USO DE MICROESFERAS DE µNS-Mi Y DEL SISTEMA IC-TAGGING EN LA OBTENCIÓN DE VACUNAS

Laura Casares Pérez [1], Jose Manuel Martínez Costas [1]
(1) Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, CiQUS- Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares

INTRODUCIÓN

La proteína µNS es una proteína no estructural del reovirus aviar S1133 que se encarga de formar el armazón de las denominadas "factorías virales" y de reclutar otras proteínas a estas inclusiones [1]. Tras varios experimentos en los cuales se fue acortando gradualmente la longitud de la proteína se descubrió la denominada µNS-Mi, la fracción mínima capaz de crear inclusiones. A su vez, se observó que había una región de esta misma proteína llamada Intercoil o IC con una enorme afinidad por estas factorías virales. Aprovechando las propiedades de estas dos regiones de µNS se diseñó el sistema IC-tagging. El fundamento básico de este sistema de etiquetado molecular es la capacidad de µNS para atraer proteínas cuya secuencia haya sido fusionada con IC a las inclusiones [2].
El procedimiento IC-tagging tiene una clara aplicación en el ámbito de las vacunas. Sería muy útil marcar epítopos externos al sistema inmune con IC y así presentarlos en las microesferas de forma rápida y poco costosa. Además, su morfología globular y estructura ordenada las hacen no tóxicas para la célula y por lo tanto ideales para un sistema de obtención de vacunas.[3]

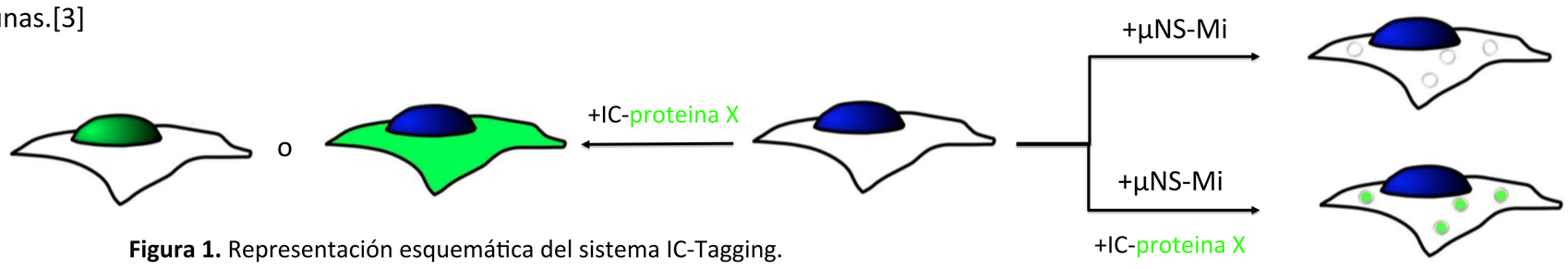


Figura 1. Representación esquemática del sistema IC-Tagging.

SISTEMA IC-TAGGING EN CÉLULAS DE MAMIFERO

Tranfección de cel HeLa

- ✓ 1 µg de ADN
- ✓ 100 µL medio de cultivo
- ✓ 3 µl de agente de transfección (FuGENE)

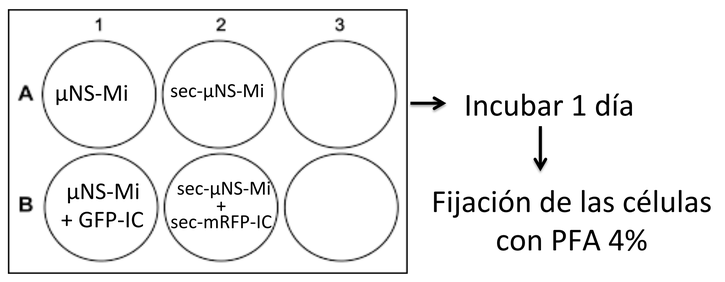
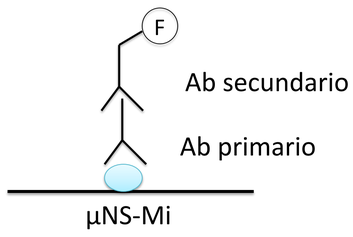


Figura 2. Monocapas de células HeLa en Multiwell. En cada pocillo se transfectan con los plásmidos correspondientes.

Inmunofluorescencia

1. Permeabilización de las células con PBS + 0,05% Triton.
2. Solución de agente bloqueante PBS + 2% BSA.
3. Incubar 60 min con anticuerpo primario anti-µNS.
4. Lavar con PBS + 2% BSA.
5. Incubar 30 min en ausencia de luz con anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo y DAPI.
6. Lavar con PBS + 2% BSA.
7. Montar con Mowiol y microscopía.



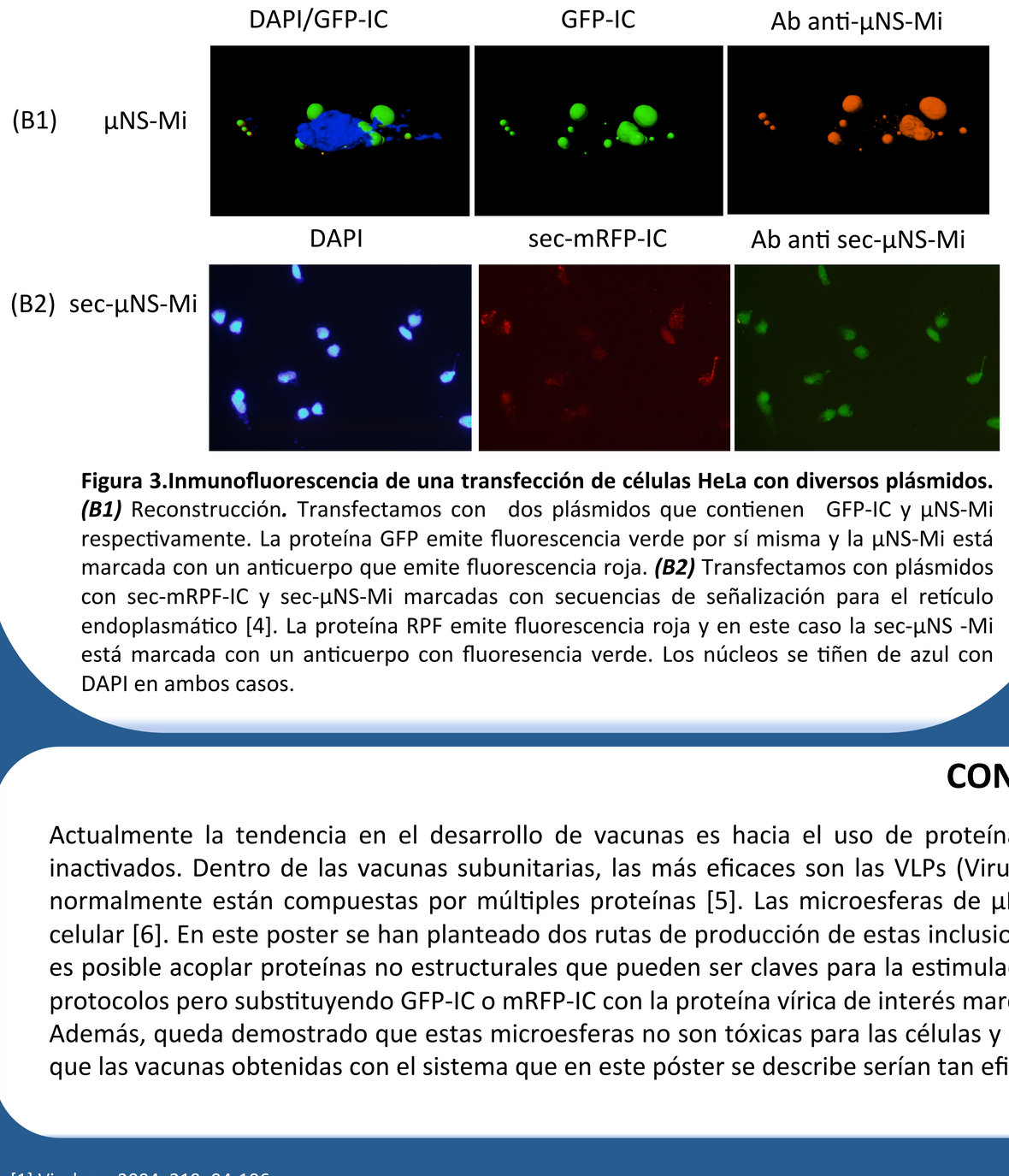


Figura 3.Inmunofluorescencia de una transfección de células HeLa con diversos plásmidos. ***(B1)*** Reconstrucción**.** Transfectamos con dos plásmidos que contienen GFP-IC y µNS-Mi respectivamente. La proteína GFP emite fluorescencia verde por sí misma y la µNS-Mi está marcada con un anticuerpo que emite fluorescencia roja. ***(B2)*** Transfectamos con plásmidos con sec-mRPF-IC y sec-µNS-Mi marcadas con secuencias de señalización para el retículo endoplasmático [4]. La proteína RPF emite fluorescencia roja y en este caso la sec-µNS -Mi está marcada con un anticuerpo con fluoresencia verde. Los núcleos se tiñen de azul con DAPI en ambos casos.

SISTEMA IC-TAGGING EN CÉLULAS DE INSECTO Sf9

Infección de cel Sf9 con baculovirus

Utilizaremos 100 µL de disoluciones de baculovirus recombinantes:

- ✓ Bac-µNS-Mi (expresa µNS-Mi)
- ✓ Bac-GFP-IC (expresa GFP-IC)
- ✓ Bac-sec-µNS-Mi (expresa µNS-Mi del retículo)
- ✓ Bac-sec-mRFP-IC (expresa RFP-IC)

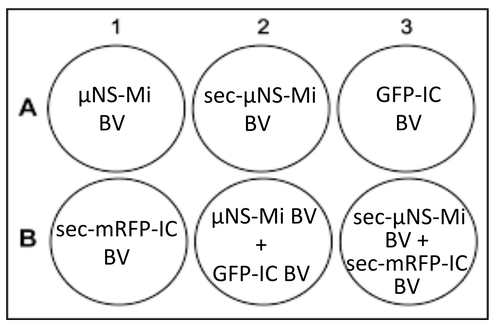
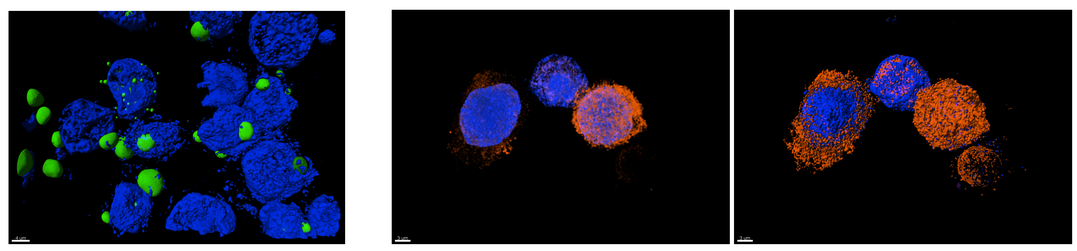


Figura 4. Monocapas de células Sf9 en Multiwell. Cada pocillo se infecta con cierto tipo de baculovirus.



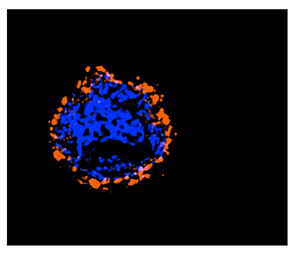


Figura 5. Inmunofluorescencia de la infección de cel sf9 con baculovirus. ***(B2)*** Células infectadas con dos tipos de BV, uno que expresa µNS-Mi y otro GFP-IC. Los núcleos se tiñen de azul con DAPI y las inclusiones se ven en verde gracias a la GFP. ***(B3)*** Células infectadas con Bac-sec-µNS-Mi y Bac-sec-mRFP-IC. *(B3.1)* Vista con microscopía de fluorescencia y reconstrucción. Los núcleos se tiñen de azul y las microesferas del retículo aparecen en rojo debido a la mRFP. *(B3.2)* Corte confocal que nos permite ver como las inclusiones se localizan en el retículo endoplasmático rodeando el núcleo.

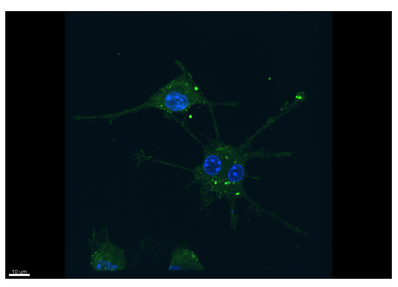


Figura 6. Incubación de un cultivo de macrófagos con microesferas de µNS-Mi con GFP-IC. Se incuban macrófagos durante 30 minutos y posteriormente los núcleos se tiñen de azul con DAPI y las microesferas se ven en verde gracias a la GFP.

CONCLUSIONES

Actualmente la tendencia en el desarrollo de vacunas es hacia el uso de proteínas víricas como inmunógenos, evitando así el uso de organismos vivos aunque estos estén inactivados. Dentro de las vacunas subunitarias, las más eficaces son las VLPs (Virus-Like Particles) pero su producción puede ser complicada al tratarse de cápsides víricas que normalmente están compuestas por múltiples proteínas [5]. Las microesferas de µNS-Mi han demostrado su capacidad de estimular la respuesta inmune, tanto humoral como celular [6]. En este poster se han planteado dos rutas de producción de estas inclusiones, sencillas y poco costosas. También hay que tener en cuenta que con el sistema IC-Tagging es posible acoplar proteínas no estructurales que pueden ser claves para la estimulación del sistema inmune. Para obtener vacunas de este tipo tendríamos que seguir los mismos protocolos pero substituyendo GFP-IC o mRFP-IC con la proteína vírica de interés marcada con el tag Intercoil.
Además, queda demostrado que estas microesferas no son tóxicas para las células y que son facilmente fagocitables por macrófagos en experimentos *in vitro*. Todo esto nos indica que las vacunas obtenidas con el sistema que en este póster se describe serían tan eficaces como las VLPs, siendo más fáciles de producir y purificar que estas.

[1] Virology. 2004, 319: 94-106.
[2] Plos One. 2010, 5 (11): e13785.
[3] PLoS One. 2010 Nov 12;5(11):e13961.
[4]Proteína muNS capaz de formar inclusiones en el reticulo endoplasmatico, métodos de uso y usos de la misma. ES2548784.
[5] Vaccine. 2012 Dec 17;31(1):58-83.
[6] Antiviral Res. 2014 Oct;110:42-51.