55 eren diferents entre aquesta i Mex14, i després es compararen aquestes posicions amb la soca porcina Meng. Es van seleccionar les posicions amb diferent aa a Sar55 i Mex14 sempre que aquest aa també fos diferent entre Mex14 i Meng. En total es van seleccionar 6 posicions a incloure a l'estudi. Per PCR recombinant es van canviar els aa seleccionats de Sar55 pels presents a Mex14. La introducció de les mutacions, expressió dels pèptids mutats i estudis de radioimmunoprecipitació es descriuen en aquest capítol.

Els resultats obtinguts són preliminars i estan essent complementats amb nous experiments al LID.

Els objectius d'aquest capítol de la tesi van ser:

- * Dissenyar un protocol per modificar el genoma de la soca Sar55 del VHE per mutagènesi dirigida i expressió *in vitro* dels pèptids mutats
- * Estudiar el comportament d'anticossos anti-Sar55 en front a pèptids mutats d'aquesta mateixa soca amb mutacions puntuals que introduïen aa de Mex14

5.2. MATERIALS I MÈTODES

5.2.1. Disseny d'encebadors

La introducció de mutacions puntuals es pot aconseguir mitjançant el disseny i posterior ús a la PCR d'encebadors que continguin la mutació desitjada.

Els aa que es van canviar estan marcats a la Figures 5.1. La comparació de les seqüències d'aa de les soques Sar55, Mex14 i Meng va permetre seleccionar 6 posicions a estudiar per determinar si alguna d'elles era la causant de la diferència de reconeixement observada en els experiments realitzats per Schofield i col. (2003) al enfrontar Ac contra Sar55 amb la soca Mex14.

A més de les mutacions necessàries per provocar canvis d'aminoàcids a la seqüència de Sar55 també es van introduir mutacions que permetien generar un primer codó d'inici de la traducció i un codó stop final. Els fragments de seqüència de Sar55 mutats, un cop clonats i traduïts, generaven pèptids amb l'epítot neutralitzant complet i aminoàcids de Mex14 en posicions determinades.

Els experiments es van realitzar amb 2 controls: els pèptids derivats de les seqüències sense modificar de Sar55 i de Mex14. L'obtenció d'ambdós pèptids únicament va requerir la introducció dels codons d'inici i stop.

Les mutacions puntuals introduïdes a Sar55 van ser:

- Mutació 1 (M1): Canvi de V (GTC) a I (ATC)
- Mutació 2 (M2): Canvi de T (ACC) a S (TCC)
- Mutació 3 (M3): Canvi de S (TCC) a P (CCC)
Canvi de I (ATC) a V (GTC)
Canvi de Q (CAG) a E (GAG)
- Mutació 4 (M4): Canvi de H (CAC) a R (CGC)

A) Sar-55 : GAGCAGGACCGACACCTTCCCAGCCCCATCGCGTCTTTCTGTCTCCGAGCTAACGATGTGCTTTGGCTTCTCTCACCGCTGCCGAGT : 97
 Mex-14 :T..G..C..C..G..T..G.....T..G.....T.....A..T.....A.....G..C.....T..A..... : 97

Sar-55 : ATGACCAGTCCACTTACGGCTCTTCGACCCGGCCAGTCTATGCTCTGACTCTGTGACCTTGGTTAATGTTGCGACCCGGCCGAGCCCGTTGCCCG : 194
 Mex-14 :G..G..A..T.....G..T.....G.....AGC.....T.....G.....T.....T.....A..... : 194

Sar-55 : GTCACCTCGACTGGACCAAGGTCACACTTGATGGTGC GCCCTTCCACCATCCAGCAGTATTCAAAAGACCTTCTTTGTCCCTGCCGCTCCCGGTAAG : 291
 Mex-14 : A..G..T.....T.....A.....C..C..G..G.....CC.G..TG.TG.....A.....C.....A.....G..C..C..T..T..C... : 291

Sar-55 : CTCTCCTTTGGGAGGCAGGAACACTACTAAAGCCGGGTACCCCTTATAATTATAACACCACCTGCTAGTGACCAACTGCTCGTTGAGAATGCCGCTGGGC : 388
 Mex-14 :C..C..A..A.....A..T..T.....T.....T.....GA..T..GA.....A.....T..C..C.. : 388

Sar-55 : ATCGGGTTGCTATTTCCACCTACACTACTAGCCTGGGTGCTGGCCCCGCTCTATTTCCGCGGTTGCTGTTTAGCCCCCACTCTGTCTAGCA : 483
 Mex-14 :C..C.....A.....T..C..C..G..T..G..C..T..G..C..T.....CC..G.....G.....T..A..C.....C..C..G..T : 483

B) Sar-55 : EQDRPTSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYDQSTYGSSTGPVYVSDSVTLVNVATGAQAVARSLDWTKVTLIDGRPLSTIQQYSKTFVFLPLR : 95
 Mex-14 :I.....I.....I.....I.....I.....I.....I.....S.....P..VE..... : 95

Sar-55 : GKLSFWEAGTTKAGYPNYNTTASDQLLVENAAAGHRVAISTYTTSLGAGPVSISAVAVLAPHSVLA : 161
 Mex-14 :I.....I.....I.....I.....I.....I.....R.....A.....A.....R..A.. : 161

Figura 5.1. Seqüències nucleotídica i aminoacídica de la regió de l'ORF2 continguda entre els nt 6461 i 6937 de la soca Sar55 (A) i els nt 6458 i 6934 de la soca Mex14 (B). Els aa encerclats són els que van ser modificats a la seqüència de Sar55 mitjançant PCR mutagèniques.

Capítol 5. Estudis de l'antigenicitat de l'epítot neutralitzant del VHE.

Els encebadors necessaris per la introducció dels codó d'inici i stop de la traducció a la seqüència de Sar55 van ser cedits per Yi-Huas Zhou del LID. Tots els altres encebadors es van dissenyar comparant les seqüències de Sar55 i Mex14 (Taula 5.1.).

Taula 5.1. Encebadors utilitzats per la modificació de les soques Sar55 i Mex14.

Mutació	Encebador	Reacció	T.a.	Seqüència (5'→3')
M1	Sar55-N449F	1a PCR	58	ATGCAGGACCGACCGACACCTT
	Sar55-M517R			CCTTGGACCAGTCGAGTGACCGG
	Sar55-M517F	PCR niada	60	GTTGCCCGGTCACTCGACTGGTCCAAGG
	Sar55-607R			CTATAGCACAGAGTGGGGGGCTA
M2	Sar55-N449F	1a PCR	60	ATGCAGGACCGACCGACACCTT
	Sar55-494R			GTCAGAGATATAGACTGGGCCGG
	Sar55-M494F	PCR niada	59	TTCGACCGGCCAGTCTATATCTCTGAC
	Sar55-607R			CTATAGCACAGAGTGGGGGGCTA
M3	Sar55-N449F	1a PCR	60	ATGCAGGACCGACCGACACCTT
	Sar55-3M527R			ACTGCTCGACGGTGGGAAGGGGG
	Sar55-3M527F	PCR niada	59	GGTCGCCCCCTTCCCACCGTCGAGCAGT
	Sar55-607R			CTATAGCACAGAGTGGGGGGCTA
M4	Sar55-N449F	PCR	60	ATGCAGGACCGACCGACACCTT
	Sar55-M604R			CTATAGCACAGAGCGGGGGCTA
Mex14	HEV DGN 6300-6320F	1a PCR	45	ACAGAATTAATTTTCGTCGGCT
	MZ 7894 RV	RT	42	GATAAGCTTGATATCAGATCTTTTTTTTTTTTTTTTCAGG
	Mex-448F	PCR seminiada	63	ATGCAGGATCGGCCACCCCGT
	Mex-606R			CTACAGGGCGGAGCGTGGAGCCA

T.a.= temperatura d'anellament

5.2.2. Soques de referència: Sar55 i Mex14

Per realitzar els estudis d'antigenicitat amb la soca pakistaní Sar55 es va partir del clon pSK-HEV-2. Aquest és un clon que conté el genoma complet de la soca en forma d'ADN. Es va preparar una solució de treball a concentració 20 ng/µl.

Els estudis amb la soca Mex14 s'iniciaren a partir d'una extracció d'àcids nucleics cedida per Hanh Nguyen del LID.

5.2.3. Mutagènesi dirigida

La PCR recombinant permet la introducció de mutacions a un fragment d'ADN mitjançant l'ús d'encebadors que contenen la mutació. Es compon de dues PCR inicials que introdueixen la mutació desitjada mitjançant els encebadors dissenyats amb la mutació. En aquest moment la mutació es troba a un dels extrems dels fragments amplificats. Posteriorment es realitza la PCR recombinant que permet, per aparellament de la regió mutada, la combinació dels fragments obtinguts a les PCR inicials per generar un únic amplicó que ja conté la mutació introduïda a la posició desitjada (Figura 5.2.).

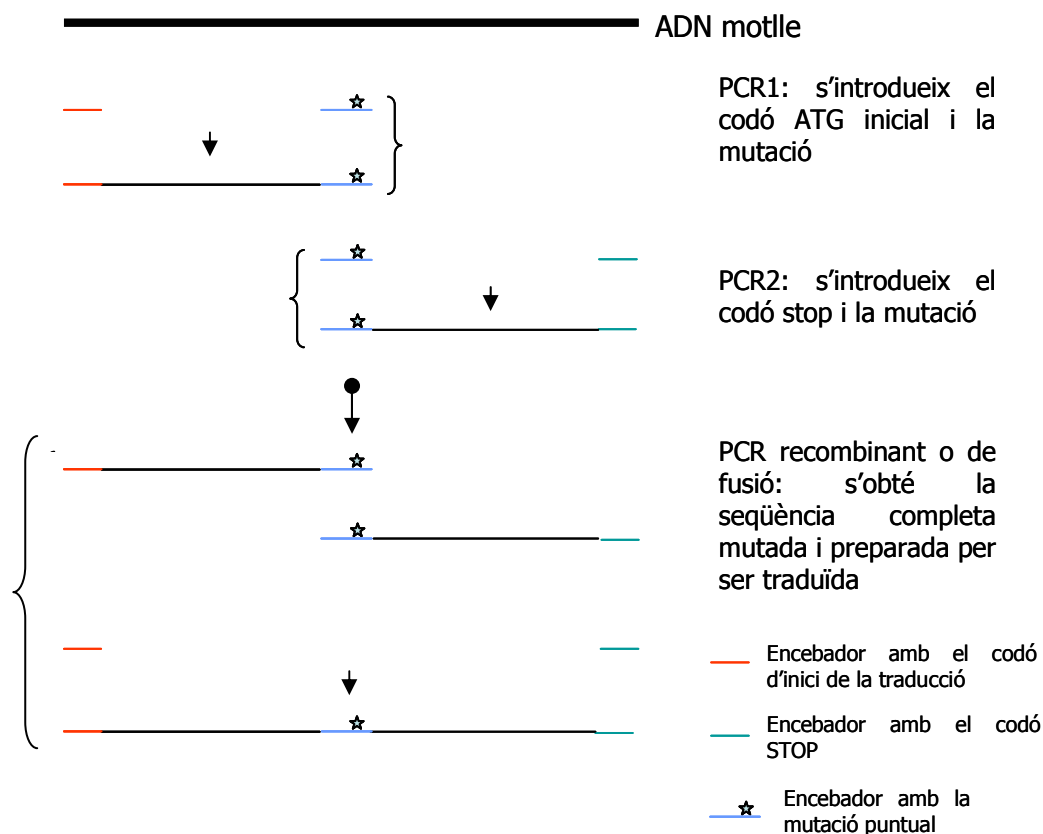


Figura 5.2. Esquema de la introducció de mutacions puntuals mitjançant PCR recombinant o de fusió.

5.2.3.1. Mutació 1, Mutació 2 i Mutació 3

5.2.3.1.1. PCR mutagèniques (PCR1 i PCR2)

Cada mutació introduïda requeria 2 PCR inicials amb encebadors diferents:

- ⇒ PCR1: amb l'encebador directe que contenia el codó d'inici de la traducció i el revers que contenia la mutació puntual.
- ⇒ PCR2: amb l'encebador directe que contenia la mutació puntual i el revers que contenia el codó STOP.

Per la mutació 1 (M1) es van fer 2 rèpliques de cada PCR inicial amb 2 µl de plàsmid pSK-HEV-2, mentre que per les mutacions 2 (M2) i 3 (M3) es van fer 4 rèpliques amb 5 µl de plàsmid. Aquestes PCR es van realitzar de la següent manera:

- Preparar les barreges necessàries per les PCR inicials en una zona neta (Taula 5.2.).

Taula 5.2. Components necessaris per les reaccions de PCR mutagènica.

PCR	Quantitat	Concentració final per 50 µl
10 x <i>Pfx Buffer</i>	5 µl	1x
50 mM MgSO ₄	1 µl	1 mM
10mM dNTP	1 µl	0,2 mM
Encebador directe 10 µM	1 µl	0,2 µM
Encebador revers 10 µM	1 µl	0,2 µM
Polimerasa Pfx 5 U/µl	0,5 µl	2,5 U
H ₂ O destil·lada estèril	Fins a un total de 50µl	-

- Distribuir la barreja en tubs de 0,2 ml adequadament marcats.
- Afegir la quantitat de plàsmid desitjat (2 µl per M1 i 5µl per M2 i M3) al laboratori.
- Centrifugar uns segons per baixar tot al fons del tub.
- Afegir 50 µl d'oli mineral.
- Incubar a un termociclador programable.

- 5 min a 94°C
 - 45 seg a 94°C
 - 45 seg a T. anellament
 - 1 min a 72°C
 - 10 min a 72°C
 - 4°C
- } 35 cicles

- Analitzar en un gel d'agarosa Seakem al 1,5% amb tinció de bromur d'etidi.

Les temperatures d'anellament dels diferents encebadors estan descrites a la Taula 5.1.

5.2.3.1.2. Purificació dels productes de les PCR mutagèniques

Els productes de les PCR inicials es purificaven 2 cops. El primer cop es feia una purificació directa a partir dels tubs de PCR tal i com es descriu a l'apartat 2.2.1.5.1.1., amb un pas previ per eliminar l'oli vegetal sense perill de perdre mostra. Això s'aconseguia congelant els productes de PCR i succionant amb una pipeta l'oli vegetal. Les diferents rèpliques de cada PCR es purificaven amb la mateixa columna. Repetint el primer pas de la purificació tants cops com rèpliques hi havia. Tot el producte final s'el·luïa en 30 µl del tampó d'elució subministrat amb el kit i es mantenia a -20°C.

Per tal de separar l'ADN amplificat (amb mutació) de l'ADN del clon (sense mutació) i evitar l'amplificació d'aquest segon a la PCR recombinant, es feia un segon pas de purificació a partir de gel. El kit utilitzat va ser el *QIAquick gel extraction Kit* però amb columnes del kit *MinElute PCR Purification Kit* (QIAGEN), que permeten concentrar tot l'ADN en 10 µl finals. El protocol era el descrit a l'apartat 2.2.1.5.1.2. amb lleugeres variacions. Els 30 µl de purificat es carregaven en un gel al 1,5% d'agarosa Seakem i es deixava córrer a uns 90 V durant 45 min. Les bandes desitjades es tallaven amb llancetes. S'utilitzava una llanceta per cada banda. El producte final l'el·luïa amb 10 µl de tampó BE. Un cop realitzada la purificació, es corria un gel amb 4 µl del purificat per comprovar que s'havia recuperat l'ADN desitjat. El purificat es mantenia a -20°C.

5.2.3.1.3. PCR recombinant o de fusió

La PCR recombinant es realitzava a partir dels amplificats obtinguts a les PCR inicials amb les que s'havia introduït la mutació desitjada. Aquest tipus de PCR permetia l'obtenció del fragment complet de l'epítóp neutralitzant mutat.

Per realitzar la PCR recombinant es van barrejar en un sol tub 3 µl (per M1) i 1 µl (per M2 i M3) dels 2 productes de PCR purificats a partir de gel de les PCR inicials corresponents a cada mutació, afegint els encebadors més externs del fragment, que contenien el codó d'inici de la traducció i el codó STOP. La barreja de PCR correspon a la descrita a la Taula 5.2., ajustant la quantitat d'aigua en funció de l'ADN afegit. La temperatura d'anellament de totes les PCR recombinants va ser de 60°C. Les condicions eren:

- 5 min a 94°C
 - 45 seg a 94°C
 - 45 seg a 60°C
 - 1 min a 72°C
 - 10 min a 72°C
 - 4°C
- } 35 cicles

A l'igual que els productes de les PCR1 i PCR2, els productes de les PCR recombinants van ser purificats. Una primera purificació es realitzà amb el kit *QIAquick PCR Purification Kit* de QIAGEN eluint amb 30 µl de buffer d'elució i posteriorment a partir d'un gel d'agarosa amb el kit *QIAquick Gel Extraction kit* i columnes MinElute, eluint amb 10 µl de tampó d'elució. El purificat es va mantenir congelat a -20°C.

5.2.3.2. Mutació 4

La mutació 4 (M4) es troba a l'extrem 3' del fragment que comprèn l'epítóp neutralitzant. La barreja de PCR utilitzada per introduir aquesta mutació està descrita a la Taula 5.2. En aquest cas es va realitzar una única PCR amb 5 µl de plàsmid que generava tot el fragment de l'epítóp neutralitzant amb el canvi d'aminoàcid a l'extrem 3' i els codons d'inici i STOP de la traducció.

El producte de la PCR va ser purificat com es descriu per les altres mutacions.

5.2.3.3. Mutació dels controls: soques Sar55 i Mex14

Per poder comparar el comportament dels anticossos davant els pèptids mutats es van incorporar a l'estudi les soques Sar55 i Mex14 salvatges.

5.2.3.3.1. Sar55

El plàsmid amb el fragment del genoma de Sar55 que contenia l'epítóp neutralitzant amb els codons d'inici i final de la traducció va ser cedit per Yi-Huas Zhou del LID. L'ínter corresponia a la seqüència original de Sar55.

5.2.3.3.2. Mex14

El plàsmid de la soca Mex14 es va obtenir de manera similar a l'obtenció dels clons amb les mutacions, però partint d'una extracció de l'ARN de la soca cedida per Hanh Nguyenh. No es va modificar el fragment de genoma que contenia l'epítóp perquè es volia estudiar el comportament dels anticossos anti-Sar55 davant del pèptid generat a partir de la seqüència salvatge de Mex14, però s'introduïren els codons d'inici i acabament de la traducció necessaris per l'obtenció del pèptid.

Els codons es van introduir per RT-PCR seminiada, mitjançant l'ús d'encebadors que contenien les seqüències dels codons (Taula 5.1.).

El protocol era el següent:

- Preparar les barreges necessàries (RT-Mix i PCR1) a la zona neta (Taulas 5.3 i 5.4).

Taula 5.3. Components de la barreja RT-Mix.

RT	Quantitat	Concentració final per 20 µl
<i>5x First Strand Buffer</i>	4 µl	1x
0,1 M DTT	1 µl	5 mM
10 mM dNTP	1 µl	0,5 mM
Inhibidor RNasa 20 U/µ	0,5 µl	10 U
SuperScript II 200 U/µl	1 µl	200 U

Taula 5.4. Components de la barreja PCR1.

PCR1	Quantitat	Concentració final per 50 µl
10x <i>Herculase Buffer</i>	5 µl	1x
10mM dNTP	1 µl	0,2 mM
HEV DGN 6300-6320F 10µM	1 µl	0,2 µM
<i>Herculase</i> 5 U/µl	0,5 µl	2,5 U
H ₂ O destil·lada estèril	Fins a un total de 50µl	-

- Afegir 1 µl de l'encebador extern revers (MZ 7894 RV) a 10 µl d'ARN i 1,5 µl d'aigua destil·lada.
 - Incubar a 65°C durant 10 min.
 - Deixar a TA durant 2 min.
 - Afegir 7,5 µl de la RT-Mix.
 - Incubar a 42°C durant 1 h.
 - Immediatament posar a 95°C i incubar 5 min.
 - Posar en gel ràpidament.
 - Afegir 2 µl d'ADNc a un tub de PCR amb 48 µl de barreja PCR1.
 - Centrifugar breument i afegir 50 µl d'oli mineral.
 - Incubar a un termociclador programable:
 - 3 min a 94°C
 - 1 min a 94°C
 - 1 min a 45°C
 - 2 min 30 seg a 72°C
 - 10 min a 72°C
 - 4°C
- } 35 cicles
- Preparar la barreja PCR2 (PCR seminiada) (Taula 5.5.).

Taula 5.5. Components de la barreja PCR2.

PCR2	Quantitat	Concentració final per 50 µl
10x <i>Herculase Buffer</i>	5 µl	1x
10 mM dNTP	1 µl	0,2 mM
Mex-448F 10 µM	1 µl	0,2 µM
Mex-606R 10 µM	1 µl	0,2 µM
Herculase 5 U/µl	0,5 µl	2,5 U
H ₂ O destil·lada estèril	Fins a un total de 50µl	-

- Afegir 5 µl del producte de la 1a PCR a 45 µl de barreja PCR2.
 - Centrifugar breument i afegir 50 µl d'oli mineral.
 - Incubar en un termociclador programable:
 - 3 min a 94°C
 - 1 min a 94°C
 - 1 min a 45°C
 - 1 min 30 seg a 72°C
 - 10 min a 72°C
 - 4°C
- } 35 cicles
- Tots els passos d'incubació de la retrotranscripció es van fer en banys termostatats.

Es van realitzar 6 rèpliques de la PCR seminiada. Els productes d'aquestes es van purificar amb el kit *MinElute PCR Purification kit* tal i com es descriu a l'apartat 2.2.1.5.1.1. Es va utilitzar una columna per cada 3 rèpliques, i el purificat final de cada columna va ser eluit en 10 µl de tampó BE, aconseguint un total de 20 µl de purificat. Tot el purificat obtingut es va córrer en un gel d'agarosa a l'1,5% i la banda desitjada va ser retallada i purificada tal i com es descriu a l'apartat 5.2.3.1.2.

5.2.4. Clonació dels fragments mutats

La clonació dels fragments mutats permetia disposar de grans quantitats d'ADN per treballar, així com d'una zona de regulació dels processos de transcripció i traducció necessaris per l'obtenció dels pèptids modificats.

Capítol 5. Estudis de l'antigenicitat de l'epítot neutralitzant del VHE.

Es va utilitzar el kit pGEM-T Vector System II (Promega). El vector pGEM-T permet obtenir un gran nombre de còpies del fragment clonat. Aporta la zona reguladora necessària per la transcripció *in vitro* (Figura 5.3.). Com a promotors per l'ARN polimerasa disposa dels promotors SP6 i T7, que es troben flanquejant 2 regions amb múltiples dianes de restricció. Se li ha afegit una timidina a cada extrem per evitar la recircularització del vector i afavorir la clonació de productes de PCR.

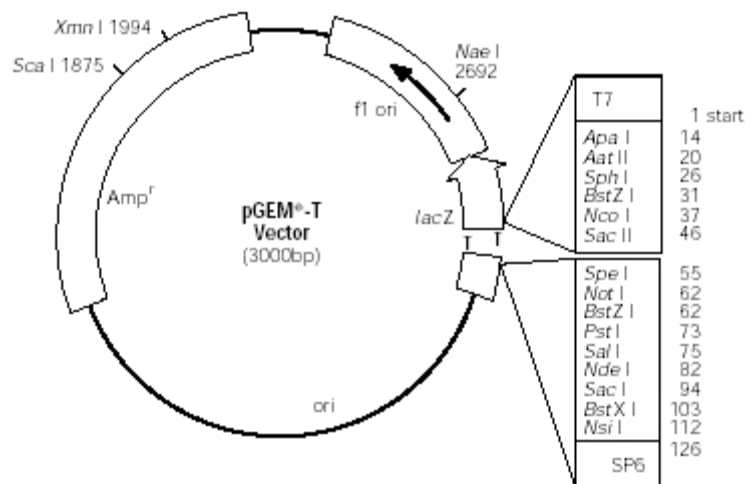


Figura 5.3. Estructura del vector pGEM-T (Promega).

5.2.4.1. A-tailing

L'enzim Pfx ADN polimerasa no presenta l'activitat necessària per afegir l'adenina imprescindible per clonar amb el sistema A/T als extrems dels fragments amplificats. Tampoc la presenta l'enzim Herculasa. És necessari un pas previ a la lligació per afegir-la.

Per afegir l'adenina als extrems dels fragments es va fer servir l'AmpliTaQ[®] ADN polimerasa (Perkin-Elmer).

- Preparar la barreja necessària a la zona neta (Taula 5.6.).

Taula 5.6. Components de la barreja per l'*A-tailing*.

PCR	Quantitat	Concentració final per 50 µl
10x <i>Buffer II</i>	5 µl	1x
25 mM MgCl ₂	4 µl	2 mM
10 mM dATP	1 µl	0,2 mM
AmpliTaq DNA pol 5 U/µl	1 µl	5 U
H ₂ O destil·lada estèril	Fins a un total de 50µl	-

- Afegir 5 µl del producte purificat obtingut a la PCR recombinant
- Incubar a les condicions següents:
 - 30 min a 70°C
 - 4°C

El producte de l'*a-tailing* es va purificar amb el kit MinElute PCR Purification Kit eluint amb 10 µl del tampó d'elució. El protocol seguit és el descrit a l'apartat 2.2.1.5.1.1. El purificat es va mantenir a 4°C fins a la preparació de la lligació. Després es va congelat a -20°C.

5.2.4.2. Lligació

La lligació es va realitzar tal i com es descriu a l'apartat 2.2.2.2.1., amb el kit *Promega Rapid DNA Ligase in pGEM-T Vector System II*. No es va quantificar la quantitat d'ADN amb que es treballava, de manera que es va lligar amb 1 i 3 µl en paral·lel. La reacció es va incubar durant tota la nit a temperatura ambient.

5.2.4.3. Transformació

El fragment del genoma de la soca Sar55 mutat i lligat al vector pGEM-T va ser incorporat a la soca JM109 d'*E.coli*. La transformació es va fer tal i com es descriu a l'apartat 2.2.2.2.2.1. Després d'incubar les cèl·lules en medi SOC a 37°C durant 1 h i 30 min es plaquejaren 100 µl del creixement directe i de la dilució 1:10 en plaques de LB amb ampicil·lina, X-gal i IPTG. Les plaques s'incubaven a 37°C durant tota la nit.

5.2.4.4. Purificació dels plàsmids: miniprep

Les colònies blanques o blanc-blaves es repicaven en plaques noves de medi LB amb ampicil·lina, X-gal i IPTG i es feien créixer, en paral·lel, en 3 ml de medi LB líquid amb ampicil·lina (100 µg/L). Les plaques s'incubaren a 37°C en estàtic i invertides, mentre que els cultius líquids s'incubaren a la mateixa temperatura però en agitació (~230 r.p.m.).

A partir del cultiu líquid es va purificar els plàsmids dels clons que en la placa de repicació eren blancs o blanc-blaus. Aquesta purificació es va realitzar amb el kit *QIAprep Spin miniprep*, seguint les instruccions del proveïdor.

- Passar a un tub de 1,5 ml part del creixement líquid i centrifugar a 15.300 *xg* 2 min.
- Eliminar el sobrenedant i repetir el pas anterior fins a haver centrifugat tot el creixement en el mateix tub.
- Afegir 250 µl de tampó P1 (amb RNasa H) i agitar per inversió.
- Afegir 250 µl del tampó P2 i agitar per inversió.
- Afegir 350 µl del tampó N3 i agitar per inversió.
- Centrifugar 10 min a 17.900 *xg*.
- Passar el sobrenedant a una columna i centrifugar a 17.900 *xg* durant 30-60 seg.
- Descartar el filtrat i netejar amb 0,5 ml de tampó PB. Centrifugar 30-60 seg.
- Descartar el filtrat i centrifugar 1 min.
- Passar la columna a un tub de 1,5 ml sense tap.
- Afegir 50 µl de tampó EB i centrifugar 1 min a 17.900 *xg*.
- Passar el purificat a un tub net i congelar a -20°C.

→ Es recomana que entre l'addició del tampó P1 i l'eliminació del sobrenedant de la centrifugació amb el tampó N3 no s'excedeixi de 10 min perquè es pot formar un precipitat.

5.2.4.5. Identificació de la presència de l'insert i la mutació

El vector pGEM-T presenta un conjunt de dianes de restricció a cada banda del punt de lligació de l'insert que permeten determinar la presència o absència d'aquest mitjançant la visualització, en un gel d'agarosa, del resultat de digerir el plàsmid amb algun dels enzims de restricció.

Per la primera mutació estudiada (M1) es van utilitzar els enzims NotI i NcoI. Aquests 2 enzims de restricció presenten dianes úniques, una a cada extrem del vector. Les diferents seqüències clonades no presentaven dianes per aquests enzims. Per M2, M3 i M4 s'utilitzaren els enzims NotI (amb diana al vector) i KpnI (amb diana a l'insert). Per Mex14 es va utilitzar l'enzim HindII, que tallava un sol cop al vector i un a l'insert.

Totes les reaccions es van completar amb un control negatiu de restricció que en tots els casos va ser algun dels plàsmids seleccionats i analitzats en aquell mateix moment.

5.2.4.5.1. Reacció de restricció amb NotI i NcoI

L'ús d'aquests 2 enzims permetia identificar la presència o absència d'insert segons el patró de bandes observat al córrer el resultat de la reacció de restricció en un gel d'agarosa. Aquests 2 enzims funcionen en condicions òptimes amb el mateix tampó, permetent una mateixa reacció per tots dos. El protocol era el següent:

- Preparar una barreja amb 2 µl de tampó 10x RA3, 0,5 µl de cada un dels enzims NcoI i NotI i aigua destil·lada fins a un volum final de reacció de 20 µl (3 µl d'ADN). El control negatiu només requereix 1 µl de tampó i aigua fins a 10 µl de reacció total (1 µl d'ADN).
- Distribuir en tubs de 1,5 ml.
- Afegir 3 µl del plàsmid al tub per digerir i 1 µl al control negatiu.
- Incubar 1 h 30 min a 37°C en un bany.
- Visualitzar la restricció en un gel.

Un cop identificats els plàsmids amb insert s'havien de seqüenciar per assegurar la presència de la mutació desitjada i determinar la seva orientació respecte als promotors del vector. El vector pGEM-T conté 2 promotors que poden ser utilitzats per traduir la seqüència a proteïna. L'ús del promotor SP6 assegura l'inici de la traducció en la codó d'inici introduït a l'insert perquè és l'únic que troba l'enzim després del promotor. El promotor T7 presenta una senyal d'inici de la traducció abans del punt de clonatge, de manera que la traducció pot començar en aquest inici o en el que presenta l'insert. Es buscaven els plàsmids amb mutació i orientats en sentit promotor SP6→promotor T7.

5.2.4.5.2. Reacció de restricció amb NotI i KpnI

L'ús d'aquests 2 enzims permetia veure la presència o absència de l'insert i la seva orientació respecte als promotors del vector. L'enzim NotI es troba entre el punt de clonació i el promotor de la polimerasa SP6. El fragment lligat al vector presentava una diana per l'enzim KpnI cap a l'extrem 3'. El que s'esperava després de la digestió doble era:

→ Si l'insert estava en sentit SP6→T7: un fragment de 3114 pb i un de 369 pb (Figura 5.4.)

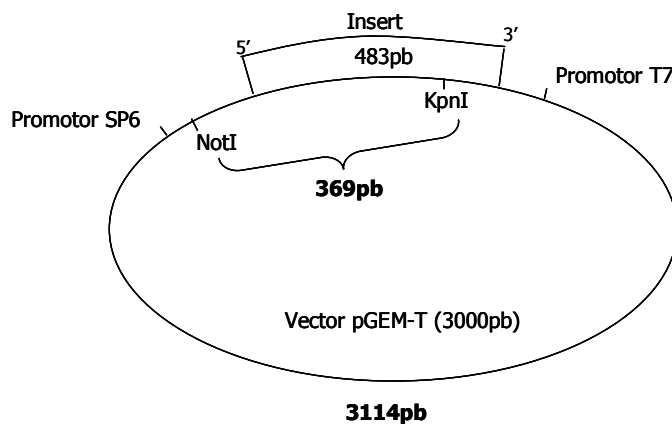


Figura 5.4. Esquema de la situació de les diferents dianes de restricció si l'insert s'havia lligat en direcció SP6→T7. En negreta s'indica el tamany dels diferents fragments al digerir amb NotI i KpnI.

→ Si l'insert estava en sentit T7→SP6: un fragment de 3347 pb i un de 136 pb (Figura 5.5.).

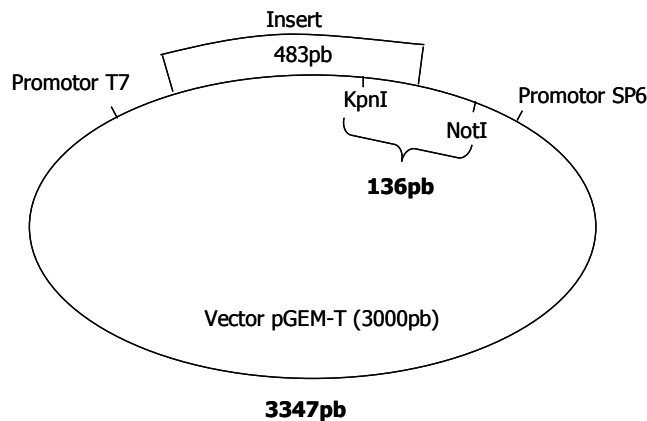


Figura 5.5. Esquema de la situació de les diferents dianes de restricció si l'insert s'havia lligat en direcció T7→SP6. En negreta s'indica el tamany dels diferents fragments al digerir amb NotI i KpnI.

Capítol 5. Estudis de l'antigenicitat de l'epítot neutralitzant del VHE.

NotI i Kpn1 treballen en condicions òptimes amb tampons diferents, i per tant va ser necessari fer 2 reaccions de restricció independents, separades per una purificació per eliminar restes de la primera reacció que poguessin interferir en la segona. El protocol va ser el següent:

- Realitzar la primera reacció de restricció amb l'enzim KpnI tal i com es descriu a l'apartat 5.2.4.5.1. El tampó és 10x RE4.
- Després de la digestió durant 1 h 30 min purificar el producte de la reacció amb el kit *MinElute PCR purification kit*. El protocol és el descrit a l'apartat 2.2.1.5.1.1. afegint 100 µl de tampó PB i eluint al final amb 10 µl de tampó BE.
- Preparar la barreja per la segona reacció de restricció. Afegir únicament l'enzim NotI.
- Afegir a cada tub corresponent els 10 µl del purificat.
- Incubar 1 h 30 min a 37°C en un bany.
- Visualitzar en un gel d'agarosa.

5.2.4.5.3. Reacció de restricció amb HindII

Aquest enzim es va utilitzar per estudiar si els plàsmids contenien l'ínter procedent de la soca Mex14 i a la vegada determinar la seva orientació. L'enzim HindII funciona en condicions òptimes amb el tampó M. La reacció es va realitzar com es descriu pels enzims NotI i NcoI però únicament amb un enzim. La incubació es va fer també durant 1 h 30 min a 37°C.

Els resultats esperats eren els següents:

- Si l'ínter estava en sentit SP6→T7: un fragment de 3336 pb i un de 147 pb
- Si l'ínter estava en sentit T7→SP6: un fragment de 388 pb i un de 3095 pb

5.2.4.5.4. Seqüenciació

Aquells plàsmids que presentaven ínter (M1) i a més a més la orientació desitjada (M2, M3 i M4) van ser seqüenciats per comprovar si les mutacions havien estat introduïdes adequadament.

La seqüenciació era realitzada al Molecular Technology Center (MTC, SAIC-Frederick). L'ADN que havia de ser seqüenciat es diluïa amb aigua destil·lada estèril (9 µl de mostra

amb 4,4 µl d'aigua) i s'enviava al MTC. Els encebadors utilitzats per la seqüenciació van ser m13f i m13r, que eren seqüències presents al pGEM-T i eren afegits directament al MTC.

5.2.5. Obtenció dels pèptids mutats

La transcripció i posterior traducció a proteïna d'un fragment d'ADN es pot realitzar *in vitro* sempre i quan aquest ADN disposi d'un promotor adequat, una senyal d'inici del procés i una senyal d'acabament. El kit utilitzat per la transcripció i traducció *in vitro* va ser el *TNT® Coupled Reticulocyte Lysate systems* (Promega) amb la ARN polimerasa SP6.

Per tal de disposar de grans quantitats dels plàsmids per poder treballar es va fer un pas previ a la traducció de multiplicació d'aquests mitjançant un creixement dels clons en medi LB i un posterior aïllament de les molècules plasmídiques.

5.2.5.1. Purificació de grans quantitats de plàsmid: midiprep

El kit utilitzat per purificar els plàsmids va ser el *HiSpeed Plasmid Midi Kit* de QIAGEN, que permet purificar a partir de grans quantitats de creixement. Es va seguir parcialment el protocol subministrat pel proveïdor. El protocol seguit va ser:

- Inocular 3 ml de medi LB amb ampicil·lina amb el clon.
- Incubar 1 h 30 min a 37°C en agitació.
- Inocular 100 ml de medi LB amb ampicil·lina amb els 3 ml de creixement líquid.
- Incubar a 37°C tota la nit en agitació.
- Passar tot el creixement a ampelles d'un rotor adequat i, després d'equilibrar-les, centrifugar a 6.000 xg durant 15 min a 4°C.
- Resuspendre el pellet amb 6 ml del tampó P1, primer vortejant per separar el pellet de l'ampolla i després amb pipeta.
- Afegir 6 ml de tampó P2 i invertir 4-6 cops.
- Incubar 5 min a TA.
- Mentre s'incuba amb el P2, agafar la xeringa o cartutx *QIAfilter Midi*, posar-li un tap a la sortida i posar-la en un tub de 50 ml.
- Afegir 6 ml de tampó P3 a la mostra i invertir 4-6 cops.
- Abocar tota la barreja a l'interior del cartutx (sense èmbol) i incubar 10 min a TA.
- Mentre s'incuba amb el tampó P3, col·locar una *HiSpeed Midi Tip* en un tub de 50 ml i afegir 4 ml de tampó QBT. Deixar que el tampó es filtri.

- Treure el tap del cartutx i, pressionant amb l'èmbol, filtrar el lisat en un tub de 50 ml net.
- Abocar el lisat filtrat a la *HiSpeed Midi Tip* i deixar que filtri.
- Rentar la *HiSpeed Midi Tip* amb 20 ml de tampó QC i deixar que filtri.
- Eluir l'ADN retingut al filtre amb 5 ml de tampó QF i deixar que filtri.
- Passar el filtrat a un tub de 50 ml net.
- Afegir 3,5 ml d'isopropanol a TA per precipitar l'ADN. Barrejar i incubar 5 min a TA.
- Passar l'ADN a un tub de rotor adequat i tancar amb parafilm.
- Equilibrar i centrifugar a 135.000 xg durant 30 min a 4°C.
- Eliminar el sobrenedant i eluir el pellet amb 2 ml d'etanol 70% barrejant bé.
- Passar part del contingut (fins a 1,5 ml) a un tub de 1,5 ml i centrifugar a 20.800 xg durant 1 min.
- Descartar el sobrenedant i afegir en el mateix tub de 1,5 ml el que quedi de mostra. Repetir la centrifugació.
- Passar l'últim sobrenedant al tub de centrífuga per recuperar restes del pellet i repetir la centrifugació al tub de 1,5 ml.
- Eliminar el sobrenedant i deixar assecar el pellet a l'aire.
- Eluir el pellet en 300 μ l de tampó BE.
- Conservar a -20°C.

Els plàsmids aïllats es van seqüenciar de nou tal i com es descriu a l'apartat 5.2.4.5.4. per comprovar que contenen les seqüències desitjades.

5.2.5.2. Traducció *in vitro*

La traducció *in vitro* es va realitzar amb el kit *TNT® Coupled Reticulocyte Lysate systems* (Promega), que permet fer la transcripció de l'ADN a ARN i la traducció d'aquest a proteïna en una mateixa reacció. Es va realitzar amb l'ARN polimerasa SP6, que utilitzava el promotor SP6 present al vector.

El kit requereix 2 μ g d'ADN. Per saber quin volum de cada midiprep corresponia a aquesta quantitat es van quantificar mitjançant l'espectrofotòmetre BioPhotometer 6131 (*Eppendorf*). La lectura es va fer amb una dilució 1:25 dels purificats en aigua destil·lada. Com a blanc es va utilitzar la mateixa aigua destil·lada. L'espectrofotòmetre dona la concentració d'ADN de doble cadena en μ g/mL de purificat.

Capítol 5. Estudis de l'antigenicitat de l'epítop neutralitzant del VHE.

La traducció a proteïnes es va fer utilitzant una metionina radioactiva marcada amb ^{35}S (Redivue; Amersham), per poder llegir el resultat de l'assaig RIPA pel marcatge de film fotogràfic. Per seguretat el procés de traducció d'ARN a proteïnes es va realitzar a una cabina de flux vertical. El protocol era el següent:

- Descongelar en una gradeta els plàsmids, la barreja d'aminoàcids (sense metionina) i el tampó *TNT® Reaction Buffer*.
- Mantenir en gel el lisat de reticulòcit de conill (*TNT® Rabbit Reticulocyte Lysate*), la ARN polimerasa SP6 i l'inhibidor de ribonucleases (*RNasin Ribonuclease Inhibitor*).
- Preparar la barreja per n+1 tubs (Taula 5.7.).

Taula 5.7. Components necessaris per la traducció *in vitro*.

Reactius	Quantitat
<i>TNT® Rabbit Reticulocyte Lysate</i>	25 µl
<i>TNT® Reaction Buffer</i>	2 µl
<i>TNT® RNA Polymerase SP6</i>	1 µl
Barreja d'aa (- Met)	1 µl
[^{35}S] metionina	2 µl
<i>RNasin® Ribonuclease Inhibitor</i>	1 µl

- Repartir 32 µl en tubs amb tap de rosca i mantenir-los en gel.
- Afegir 2 µg d'ADN i aigua fins a 50 µl finals.
- Incubar a 30°C durant 90 min en un bany.
- Guardar a -20°C.

→ El ^{35}S és radioactiu. Cal treballar en condicions de seguretat. Sempre que sigui possible s'ha de treballar a una vitrina de flux vertical. Els productes de rebuig resultants s'han d'eliminar segons les normes establertes. Fins al moment de la recollida per part dels responsables aquests productes s'han d'emmagatzemar en un lloc habilitat a l'efecte i ben indicat.

5.2.5.3. Electroforesi en gel d'acrilamida (PAGE)

EL resultat de la traducció *in vitro* es visualitzava carregant les mostres en un gel d'acrilamida al 12% (Novex, Invitrogen) i autoradiografia posterior (BioMax MR Film, Kodak). A més de la presència de la proteïna interessava veure la intensitat de banda, ja que es volia treballar amb la mateixa quantitat de proteïna aproximadament. El protocol era el següent:

- Barrejar 1 µl de cada traducció amb 10 µl de tampó Laemmli 2x amb mercaptoetanol (Sigma).
- Incubar a 90°C durant 10 min.
- Preparar el muntatge del gel, introduint-lo en la cubeta adequada i omplint amb tampó d'electroforesi.
- Centrifugar breument les mostres i carregar-les en els diferents pouets del gel.
- Córrer el gel a 126 V durant 1 h 30 min aproximadament.
- Incubar el gel durant 30 min amb solució de fixació.
- Assecar el gel amb un assecador de gel durant 1 h aproximadament a 80°C.
- En una cambra fosca col·locar el gel en un cartutx en contacte amb una pel·lícula de raigs X.
- Incubar el cartutx durant tota la nit a -80°C.
- Fer el revelat en un revelador automàtic a una cambra fosca.

5.2.6. Reconeixement antigènic

Els pèptids obtinguts es van enfrontar mitjançant assatjos RIPA a anticossos anti-Sar55. Es volia determinar la capacitat d'unió d'aquests anticossos a un fragment que contenia la seqüència de l'epítop neutralitzant de la soca Sar55, Mex14 i a d'altres amb mutacions puntuals.

5.2.6.1. Anticossos anti-Sar55

Els anticossos utilitzats en els experiments d'antigenicitat eren anticossos monoclonals seleccionats d'entre els Fab (cadena lleugera + fracció VH i constant CH1 de la cadena pesada) obtinguts a partir d'una llibreria fàgica generada amb limfòcits de la medul·la de l'os d'un ximpanzé infectat experimentalment amb la soca Sar55 per Schofield i col. (2003). Tres setmanes abans de l'aspiració medul·lar el sistema immune de l'animal va ser estimulat mitjançant la inoculació d'una proteïna purificada de 55 KDa generada a partir de l'ORF2 de

Capítol 5. Estudis de l'antigenicitat de l'epítop neutralitzant del VHE.

la soca Sar55 (aa 112 a 607). Amb la llibreria $\gamma 1/\kappa$ es van obtenir les fraccions Fab dels anticossos generats contra Sar55 en l'animal.

Es van seleccionar 5 anticossos monoclonals. Els resultats preliminars obtinguts en assatjos RIPA amb les soques Sar55, Meng i Mex-14 en condicions no desnaturalitzants van ser els següents:

- HEV#4 → reconeixia Sar55 i Meng, però no Mex14
- EBL#56 → reconeixia Sar55 i Meng, però no Mex14
- HEV#31 → reconeixia Sar55, Meng i Mex14
- EBL#16 → reconeixia Sar55, Mex14 i Meng, però aquesta última poc eficientment.
- EBL#5 → s'unia a una regió diferent a l'estudiada

5.2.6.2. Radioimmunoprecipitació (RIPA)

La tècnica RIPA o assaig de radioimmunoprecipitació consisteix en posar en contacte un pèptid amb un anticòs determinat, i per precipitació amb boles de sefarosa, retenir l'anticòs. Si el pèptid ha format complexos amb l'anticòs també quedarà retingut. La visualització es fa sobre un film de raigs X, a on la presència del pèptid, marcat amb un isòtop radioactiu, genera una senyal.

Un cop s'ha incubat el pèptid amb l'anticòs desitjat (Ac A), s'afegeix un segon anticòs (Ac B) contra el primer per aconseguir la formació d'un complex (pèptid \leftrightarrow Ac A) \leftrightarrow Ac B. Tot el complex es fa precipitar a l'afegir boles de sefarosa amb afinitat per la part constant dels anticossos i centrifugar. Si el pèptid no ha estat reconegut per l'Ac A, es perd durant els rentats i no apareix senyal al film.

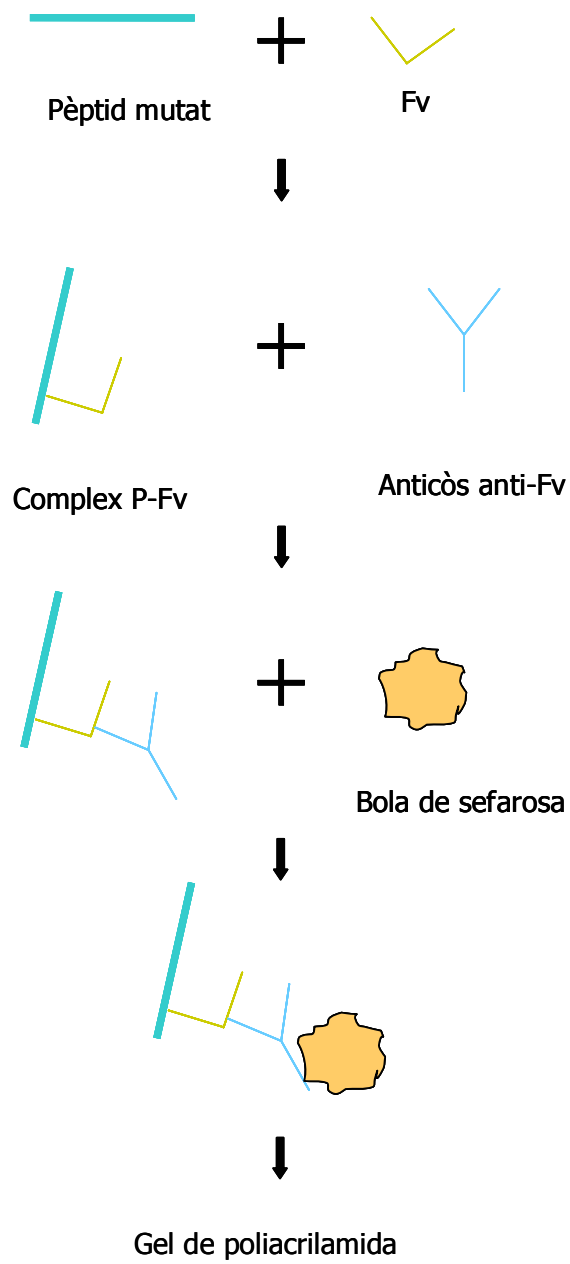


Figura 5.6. Esquema del procés de radioimmunoprecipitació (RIPA).

Capítol 5. Estudis de l'antigenicitat de l'epítóp neutralitzant del VHE.

El protocol del RIPA és el següent:

- Preparar les barreges per cada anticòs: 5 µl de 2x tampó RIPA desnaturalitzant, 1 µl d'anticòs i fins a 10 µl finals de *TNT® Rabbit Reticulocyte Lysate* (1 µl de pèptid).
- Repartir en tubs amb tap de rosca i afegir 1 µl de pèptid. Cada tub correspondrà a un pèptid enfrontat a un anticòs determinat.
- Centrifugar breument.
- Incubar tota la nit a 4°C.
- Afegir 1 µl d'anticòs anti-IgG humanes i incubar a 4°C durant 1 h.
- Durant la incubació preparar les boles (*Gammabind Plus Sepharase beads*, Pharmacia).
 - Passar 600 µl de boles a un tub de 1,5 ml.
 - Rentar amb tampó RIPA 1x.
 - Centrifugar a unes 3.800 *xg* durant 2 min.
 - Decantar el sobrenedant.
 - Fer 2 rentat més.
 - Resuspendre les boles en 1,5 ml de tampó RIPA 1x i deixar a temperatura ambient.
- Afegir 60 µl de boles a cada tub i barrejar suaument.
- Incubar 1 h a 4°C amb agitació esporàdica.
- Afegir 1 ml tampó RIPA 1x i barrejar per inversió.
- Centrifugar 4 min a unes 3.500 *xg*.
- Eliminar el sobrenedant.
- Repetir el rentat amb RIPA 1x 2 cops més.
- Eliminar el sobrenedant de l'últim rentat i afegir 1 ml de tampó RIPA 1x.
- Passar-ho tot a un tub net amb tap de rosca.
- Centrifugar a màxima velocitat.
- Eliminar al màxim el sobrenedant.
- Afegir 15 µl de tampó Laemli 2x amb mercaptoetanol.
- Escalfar les mostres 10 min a 90°C.
- Centrifugar breument i carregar les mostres en un gel d'acrilamida al 12%.
- Córrer durant 1 h 30 min a 126 V.
- Fixar amb la solució de fixació durant uns 30 min.
- Assecar el gel.
- En una cambra fosca posar en contacte el gel amb un film d'autoradiografia.
- Deixar-ho tota la nit a -80°C.

Capítol 5. Estudis de l'antigenicitat de l'epítóp neutralitzant del VHE.

- Revelar en un revelador automàtic.

Per totes les mutacions i per Mex14 s'afegí 1 µl de pèptid traduït als experiments RIPA. Per Sar55 es va afegir 2 µl perquè la traducció del clon corresponent no va ser tan eficient en comparació amb els altres clons, produint-se menys quantitat de pèptid.

5.3. RESULTATS

5.3.1. Mutagènesi dirigida

Els encebadors es van dissenyar en funció de la mutació que es volia introduir, mantenint tota la seqüència de Sar55 i modificant únicament un nucleòtid per canvi d'aminoàcid. A més, s'afegiren els nucleòtids necessaris per introduir el codó d'inici i el d'acabament de la traducció als extrems de les seqüències. Les seqüències dels encebadors es mostren a la Taula 5.1.

Mitjançant la PCR recombinant es va obtenir els fragments de seqüència corresponents als nucleòtids 6461-6937 de la soca Sar55 amb 3 de les 4 mutacions que es volien introduir. La quarta mutació es va obtenir amb una única PCR, al igual que el fragment de genoma de la soca Mex14. Les seqüències de nt i aa obtingudes es mostren a la Figura 5.7. i 5.8.

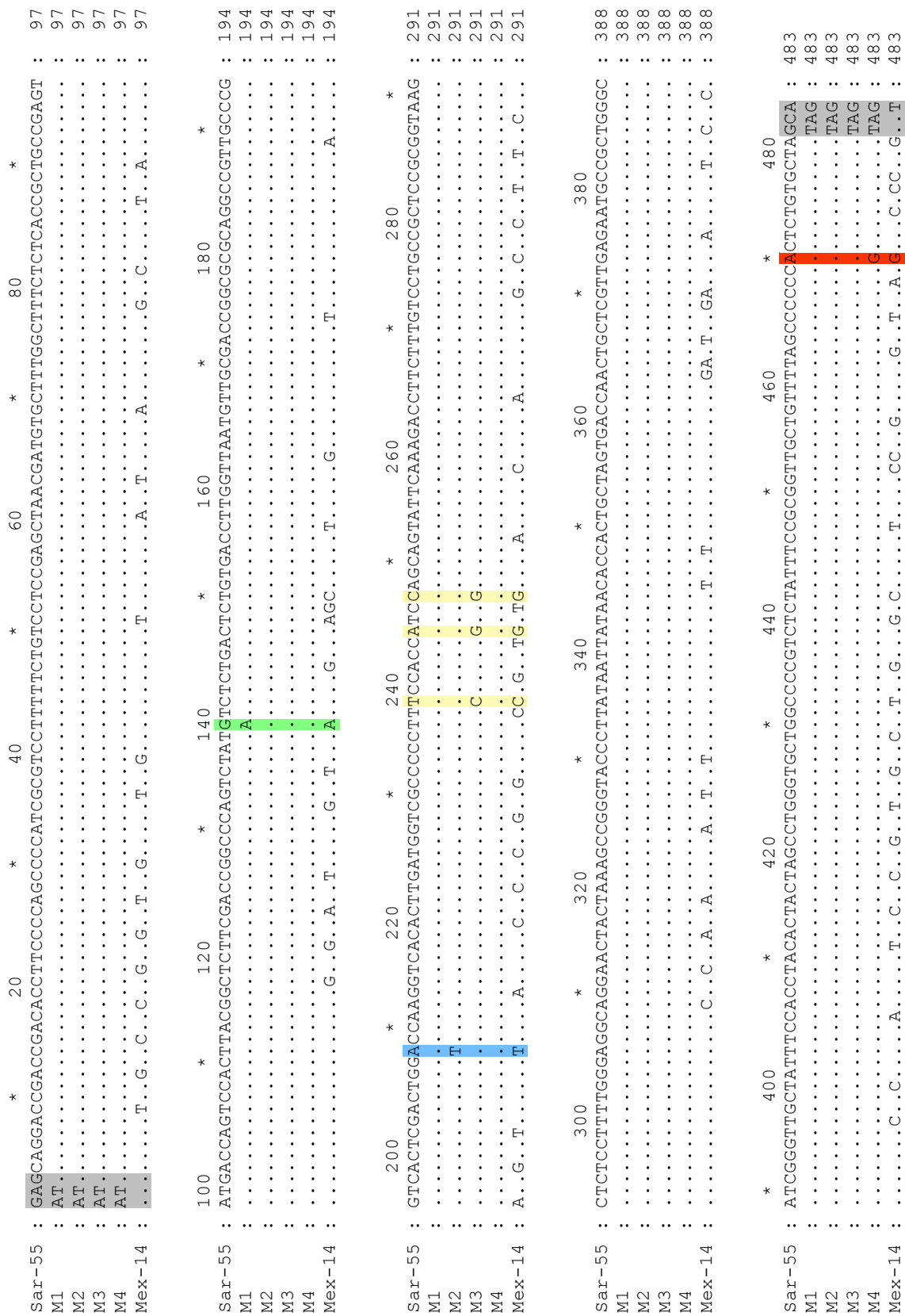


Figura 5.7. Alineament de les seqüències mutades de nucleòtids (M1, M2, M3 i M4) així com de Sar55 i Mex14. Cada mutació està representada en un color. El color gris representa els codons d'inici de d'acabament de la traducció incorporats.

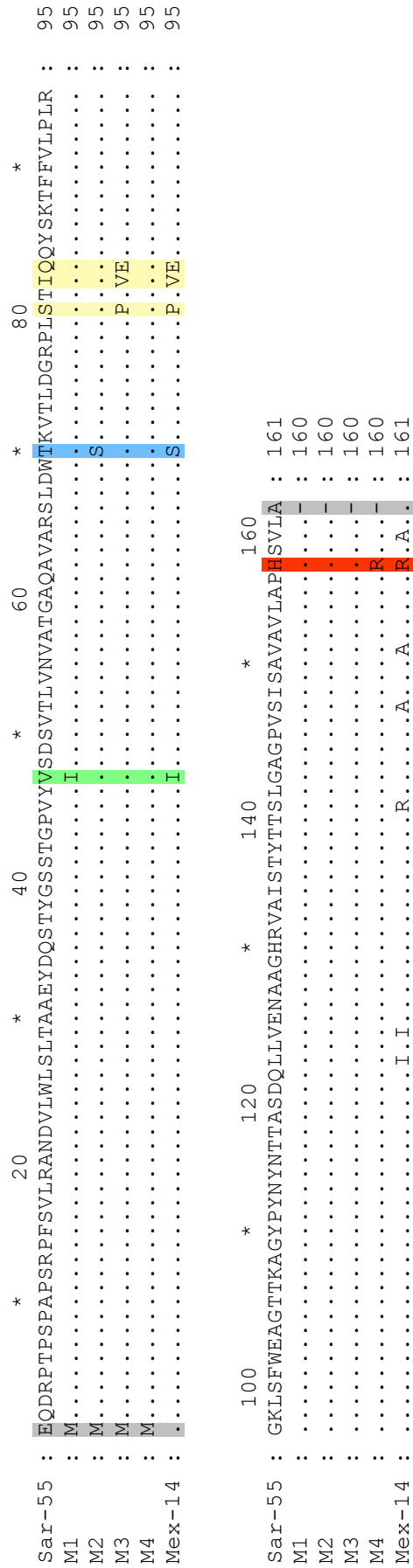


Figura 5.7. Alineament de les seqüències mutades d'aa de M1, M2, M3 i M4, així com de Sar55 i Mex14. Cada mutació està representada en un color. El color gris representa els codons d'inici de d'acabament de la traducció incorporats.

5.3.2. Obtenció dels pèptids mutats

Es va obtenir grans quantitats de plàsmids per purificació a partir de 100 ml de creixement dels clons seleccionats i després de comprovar, per seqüenciació, que totes les seqüències eren correctes es procedí a la traducció. La concentració de les suspensions dels 6 plàsmids obtinguts va ser de:

- Plàsmid per M1= 477,4 µg/mL
- Plàsmid per M2= 965,8 µg/mL
- Plàsmid per M3= 1270,3 µg/mL
- Plàsmid per M4= 237,6 µg/mL
- Plàsmid per Sar55= 240 µg/mL
- Plàsmid per Mex14= 273,8 µg/mL

La traducció va funcionar correctament per M1, M2, M4, Sar55 i Mex14. Malgrat que la seqüència del promotor era correcta, el clon seleccionat per M3 no va generar pèptid. Es va repetir la traducció *in vitro* amb un nou clon amb l'obtenció del pèptid corresponent.

Els productes de les traduccions es van córrer en un gel d'acrilamida al 12% i s'observà que s'havia format menys pèptid en la traducció del clon de Sar55 salvatge que per les altres mutacions. Per compensar això, als RIPA amb els diferents anticossos s'afegí doble quantitat (2 µl) d'aquest pèptid que dels altres.

5.3.3. Radioimmunoprecipitació (RIPA)

Els pèptids mutats, el corresponent a Sar55 i a Mex14 salvatges es van testar amb anticossos diferents que havien estat caracteritzats prèviament. Dels anticossos utilitzats, 1 reaccionava amb les 3 soques comparades inicialment (Sar55, Mex14 i Meng), 2 reaccionaven únicament contra Sar55 i Meng, 1 reaccionava contra Sar55 i Mex14 i 1 no ho feia contra la regió inclosa als pèptids. Si qualsevol dels anticossos deixava d'unir-se a Sar55 un cop introduïda la mutació, seria indicació de que aquella posició podia ser important pel reconeixement Ag-Ac.

Sorprenentment tots els anticossos, menys EBL#5, van reconèixer el pèptid salvatge de Mex14, contràriament al que s'havia suggerit en estudis previs (Figura 5.9.). Com era d'esperar a partir d'aquest resultat, tots els pèptids mutats van ser també reconeguts per

Capítol 5. Estudis de l'antigenicitat de l'epítot neutralitzant del VHE.

aquests 4 anticossos. Les mutacions introduïdes no provocaven canvis en la unió dels anticossos estudiats als antigens generats.

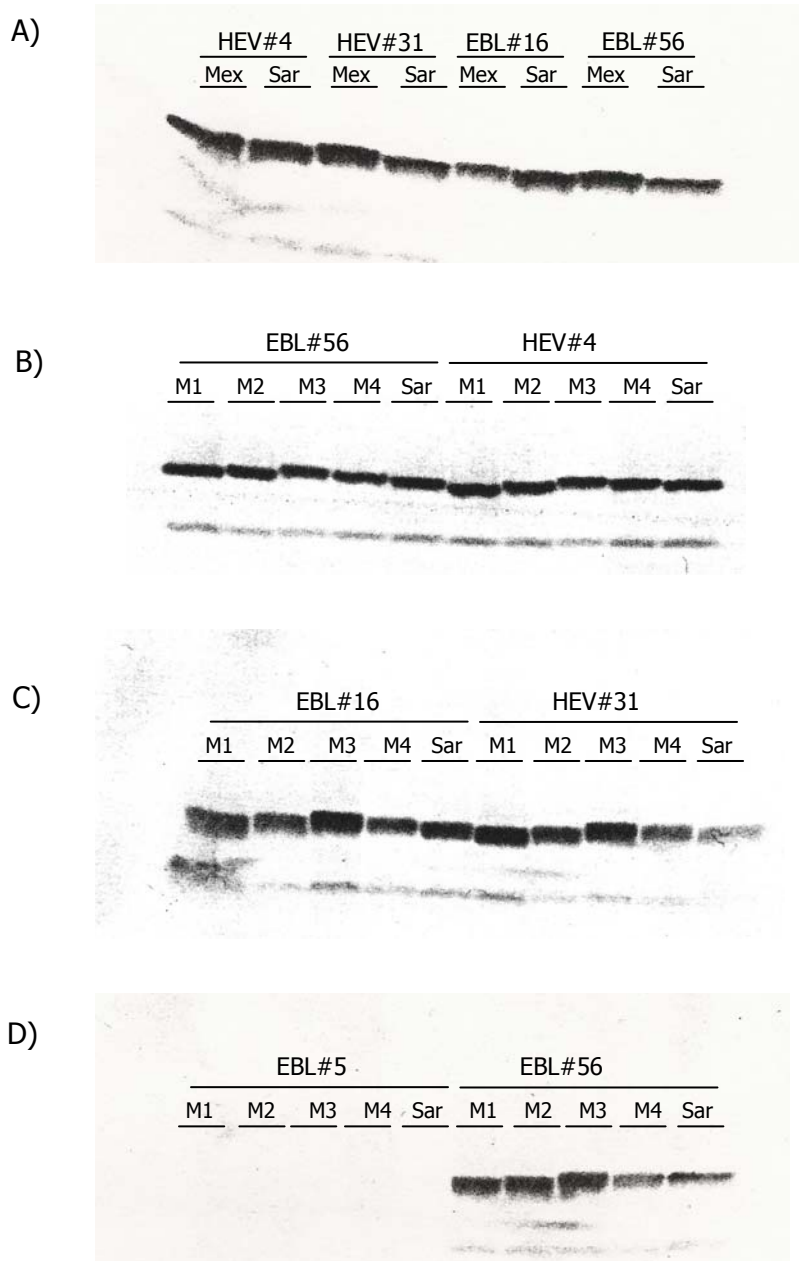


Figura 5.9. Resultats dels assajos RIPA amb els diferents pèptids. A) Pèptids de les soques salvatges Sar55 i Mex14 enfront als 4 Ac que reaccionen davant l'epítot neutralitzant de Sar55. B) Els 4 pèptids mutats i Sar55 enfront EBL#56 i HEV#4. C) Els 4 pèptids mutats i Sar55 enfront EBL#16 i HEV#31. D) Els 4 pèptids mutats i Sar55 enfront EBL#5 i EBL#56. M1= mutació 1; M2= mutació 2; M3= mutació 3; M4= mutació 4; Sar= Sar55; Mex= Mex14.

5.4. DISCUSSIO

En aquest capítol s'ha desenvolupat un protocol per introduir mutacions puntuals en un fragment del genoma del VHE mitjançant la tècnica de PCR i estudiar el seu efecte en el reconeixement Ag-Ac, essent l'antigen el producte de la traducció *in vitro* dels fragments d'ADN mutats. Les mutacions introduïdes provocaven canvis en la seqüència de nucleòtids que repercutien en la seqüència d'aminoàcids, ja fos canviant l'aminoàcid present en una posició determinada o introduint un codó d'inici o d'acabament de la traducció. Els fragments amb les mutacions van ser clonats en un vector d'expressió i expressats *in vitro*. Els pèptids mutats obtinguts es van enfrontar a anticossos que reconeixien la seqüència original (sense mutar) de Sar55 en un assaig de radioimmunoprecipitació (RIPA).

Diversos estudis han identificat un únic epítop neutralitzant al VHE, localitzat cap a l'extrem C-terminal de la proteïna de la càpside, la proteïna codificada per l'ORF2. La identificació exacta i caracterització d'aquest epítop permetria la generació de pèptids immunogènics capaços de provocar una resposta immune contra el virus que protegís contra la infecció o que permetés generar anticossos adequats per teràpies d'immunització passiva. Mitjançant estudis amb pèptids i proteïnes recombinants, s'ha acotat aquesta localització al fragment comprès entre l'aa 452 i 607 de la proteïna de l'ORF2 (Meng i col., 2001). S'han identificat anticossos derivats de la soca Sar55 del VHE capaços de reconèixer aquesta regió. Alguns resultats suggereixen que 2 d'aquests anticossos, HEV#4 i HEV#31, són capaços de neutralitzar la infecció provocada per la soca homòloga (genotip 1) en micos *rhesus* i que reconeixen la proteïna recombinant derivada de l'ORF2 de la soca porcina Meng (genotip 3) (Schofield i col., 2001; Schofield i col., 2003). Aquests investigadors també han observat que HEV#31 és també capaç de precipitar la soca Mex14 (genotip 2) en condicions no desnaturalitzants, essent un anticòs neutralitzant d'ampli espectre. En aquests mateixos experiments HEV#4 no va precipitar la soca Mex14 (Schofield i col., 2003). Per estudiar el paper de certes posicions aminoacídiques presents a la regió de l'epítop neutralitzant (aa 449-607 de l'ORF2) en la manca de reconeixement de la soca Mex14 per part de l'anticòs monoclonal HEV#4 es va dissenyar un protocol per introduir mutacions puntuals en el genoma de la soca Sar55 imitant posicions de Mex14.

Mitjançant PCR mutagèniques es modificà la seqüència nucleotídica que codificava pels aminoàcids 449 a 607 de Sar55. Es van generar 3 seqüències diferents introduint mutacions no sinònimes que generaven els aa presents a Mex14, així com un codó d'inici i un stop que

permetessin la traducció correcta dels pèptids generats. L'ús a les PCR mutagèniques de la seqüència de Sar55 clonada en un vector com a motlle va permetre l'obtenció de grans quantitats d'amplificat mutat afavorint la seva visualització en gels d'agarosa. Això va fer possible la purificació de les bandes a partir del gel. Si l'amplificat mutat no s'aïllava de la resta de molècules d'ADN presents a la barreja de PCR (principalment l'ADN motlle), molts dels clons resultants de la clonació del producte final de la PCR recombinant presentaven insert sense mutació. Això era degut a que durant la PCR recombinant, l'ADN motlle inicial (plàsmid amb la seqüència salvatge del genoma de Sar55) competia amb els amplicons obtinguts a les PCR mutagèniques i que sí contenien la mutació. La purificació a partir del gel d'aquests amplicons i la realització de la PCR recombinant a partir d'aquest purificat va permetre obtenir clons que únicament contenien insert amb mutació.

D'entre tots els clons obtinguts per cada posició estudiada es va escollir un que contingés la mutació desitjada i que estigués clonat en la direcció adequada respecte als promotors del vector. Interessava que el codó d'inici de la traducció estigués just després del promotor de la polimerasa SP6. Entre l'insert i el promotor T7 existia un segon ATG que impedia l'obtenció del pèptid correcte. La identificació dels clons mutats orientats correctament es va fer mitjançant reaccions de restricció, seleccionant 2 enzims que tinguessin diana única, un a cada extrem de l'insert, i que el tamany dels fragments obtinguts permetessin la seva diferenciació en un gel d'agarosa. En el cas dels clons de Mex14, la restricció es va realitzar únicament amb l'enzim HindII, amb una diana a l'insert i una altra al vector. Els clons seleccionats van ser seqüenciats per tal de comprovar que l'insert contenia les mutacions esperades i que el promotor de la polimerasa SP6 era correcte. La traducció de les seqüències a pèptids depenia de que el promotor contingut al plàsmid escollit funcionés correctament.

La transcripció de la seqüència d'ADN i la traducció a proteïna requeria l'ADN purificat i en grans quantitats. Es va fer créixer els clons en cultiu líquid per tal d'obtenir grans quantitats de molècules de plàsmid i es realitzà l'extracció i purificació mitjançant un kit comercial. La gran quantitat d'ADN obtingut no va permetre seguir el protocol íntegre del kit, basat en filtracions, i es va modificar la part de concentració de l'ADN introduint una precipitació mitjançant centrífugues i posterior elució del precipitat en el volum desitjat de tampó d'elució.

La traducció de l'insert es va realitzar *in vitro* mitjançant el kit *TNT® Coupled Reticulocyte Lysate systems*, que permet una primera transcripció de l'ADN a ARN i una posterior traducció a proteïnes en una mateixa reacció. A la reacció es va incorporar

Capítol 5. Estudis de l'antigenicitat de l'epítop neutralitzant del VHE.

metionina marcada amb ^{35}S , que és un aminoàcid radioactiu i permet la visualització de la banda formada pel pèptid en un gel per autorradiografia.

Hi ha estudis que suggereixen que l'epítop estudiat és lineal (Schofield i col., 2000). Altres estudis suggereixen que és conformacional però amb una estructura molt estable que és reconeguda pels anticossos fins i tot en condicions desnaturalitzants (Schofield i col., 2003). Tenint en compte aquests resultats i que les condicions desnaturalitzants generen menys soroll de fons es decidí fer els assajos en aquestes condicions. Si s'hagués observat manca de reconeixement per part d'algun anticòs davant d'algun pèptid els experiments s'haguessin repetit en condicions no desnaturalitzants per descartar interaccions degudes a la desnaturalització. Per la visualització dels resultats de les immunoprecipitacions es va córrer les mostres en gels de poliacrilamida amb un tampó Tris-glicina SDS. Amb el SDS (detergent aniònic que desnaturalitza les proteïnes unint-se a elles i conferint-les càrrega negativa generant una igual relació càrrega-massa a totes les proteïnes) tots els pèptids avançaven en el gel en funció del seu pes molecular, i no per la seva càrrega. A més, les mostres es van carregar barrejades amb tampó Laemmli amb mercaptoetanol (agent reductor que juntament amb el calor provoca una desnaturalització i linealització dels pèptids).

Els anticossos utilitzats en els assajos RIPA reconeixien un punt del fragment 449-607, a excepció de EBL#5, que reconeixia un epítop diferent a l'estudiat i no inclòs en el fragment clonat. Segons els estudis publicats per Schofield i col. (2003), en assajos de captura amb anticossos en condicions no desnaturalitzants, HEV#4 i EBL#56 precipitaven Sar55 però no Mex14, mentre que HEV#31 i EBL#16 precipiten totes dues soques. Els resultats obtinguts en els nostres experiments no mostren diferències entre Sar55 i Mex14 pel que fa a la unió als Ac, així com tampoc amb els pèptids mutats. És probable que les diferències observades estiguin relacionades amb l'accessibilitat a l'epítop o diferències en l'afinitat dels Ac segons les condicions d'assaig. No es pot descartar que en condicions no desnaturalitzants l'afinitat d'alguns d'aquests anticossos fos inferior, justificant els resultats negatius descrits per Schofield i col. (2003). A més, els experiments amb fragments de càpsides víriques poden donar resultats diferents respecte als experiments amb partícules víriques completes, ja que aquests impliquen estructures més complexes. Estudis posteriors de neutralització *in vitro* amb una altra soca del genotip 1 han mostrat que tots els anticossos antiSar-55 neutralitzaven aquesta nova soca a excepció de HEV#31, que no ho feia (Emerson, comunicació personal). Les limitacions dels sistemes *in vitro* no permeten obtenir resultats concluent.

Capítol 5. Estudis de l'antigenicitat de l'epítop neutralitzant del VHE.

Els resultats obtinguts confirmen que a la regió estudiada existeixen epítops comuns a les soques Sar55 i Mex14 pertanyents al genotip 1 i 2, respectivament. Meng i col. (2001) ja havien observat que 3 genotips diferents (genotips 1, 2 i 3) eren neutralitzats per anticossos generats contra un pèptid que contenia els aa 452 a 617 d'una soca birmana. L'existència d'aquests epítops neutralitzants comuns en soques pertanyents a diferents genotips obre la possibilitat al disseny d'una vacuna capaç de generar una resposta humoral efectiva contra un ampli nombre de genotips. Actualment ja existeix una vacuna basada en la soca Sar55 que està essent assajada i que confereix protecció davant la malaltia provocada per soques homòloques (genotip 1) i heteròlogues (genotips 2 i 3) (Purcell i col, 2003). La majoria de kits comercials de diagnòstic existents utilitzen antigens derivats de les regions de l'ORF2 i ORF3 d'una o 2 soques de regions endèmiques, com Abbott o Biokit, respectivament. L'existència d'epítops comuns permet l'ús d'aquests kits pel diagnòstic d'infeccions per VHE a regions considerades fins ara com a no endèmiques, com Espanya, a on les soques detectades pertanyen al genotip 3. Si es confirma que els canvis puntuals a la seqüència d'aa no afecten al reconeixement de l'epítop neutralitzant per part dels anticossos, és probable que els pocs canvis observats a la regió de l'ORF2 utilitzada per la detecció de les soques presents a Barcelona i adjacent a la regió estudiada tampoc representin canvis significatius en relació amb la reactivitat immunogènica del virus.

