

NOTA TÉCNICA

Anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante NS3 del virus del dengue

Liliana Morales¹, Myriam L. Velandia², María Angélica Calderón²,
Jaime E. Castellanos², Jacqueline Chaparro-Olaya¹

¹ Instituto de Biología Molecular, Laboratorio de Parasitología Molecular, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

² Instituto de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El dengue es una enfermedad causada por uno de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV) y es endémica en, aproximadamente, 130 países. Su incidencia ha aumentado notablemente en las últimas décadas, así como la frecuencia y la magnitud de los brotes. A pesar de los esfuerzos, no existen tratamientos profilácticos ni terapéuticos contra la enfermedad y, en ese contexto, el estudio de los procesos que gobiernan el ciclo de infección del DENV es esencial para desarrollar vacunas o terapias antivirales. Una de las moléculas del DENV más prometedoras es la proteína no estructural 3 (NS3), la cual es indispensable para la replicación viral y es uno de los principales blancos inmunológicos durante la infección.

Objetivo. Producir anticuerpos policlonales para contribuir a los futuros estudios sobre las interacciones entre la proteína NS3 y otras proteínas celulares.

Materiales y métodos. Se expresaron dos proteínas recombinantes del dominio helicasa de NS3 del DENV de serotipo 2, las cuales se emplearon para inmunizar ratas y producir anticuerpos policlonales.

Resultados. Los anticuerpos producidos fueron útiles en ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia y se reportó por primera vez un anticuerpo policlonal anti-NS3 que permitió la inmunoprecipitación de la proteína viral y la detecta con *Western blot* sin necesidad de inducir sobreexpresión de NS3 o de usar extractos de células marcados metabólicamente con radioisótopos.

Conclusión. Las proteínas recombinantes expresadas y los anticuerpos producidos constituyen herramientas valiosas para estudiar procesos infecciosos del DENV que involucren a la proteína NS3 y evaluar pruebas dirigidas a interferir las funciones de esta proteína.

Palabras clave: virus del dengue; proteínas recombinantes; inmunoprecipitación; producción de anticuerpos; *Western blotting*.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3249>

Polyclonal antibodies against recombinant dengue virus NS3 protein

Introduction: Dengue is a disease caused by one of four serotypes of the dengue virus (DENV) and is endemic in approximately 130 countries. The incidence of dengue has increased dramatically in recent decades, as well as the frequency and magnitude of outbreaks. Despite all efforts, there are no prophylactic or therapeutic treatments for the disease. Accordingly, research on the processes governing the DENV infection cycle is essential to develop vaccines or antiviral therapies. One of the most attractive DENV molecules to investigate is nonstructural protein 3 (NS3), which is essential for viral replication and a major immune target for infection.

Objective: To produce antibodies to support future studies on NS3 and its cellular interactions with other proteins.

Materials and methods: Two recombinant proteins of the helicase domain of DENV NS3 serotype 2 were expressed, and used to immunize mice and produce polyclonal antibodies.

Results: The antibodies produced were useful in Western blot and immunofluorescence tests. We report an NS3 antibody that immunoprecipitates the viral protein and detects it in Western blot with no need to over-express it or use cell extracts with metabolic radiolabeling.

Contribución de los autores:

Myriam L. Velandia y Jacqueline Chaparro-Olaya: concepción del estudio

Liliana Morales y María Angélica Calderón: procedimientos de laboratorio

Liliana Morales y Jacqueline Chaparro-Olaya: escritura del manuscrito

Todos los autores participaron en el análisis e interpretación de los datos y aprobaron el manuscrito final.

Conclusion: The recombinant proteins expressed and the antibodies produced constitute valuable tools for studying DENV infectious processes involving NS3 and for evaluating tests designed to interfere with its functions.

Key words: Dengue virus; recombinant protein; immunofluorescence; immunoprecipitation; antibody production; blotting, Western.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3249>

El virus del dengue (DENV) es un miembro del género *Flavivirus* y es el patógeno viral humano transmitido por mosquitos más importante en el mundo. En la actualidad, la incidencia del dengue es 30 veces mayor que hace 50 años y se estima que se presentan anualmente 390 millones de infecciones (1). A pesar de los esfuerzos, no existen vacunas o medicamentos para tratar esta enfermedad.

Hasta el momento se han identificado cuatro serotipos del DENV (DENV 1-4) y todos ellos tienen un genoma de ARN de cadena sencilla y sentido positivo, el cual codifica para una única poliproteína que es procesada para dar lugar a tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (2,3). El procesamiento de la poliproteína es llevado a cabo por proteasas de la célula huésped y por la proteasa viral, la cual está constituida por el dominio N-terminal de la proteína NS3, que actúa con la proteína NS2B como cofactor (4).

Por su parte, la región C-terminal de la proteína NS3 alberga actividades de la enzima helicasa del ARN, del nucleótido del trifosfato de adenosina (NTPasa) (nucleótido de trifosfatasa) (5) y la RTPasa (ARN 5'-trifosfatasa) (6), las cuales convierten la proteína NS3 en una proteína con múltiples funciones durante el ciclo de replicación del DENV. Además, se ha demostrado que la proteína NS3 es una proteína inmunodominante y uno de los blancos más significativos de la reacción de los linfocitos T durante la infección con el DENV (7,8). Todas estas características la han convertido en un blanco terapéutico valioso y, por lo tanto, en un objeto interesante de estudio.

El objetivo de este trabajo fue expresar proteínas recombinantes de NS3 y a partir de ellas producir anticuerpos policlonales útiles en ensayos de *Western blot*, inmunofluorescencia e inmunoprecipitación. Estas proteínas recombinantes y los anticuerpos producidos pueden llegar a ser herramientas valiosas en el estudio de las interacciones entre la NS3 y las proteínas celulares, así como en la detección de la replicación viral *in vivo*.

Materiales y métodos

Clonación

El virus DENV2 empleado (INS-2009) es el pasaje 6 de un aislamiento colombiano adaptado a células C6/36, gentilmente cedido por Jairo Méndez del Grupo de Virología del Instituto Nacional de Salud de Colombia. Antes del inicio de este trabajo, se confirmó que se trataba de un DENV2 mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) semianidada para los genes de cápside y premembrana (C-PreM), según lo descrito por Chien, et al. (9).

Para obtener el ARN viral, se infectaron células C6/36 (ATCC) con el virus INS-2009 y, a partir de los sobrenadantes de los cultivos, se hizo la extracción utilizando el estuche QIAamp Viral RNA® (Qiagen). Para la síntesis del ADN complementario se usó 1 µg del ARN extraído, 200 U de transcriptasa inversa del virus de la leucemia de ratón de Moloney (*Moloney Murine Leukemia Virus*, MMLV) (Promega), 200 U del inhibidor de la ribonucleasa RNAsin (Promega), 0,6 µg de iniciadores aleatorios (Promega) y 0,5 mM de desoxirribonucleótidos de trifosfato (dNTP).

El ADN complementario obtenido se usó como plantilla para amplificar mediante PCR dos regiones del extremo C-terminal de NS3, dominio en el cual se encuentran los epítomos más antigénicos de la proteína (10). Para ello, se usó el genoma de la cepa de referencia 16681 de DENV2 (NC_001474.2), del cual se extrajo la secuencia de nucleótidos que correspondía a la proteína NS3.

Con esta secuencia se alimentó el programa *Primer Designer* (versión 1.01) (http://www.scied.com/pr_cmpro.htm), conservando todos los parámetros

Correspondencia:

Jacqueline Chaparro-Olaya, Instituto de Biología Molecular, Laboratorio de Parasitología Molecular, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque, Avenida Carrera 9 N° 131-A-02, edificio D, segundo piso, Bogotá, D. C., Colombia
Teléfono: (571) 648 9000, extensión 1522; fax: (571) 648 9066
chapparojacqueline@unbosque.edu.co

Recibido: 18/02/16; aceptado: 31/05/16

establecidos por defecto y se eligieron dos parejas de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos diseñados daban lugar a dos amplicones de 399 y 606 pb, los cuales correspondían a los aminoácidos 176 a 303 y 403 a 599 de NS3. Como la cepa de referencia 16681 es de origen tailandés, se hizo un alineamiento entre cada uno de los oligonucleótidos diseñados y los genomas de 11 aislamientos colombianos de DENV2 (números de acceso en Genbank: EU854294.1, FJ024473.1, FJ024474.1, FJ024475.1, FJ182012.1, GQ868553.1, GQ868555.1, GQ868556.1, GQ868557.1, GQ868558.1 y GU131947.1). Dos de los oligonucleótidos presentaron una identidad del 100 % con las 11 secuencias analizadas, otro presentó identidad en 14 de 15 residuos y, el otro, en 14 de 17 residuos.

Las secuencias de estos dos últimos se ajustaron para obtener una identidad del 100 % con las secuencias de los aislamientos colombianos, y los cuatro oligonucleótidos fueron sintetizados por MacroGen. Así, el amplicón de 399 pb se obtuvo con el oligonucleótido sentido CATATGCCAGAGA TCGAAGATGAC y antisentido GGATCCTAATCG AGTTGAAATGTA, y el amplicón de 606 pb se obtuvo con el oligonucleótido sentido CATATGG ACTTTGTGGTCACGAC y antisentido GGATCC TAACCTAGCATCCAACC (las secuencias de reconocimiento para las enzimas NdeI y BamHI aparecen subrayadas).

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 1 mM de cloruro de magnesio (MgCl₂), 200 μM de dNTP, 0,5 U de ADN polimerasa TaqPlatinum (Invitrogen) y 0,5 μM de cada oligonucleótido. El programa de amplificación comprendió una desnaturación inicial a 95 °C durante tres minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturación (a 94 °C durante 30 segundos), hibridación (a 50 °C durante 30 segundos) y extensión (a 72 °C durante 30 segundos), y una extensión final a 72 °C durante cinco minutos.

Los amplicones se purificaron de geles de agarosa con el estuche Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y se clonaron en el vector pJET1.2/blunt (ThermoScientific). Luego, los fragmentos se liberaron por digestión con las enzimas NdeI y BamHI (New England Biolabs, NEB), y se subclonaron en el vector pMALc5x (NEB). En este vector, los fragmentos se insertan corriente abajo del gen *malE* que codifica para una proteína de unión a maltosa (MBP) de 42,5 kDa, lo cual resulta en la expresión de proteínas de fusión MBP. Los dos constructos pMALc5x se usaron para transformar

bacterias *Escherichia coli* NEB Express (NEB) y luego se detectaron las colonias positivas mediante PCR. Para confirmar su identidad se purificó ADN 'plasmídico' (WizardPlus SV Minipreps DNA Purification®, Promega) y se usó un servicio de secuenciación (MacroGen). La secuencia se envió al GenBank (número de acceso: KX303476).

Por último, el peso molecular teórico de las proteínas recombinantes denominadas como NS3^{176_303} y NS3^{403_599}, se calculó con la herramienta ExPASy compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/).

Producción de las proteínas recombinantes

La expresión de NS3^{176_303} y NS3^{403_599} se hizo en 10 ml de medio Luria Bertani (LB, Sigma) con suplemento de 100 μg/ml de ampicilina (Amresco) (LB+Amp). Los cultivos se incubaron hasta alcanzar una densidad óptica (DO₆₀₀) de ≈0,4, momento en el cual se añadió isopropil-beta-tiogalactopiranosido (IPTG) (Promega) a una concentración final de 0,3 mM, y se permitió el crecimiento a 37 °C con agitación a 200 rpm.

De cada cultivo se tomaron muestras de 1 ml justo antes de la inducción (tiempo 0), y una, dos, tres y 16 horas después de la inducción. Posteriormente, de cada muestra se tomó una alícuota que se preparó con solución tampón Laemmli y se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) para monitorizar la expresión.

El volumen restante se usó para establecer si las proteínas recombinantes NS3^{176_303} y NS3^{403_599} se encontraban en la fracción soluble o en la insoluble. Para esto, la suspensión bacteriana se centrifugó y los sedimentos se sometieron de nuevo a suspensión en solución tampón de lisis (5 mM de imidazol; 0,5 M de NaCl; 10 % de glicerol; 20 mM de Tris-HCl, pH 7,9; 1 % de Triton X-100), a choque térmico (10 minutos en nitrógeno líquido seguidos de una incubación a 37 °C), a sonicación y a centrifugación.

Los sobrenadantes y los sedimentos resultantes se sometieron a SDS-PAGE (10 %). A continuación se hizo una expresión a mayor escala inoculando una colonia de cada proteína recombinante en 500 ml (para NS3^{176_303}) o 250 ml (para NS3^{403_599}) de medio LB+Amp. La expresión se indujo con las mismas condiciones ya descritas y la cosecha de las bacterias se hizo a las tres horas de la inducción para NS3^{176_303} y, a las 16, para NS3^{403_599}. Las bacterias se sometieron a lisis como se describió anteriormente y los sobrenadantes se usaron para

hacer una cromatografía de afinidad sobre resina de amilosa (NEB), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las proteínas se liberaron de la resina con solución tampón maltosa (10 mM) y se recolectaron fracciones (500 µl) que se cuantificaron mediante el método de Bradford.

Producción de los anticuerpos

Cada proteína recombinante se inoculó por vía intraperitoneal en dos ratas macho Wistar de cuatro semanas de edad. El esquema de inmunización comprendió una dosis de sensibilización con Imject Alum Adjuvant® (ThermoScientific), una primera dosis de 100 µg de proteína recombinante con adyuvante ocho días después, y dos refuerzos de 50 µg, 15 y 30 días después de la primera dosis. Las ratas se sacrificaron ocho días después de la última inoculación, los sueros se recuperaron y a partir de ellos se purificaron por afinidad los anticuerpos anti-NS3^{176_303} y anti-NS3^{403_599}, siguiendo el protocolo descrito por Smith, et al. (11).

Cultivo celular en infección

Las células BHK-21 (ATCC) y A549 (ATCC) se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma) con suplemento de 10 % de suero fetal bobino (FBS) (Hyclone), a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂. Cuando las células alcanzaron una confluencia de ≈80 %, se infectaron con DENV2 (aislamiento colombiano INS-2009) (MOI: 1) suspendido en DMEM con FBS al 2 %. Las células se mantuvieron en cultivo hasta 24, 48 o 72 horas después de la infección.

Ensayos de Western blot

A las 48 horas de la infección, las células BHK-21 y A549 se trataron con tripsina (0,25 % de tripsina, 0,5 mM de EDTA), se centrifugaron, y el sedimento se sometió a lisis con solución tampón RIPA (25 mM de Tris-HCl, pH 7,6; 150 mM de NaCl; 1 % de detergente NP-40; 1 % de deoxicolato de sodio; 0,1 % de dodecilsulfato sódico, SDS) y con suplemento de inhibidores de proteasas (Sigma). Los extractos celulares se cuantificaron con el método del ácido bicinonínico y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Para los ensayos de *Western blot* con los sueros crudos de las ratas, se sometieron a SDS-PAGE (10 %) 25 µg de cada extracto celular y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (ThermoScientific), que luego se bloquearon con solución tampón salina con Tween 20 y leche (0,1 % de TBST y 5 % de leche descremada).

A continuación, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con diferentes diluciones de los sueros crudos (1:500, 1:1000 y 1:2000 en TBST y leche). Al día siguiente, las membranas se lavaron con TBST y se incubaron con el anticuerpo secundario (1:10.000) (anti-rata, conjugado con biotina, Pierce 31830) durante una hora a temperatura ambiente y luego se reveló mediante la adición de estreptavidina-HRP (1:10.000) (ThermoScientific), peróxido de hidrógeno (0,02 %) y diaminobencidina (DAB) (0,05 %). Como control, se incubó una membrana con un anticuerpo policlonal anti-NS3 comercial producido en conejo (1:1.000) (GTX124252, GeneTex) y luego con un anticuerpo anti-conejo de unión a biotina (1:2.000) (Sigma B8895), bajo las mismas condiciones ya descritas.

Para los ensayos de *Western blot* con los anticuerpos purificados, se sometieron a SDS-PAGE (8 %) 20 µg de cada extracto celular, y se hizo la transferencia, el bloqueo y la incubación con los anticuerpos anti-NS3^{176_303} y anti-NS3^{403_599} purificados (1:1000), y con los sueros preinmunes (1:1.000), bajo las mismas condiciones ya descritas. Al día siguiente, las membranas se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (1:5000) (anti-rata_HRP, Thermo Scientific, 31470) durante una hora a temperatura ambiente. El revelado se hizo con peróxido de hidrógeno (0,02 %) y DAB (0,05 %).

Ensayos de inmunofluorescencia (IF)

Se sembraron células BHK-21 sobre laminillas previamente tratadas con poli-L-lisina (10 µg/ml) e infectadas con DENV2, como ya se describió. Las células se mantuvieron en cultivo durante 24, 48 o 72 horas, tras lo cual se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se hicieron permeables con Tritón X-100 (0,3 %, Sigma) durante 30 minutos y se incubaron con suero de cabra (Gibco) al 10 % durante tres horas.

A continuación, las laminillas se incubaron durante una hora a 37 °C con el anticuerpo anti-NS3^{176_303} (1:250), el anticuerpo anti-NS3^{403_599} (1:500) o el anticuerpo GTX124252 (1:500), y después, con los respectivos anticuerpos secundarios biotinilados.

Las células se lavaron con solución tampón fosfato salino y se incubaron con estreptavidina acoplada al colorante Alexa 594 (Molecular Probes). Después, se contrastaron los núcleos con una solución de Hoechst 33342 (Sigma), las laminillas se montaron con Vectashield (Vector) sobre una

lámina portaobjeto y se observaron las células bajo microscopio (Zeiss Axioimager A2) utilizando un sistema de fluorescencia X-Cite serie 120Q y el programa ZEN 2012.

Como control positivo, se prepararon laminillas con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína de envoltura (E) del virus de la encefalitis de San Luis (1:500, Millipore MAB8744), el cual tiene reacción cruzada con la proteína E del DENV2. Como anticuerpo secundario en este experimento, se usó un anticuerpo anti-ratón conjugado con biotina (1:200, Vector BA9200). Como controles negativos, se usaron los sueros preinmunes NS3^{176_303} (1:250) y NS3^{403_599} (1:500) en células infectadas, y los anticuerpos anti-NS3^{176_303} (1:250) y anti-NS3^{403_599} (1:500) en células no infectadas.

Ensayos de inmunoprecipitación

Los ensayos de inmunoprecipitación se hicieron con el anticuerpo anti-NS3^{403_599} como modelo de experimentación. Para esto, 10 µl del anticuerpo se agregaron a 200 µg de extracto de células BHK-21 infectadas con DENV2 (obtenido según se describió antes) y la mezcla se incubó en agitación orbital sobre hielo durante cuatro horas. A continuación, se añadieron proteínas A y G inmovilizadas sobre perlas de agarosa (ThermoScientific) y se incubó en agitación toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las perlas se recolectaron por centrifugación, se lavaron con solución tampón de inmunoprecipitación (50 mM de Tris HCl, pH 7,5; 100 mM de NaCl; 0,1 % de Tritón X-100) y se sometieron de nuevo a suspensión con solución tampón Laemmli para ser analizadas por *Western blot*. Se hicieron dos experimentos de control bajo las mismas condiciones ya descritas: en uno se usaron 10 µl de suero preinmune en la inmunoprecipitación y en el otro no se agregó anticuerpo.

Los proyectos en los cuales se enmarca este trabajo (130852128608 y UB.270-2010) cuentan con el aval ético del Comité Institucional de Ética en Investigaciones de la Universidad El Bosque, del 29 de septiembre de 2010.

Resultados

Expresión de las proteínas recombinantes y producción de los anticuerpos

El peso molecular teórico de NS3^{176_303} y NS3^{403_599} se calculó en 58.381 Da (≈58 kDa) y 66.068 Da (≈66 kDa), respectivamente. La expresión de cada proteína recombinante se hizo primero en 10 ml de

medio LB+Amp para establecer el tiempo adecuado de cosecha de las bacterias y la solubilidad de cada proteína recombinante.

La expresión de la proteína NS3^{176_303} fue detectable una hora después de la inducción y alcanzó su máximo a las tres horas. La expresión de la proteína NS3^{403_599} fue detectable a las dos horas de la inducción y alcanzó su máximo a las tres horas; sin embargo, se obtuvo más proteína NS3^{403_599} soluble a las 16 horas (no se presentan los datos), razón por la cual se eligió ese tiempo para hacer la expresión a mayor escala. En las figuras 1A y 1B se observa que las dos proteínas migraron a la altura esperada y se detectaron tanto en la fracción soluble (S) como en la insoluble (P).

A continuación, se hizo una expresión a mayor escala seguida por una cromatografía de afinidad sobre resina de amilosa. En las figuras 1C y 1D se observa la SDS-PAGE de las fracciones recuperadas en las cromatografías para las proteínas recombinantes NS3^{176_303} y NS3^{403_599}, respectivamente. Se observaron las bandas esperadas y una banda de menor peso molecular (≈42 kDa) que en los ensayos de *Western blot* con un anticuerpo anti-MBP (NEB E8032S), la cual se identificó como la etiqueta MBP (no se presentan los datos).

Para la inmunización de las ratas, se usó como antígeno la mezcla de las fracciones 4 y 5 de la cromatografía para NS3^{176_303} (figura 1C, carriles 4 y 5) y la mezcla de las fracciones 6 y 7 de la cromatografía para NS3^{403_599} (figura 1D, carriles 6 y 7). La concentración de proteína en esas mezclas, determinada mediante el método de Bradford, fue de 650 µg/ml y 740 µg/ml, respectivamente.

Ensayos de Western blot

Los sueros recuperados de las ratas inmunizadas y los anticuerpos purificados se evaluaron en ensayos de *Western blot* sobre extractos de células BHK-21 y A549 infectadas con DENV2. En la figura 2A se observa la inmunodetección de NS3 (≈70 kDa) sobre extractos de células BHK-21 y A549 infectadas con DENV2, usando tres anticuerpos diferentes: el anticuerpo comercial GTX124252 (carril 1), el suero crudo anti-NS3^{176_303} (carril 2) y el suero crudo anti-NS3^{403_599} (carril 3).

Todos los anticuerpos se usaron en una dilución de 1:1000 y reconocieron la proteína NS3 de manera específica y con igual intensidad de señal. La figura 2B muestra la detección de NS3 usando el suero crudo anti-NS3^{176_303}, el anticuerpo anti-NS3^{176_303} purificado y el suero preinmune

NS3¹⁷⁶⁻³⁰³. La proteína NS3 fue visible a la altura esperada (≈ 70 kDa) en los extractos de células BHK-21 infectadas con DENV2 e indetectable en los extractos de células no infectadas o al usar como anticuerpo primario el suero preinmune. Los mismos resultados se obtuvieron al hacer la detección de NS3 con el suero crudo anti-NS3⁴⁰³⁻⁵⁹⁹, el anticuerpo anti-NS3⁴⁰³⁻⁵⁹⁹ purificado y el suero preinmune NS3⁴⁰³⁻⁵⁹⁹ (figura 2C).

Ensayos de inmunofluorescencia

Se infectaron con DENV2 células BHK-21 mantenidas en cultivo por 24, 48 o 72, fijadas e incubadas

con anti-NS3¹⁷⁶⁻³⁰³ (1:250), anti-NS3⁴⁰³⁻⁵⁹⁹ (1:500), anti-proteína E (1:500) o el anticuerpo GTX124252 (1:500). La fluorescencia específica para todos los anticuerpos fue detectable en los tres tiempos de cultivo ensayados (no se presentan los datos). La figura 3 corresponde a células fijadas a las 48 horas de la infección y muestra que los anticuerpos anti-NS3¹⁷⁶⁻³⁰³, anti-NS3⁴⁰³⁻⁵⁹⁹ y GTX124252 tuvieron una reacción similar. No hubo detección en las células no infectadas al usar anti-NS3¹⁷⁶⁻³⁰³ (1:250) o anti-NS3⁴⁰³⁻⁵⁹⁹ (1:500), ni en las células infectadas al emplear usándolos sueros preinmunes NS3¹⁷⁶⁻³⁰³ (1:250) y NS3⁴⁰³⁻⁵⁹⁹ (1:500). Las células totales e

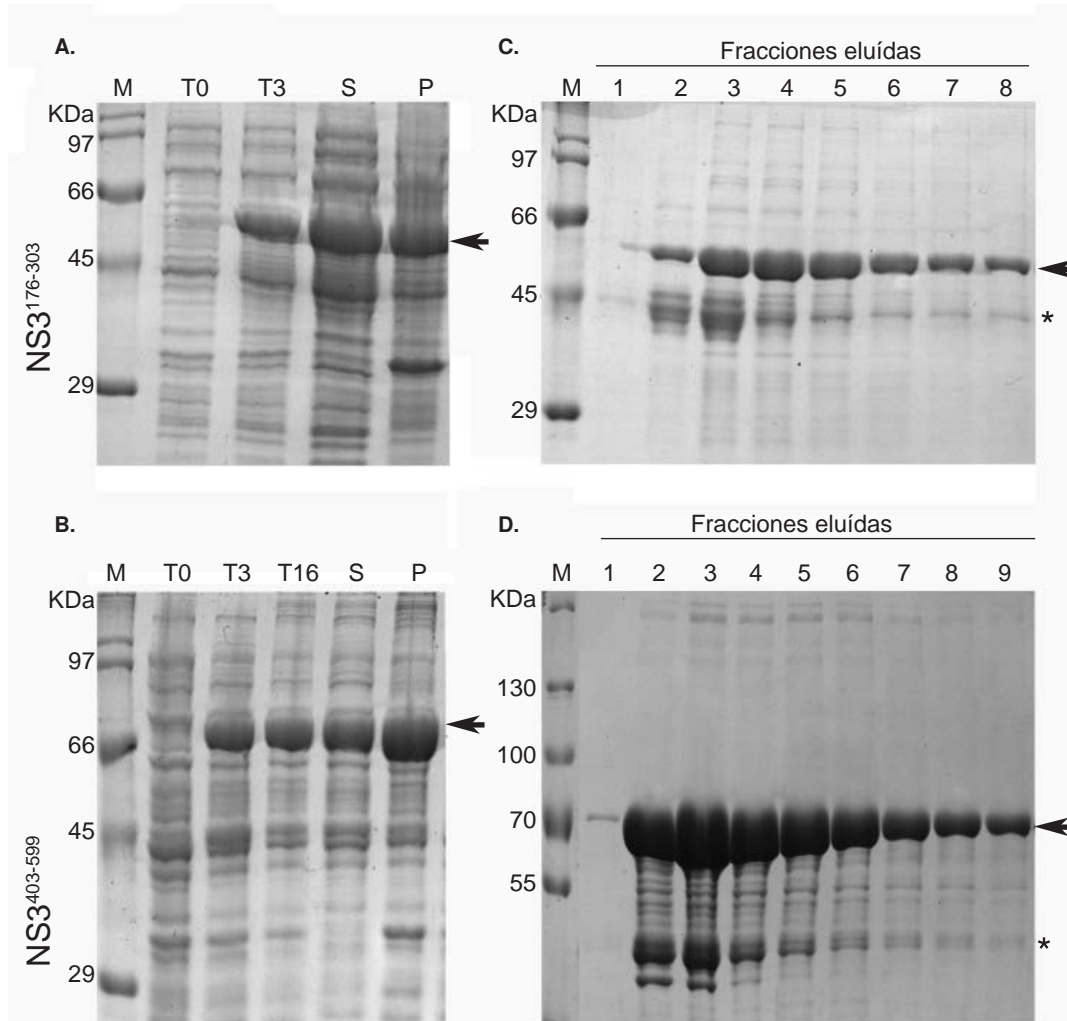


Figura 1. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes NS3¹⁷⁶⁻³⁰³ y NS3⁴⁰³⁻⁵⁹⁹. Estas se expresaron como proteínas de fusión MBP y se purificaron mediante cromatografía de afinidad. **A. y B.** SDS-PAGE (10 %) en la cual se observa la expresión de las proteínas recombinantes. M: marcador SDS6H2 (Sigma). T₀: resultado de la lisis de bacterias antes de la inducción de la expresión. T₃: resultado de la lisis de bacterias a tres horas de la inducción. T₁₆: resultado de la lisis de bacterias a 16 horas de la inducción. S: sobrenadante producto de la lisis celular. P: sedimento producto de la lisis celular. S y P corresponden al sobrenadante y al sedimento de T₃ en la figura 1A, y de T₁₆ en la figura 1B. Las flechas señalan las proteínas recombinantes. **C. y D.** SDS-PAGE (10 %) en la cual se observan las fracciones de la cromatografía de afinidad para NS3¹⁷⁶⁻³⁰³ y NS3⁴⁰³⁻⁵⁹⁹. M: SDS6H2 (Sigma) en la figura C y PageRuler Plus (Fermentas) en la figura D. Carriles 1 al 8 en C, y 1 al 9 en D: fracciones eluidas. Las flechas señalan las proteínas recombinantes. El asterisco señala la etiqueta MBP.

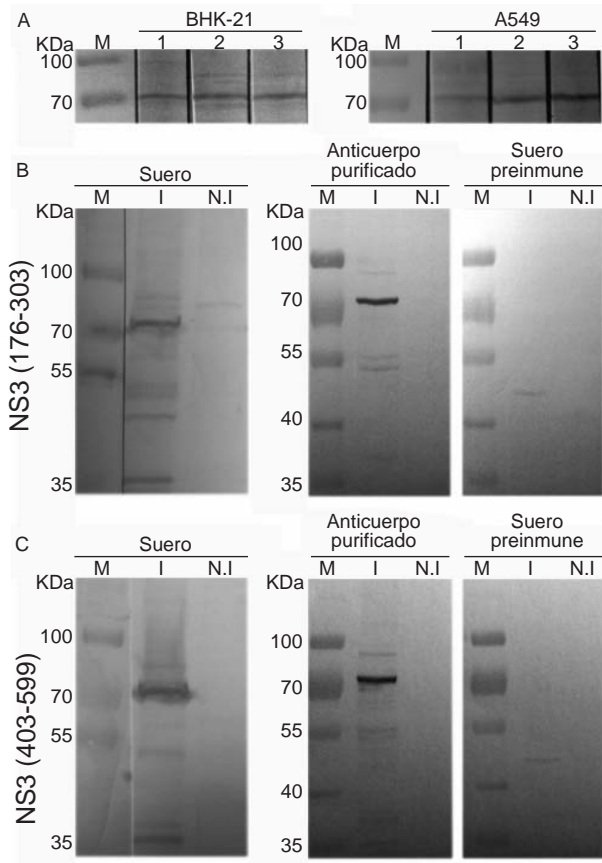


Figura 2. Inmunodetección de la proteína NS3 viral en extractos de células infectadas con DENV2. **A.** Detección de NS3 (≈ 70 kDa) en extractos de células BHK-21 y A549 infectadas con DENV2. Inmunodetección con anticuerpo comercial (1:1000) (GeneTex, GTX124252), carril 1; suero anti-NS3^{176_303} (1:1000), carril 2; suero anti-NS3^{403_599} (1:1000), carril 3. **B.** Detección de NS3 sobre extractos de células BHK-21 infectadas y no infectadas con DENV2. La inmunodetección se hizo con suero crudo anti-NS3^{176_303}, anticuerpo anti-NS3^{176_303} purificado y suero preinmune NS3^{176_303}. M: marcador PageRuler Plus (Fermentas). I: extracto de células BHK-21 infectadas con DENV2. N.I: extracto de células BHK-21 no infectadas. **C.** Igual que en **B**, pero la inmunodetección se hizo con suero crudo anti-NS3^{403_599}, anticuerpo anti-NS3^{403_599} purificado y suero preinmune NS3^{403_599}.

infectadas se contaron en las imágenes utilizando la herramienta *cell counter* (*software Image J*) y se determinaron porcentajes de infección de $\approx 30\%$ al hacer la inmunodetección con anti-NS3^{176_303} o anti-NS3^{403_599}.

Ensayos de inmunoprecipitación

Los ensayos de inmunoprecipitación se hicieron con el anticuerpo anti-NS3^{403_599} como modelo de experimentación. En la figura 4A se observa que el anticuerpo anti-NS3^{403_599} purificado permitió la inmunoprecipitación de la proteína NS3 en extractos

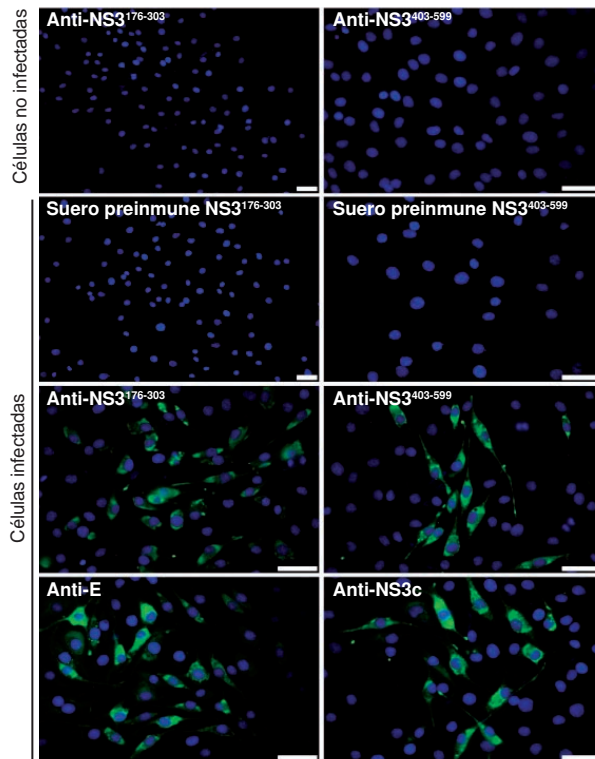


Figura 3. Detección de la proteína NS3 en células BHK-21 infectadas con DENV2. Detección de NS3 en células BHK-21 infectadas con DENV2 (MOI: 1) durante 48 horas. La detección se hizo con los sueros preinmunes NS3^{176_303} (1:250) y NS3^{403_599} (1:500), y con los anticuerpos anti-NS3^{176_303} (1:250), anti-NS3^{403_599} (1:500) y anti-NS3 comercial (NS3c) (1:500) (GeneTex, GTX124252). Como control positivo de la infección, se usó un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína de envoltura (E) (1:500) (Millipore). Los dos paneles superiores corresponden a la detección con los anticuerpos anti-NS3^{176_303} y anti-NS3^{403_599} en células no infectadas. Barra: 50 μm .

de células BHK-21 infectadas con DENV2. No hubo detección de NS3 al hacer la inmunoprecipitación con el suero preinmune NS3^{403_599} y el *Western blot* con el anticuerpo anti-NS3^{403_599} purificado, y tampoco cuando esta se hizo con el anticuerpo anti-NS3^{403_599} purificado y el *Western blot* con el suero preinmune NS3^{403_599}. En la figura 4B puede observarse que en el ensayo sin el anticuerpo, la proteína NS3 apareció en la fracción no unida y no hubo señal de ella en la inmunoprecipitación. En la figura 4C se ven los resultados de un ensayo de inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-NS3^{403_599}, pero esta vez en extractos de células A549 infectadas con DENV2. Los resultados fueron similares a los descritos antes para las células BHK-21, ya que el anticuerpo permitió la inmunoprecipitación de la proteína NS3 presente en las células A549 infectadas de forma específica.

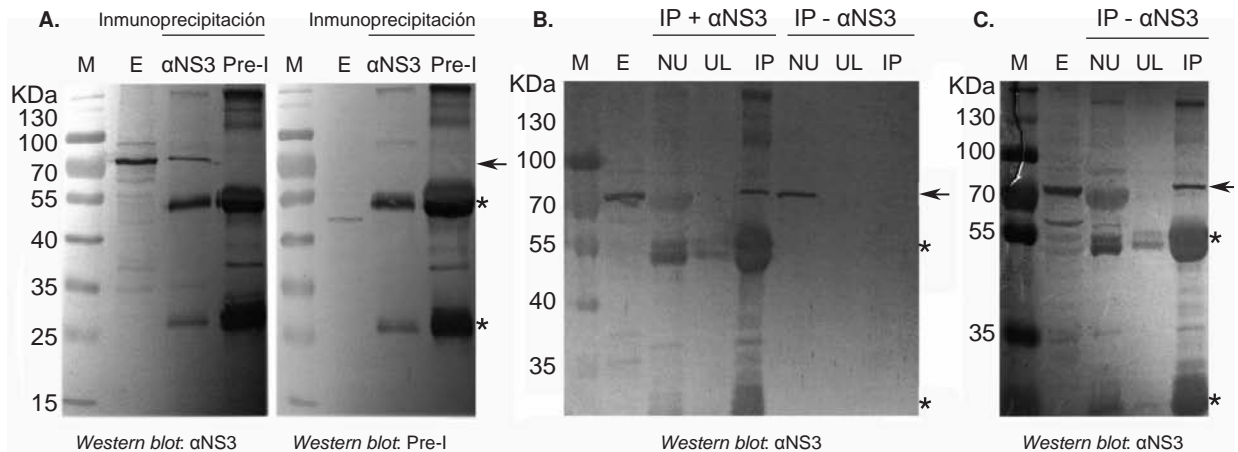


Figura 4. Desempeño del anticuerpo anti-NS3^{403_599} en ensayos de inmunoprecipitación. **A.** *Western blot* con el anticuerpo anti-NS3^{403_599} (α-NS3) o con el suero preinmune NS3^{403_599} (Pre-I), sobre la inmunoprecipitación (IP) con el anticuerpo anti-NS3^{403_599} (IP/α-NS3) o con el suero preinmune NS3^{403_599} (IP/Pre-I). **B.** *Western blot* con anti-NS3^{403_599} sobre las inmunoprecipitaciones con (IP + α-NS3) o sin (IP - α-NS3) anticuerpo anti-NS3^{403_599}. NU: fracción no unida. UL: último lavado de las perlas. **C.** Como en B, pero usando extractos de células A549 infectadas con DENV2. En **A**, **B** y **C**. Las inmunoprecipitaciones se hicieron con 200 µg de extracto de células infectadas con DENV2. La flecha indica la posición de la proteína NS3, y los asteriscos señalan las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas. E: 20 µg de extracto de células BHK21 infectadas. M: marcador PageRuler Plus (Fermentas).

Discusión

En este trabajo se logró la expresión soluble de proteínas recombinantes de dos regiones del dominio helicasa NS3 del DENV2, las cuales se usaron para inmunizar ratas y producir anticuerpos policlonales. Los dos anticuerpos anti-NS3 demostraron su eficacia en ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia, y uno de ellos (anti-NS3^{403_599}), en ensayos de inmunoprecipitación.

La proteína NS3^{176_303} contenía los residuos 176 a 303 de NS3, los cuales corresponden a gran parte del subdominio 1 (residuos 168 a 322) del dominio helicasa de la proteína viral. Por su parte, la proteína recombinante NS3^{403_599} contenía los residuos 403 a 599, los cuales corresponden a parte del subdominio 2 (residuos 323-488) y a gran parte del subdominio 3 (residuos 489 a 618). Las proteínas NS3^{176_303} y NS3^{403_599} se expresaron como proteínas de fusión MBP y ambas se obtuvieron abundantemente en la fracción soluble (figuras 1A y 1B).

Este fue un resultado notable, porque en un trabajo previo en el que se buscaba la expresión individual de los subdominios 1 o 2 del dominio helicasa de NS3, se produjeron proteínas solubles al usar DENV4, pero insolubles con el DENV2. Más aún, en ese mismo estudio la expresión del subdominio 3 produjo proteínas insolubles para ambos serotipos

y esa dificultad solo pudo resolverse para DENV4 al expresar una proteína recombinante que contenía los subdominios 2 y 3 (12). Por el contrario, en este trabajo las dos proteínas recombinantes del dominio helicasa de NS3 de DENV2 se obtuvieron de forma soluble y se alcanzaron producciones de ≈2 mg de NS3^{176_303} a partir de 500 ml de cultivo (3 horas después de la inducción) y ≈4 mg de NS3^{403_599} a partir de 250 ml de cultivo (16 horas después de la inducción). Las proteínas recombinantes purificadas se usaron para inmunizar ratas y los anticuerpos, purificados por afinidad, se emplearon en los ensayos de *Western blot*, inmunofluorescencia e inmunoprecipitación.

En los ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia se usó como control el anticuerpo GTX124252 (GeneTex), el cual se produce con una proteína recombinante que comprende los aminoácidos 354 al 568 de NS3.

En los ensayos de *Western blot*, se usaron los sueros crudos anti-NS3^{176_303} y anti-NS3^{403_599} para detectar la proteína viral (≈70 kDa) sobre extractos de células BHK-21 y A549 infectadas con DENV2. El desempeño de estos sueros, medido por la intensidad y la especificidad de la señal y la dilución de trabajo (1:1.000), fue comparable con el del anticuerpo GTX124252 (figura 2A). En los ensayos de *Western blot* en células BHK-21 no infectadas, no hubo detección de NS3, así como tampoco

con los sueros crudos, ni con los anticuerpos anti-NS3^{176_303} y anti-NS3^{403_599} purificados (figuras 2B y 2C). Tampoco hubo detección alguna en la región de ≈ 70 kDa al hacer el *Western blot* con los sueros preinmunes (figuras 2B y 2C).

Con respecto a la localización celular, además de su ubicación en el citoplasma, NS3 también se asocia a membranas mediante su cofactor NS2B (13). En los ensayos de inmunofluorescencia, tanto el anticuerpo control como los anticuerpos anti-NS3^{176_303} y anti-NS3^{403_599} detectaron la proteína NS3 en el citoplasma y, más intensamente, en la región perinuclear de las células infectadas (figura 3). Esta misma ubicación subcelular había sido descrita en células CV-1 infectadas con DENV2 (14), en células BHK-21 transfectadas con un constructo de NS3 (15) y en células Huh-7.5 y HEK 293T transfectadas con los constructos NS3 o NS2B-NS3 (16). El anticuerpo anti-NS3^{403_599} (1:500) produjo una intensidad y una distribución de fluorescencia comparables a las del anticuerpo GTX124252 (1:500), mientras que el anticuerpo anti-NS3^{176_303} (1:250) produjo una marcación más débil que hizo menos apreciables las prolongaciones citoplásmicas de las células (figura 3).

Por último, aunque en el mercado existen anticuerpos comerciales contra NS3, los fabricantes declaran no haber comprobado su utilidad en experimentos de inmunoprecipitación. Un ensayo de este tipo demanda cerca de 10 μ l de anticuerpo primario por reacción y eso hace particularmente costosa esa verificación. Ya que en este trabajo se produjeron aproximadamente 5 ml de cada anticuerpo anti-NS3 por rata, y la dilución de trabajo determinada para el anticuerpo anti-NS3^{403_599} fue igual a la del anticuerpo comercial (GTX124252) en los ensayos de *Western blot* (1:1000) e inmunofluorescencia (1:500), el paso siguiente fue establecer la eficacia de este anticuerpo en ensayos de inmunoprecipitación.

En experimentos descritos en otros estudios, este ensayo se hizo con anticuerpos anti-etiqueta (15), con sueros anti-NS3 o con fluido ascítico hiperinmune (17,18), usando extractos de células en las que se indujo la sobreexpresión de NS3 o que están marcadas metabólicamente con radioisótopos. Aunque la sobreexpresión facilita la detección de interacciones en las que participa una proteína determinada, los resultados podrían sugerir la existencia de artefactos debidos a la sobreexpresión y no necesariamente a interacciones biológicas reales.

Por otra parte, aunque la marcación metabólica le da al sistema una muy alta sensibilidad y le permite revelar interacciones indetectables con otras técnicas, tiene desventajas como los riesgos de seguridad, la generación de desechos radiactivos y la toxicidad para las células. Por eso, es importante contar con un anticuerpo que en condiciones de cultivo e infección estándar, permita la inmunoprecipitación y detección de proteínas virales de interés, para hacer el posterior análisis de las proteínas celulares que pudieran precipitarse conjuntamente con ella.

En este caso, el anticuerpo anti-NS3^{403_599} permitió la inmunoprecipitación de NS3 en extractos de células BHK-21 infectadas con DENV2 (figuras 4A y 4B). La interacción fue específica, pues no hubo detección de NS3 en el sistema donde se hizo la inmunoprecipitación con el suero preinmune (figura 4A), o en el que no se agregó anticuerpo anti-NS3^{403_599} (figura 4B). El anticuerpo anti-NS3^{403_599} también permitió la inmunoprecipitación de la proteína NS3 sobre extractos de células A549 infectadas con DENV2 (figura 4C).

Comparados con un anticuerpo monoclonal, los anticuerpos descritos en este trabajo pueden producirse más fácilmente, de forma más económica y en menor tiempo. Además, los anticuerpos anti-NS3^{176_303} y anti-NS3^{403_599} fueron eficientes para detectar la proteína NS3 en ensayos de *Western blot* (ambos), inmunofluorescencia (ambos) e inmunoprecipitación (anti-NS3^{403_599}), y no produjeron ruido de fondo con ninguna de las técnicas examinadas.

En conclusión, las proteínas recombinantes expresadas y los anticuerpos policlonales producidos constituyen herramientas valiosas para detectar la replicación viral *in vivo*, estudiar los procesos infecciosos del DENV que involucren la NS3 y evaluar las pruebas encaminadas a interferir con las funciones de esta proteína viral.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses que pudiera influenciar su juicio sobre el presente estudio. Las organizaciones de financiación no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio, el análisis de los datos, la decisión de publicar ni en la preparación del manuscrito.

Financiación

Este trabajo contó con el apoyo de Colciencias (proyecto 130852128608) y de la Universidad El Bosque (proyectos UB.270-2010 y PCI 2014-25).

Referencias

1. **Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al.*** The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496:504-7. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12060>
2. **Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM.** Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*. 1990;44:649-88. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.003245>
3. **Velandia ML, Castellanos JE.** Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. 2011;15:33-43. [http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70074-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70074-1)
4. **Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ.** Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol*. 1991;65:2467-75.
5. **Li H, Clum S, You S, Ebner KE, Padmanabhan R.** The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol*. 1999;73:3108-16.
6. **Bartelma G, Padmanabhan R.** Expression, purification, and characterization of the RNA 5'-triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3. *Virology*. 2002;299:122-32. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.2002.1504>
7. **Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Limpitikul W, Tangthawornchaikul N, Malasit P, *et al.*** Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:16922-27. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1010867107>
8. **Rivino L, Kumaran EA, Jovanovic V, Nadua K, Teo EW, Pang SW, *et al.*** Differential targeting of viral components by CD4+ versus CD8+ T lymphocytes in dengue infection. *J Virol*. 2012;87:2693-706. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02675-12>
9. **Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ.** Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1295-304. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.4.1295-1304.2006>
10. **Costa SM, Yorio AP, Gonçalves AJ, Vidale MM, Costa EC, Mohana-Borges R, *et al.*** Induction of a protective response in mice by the dengue virus NS3 protein using DNA vaccines. *PLoS One*. 2011;6:e25685. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025685>
11. **Smith DE, Fisher PA.** Identification, developmental regulation, and response to heat shock of two antigenically related forms of a major nuclear envelope protein in *Drosophila* embryos: Application of an improved method for affinity purification of antibodies using polypeptides immobilized on nitrocellulose blots. *J Cell Biol*. 1984;99:20-8. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.99.1.20>
12. **Zou J, Wang QY, Xie X, Lu S, Yau YH, Yuan Z, *et al.*** Mapping the interactions between the NS4B and NS3 proteins of dengue virus. *J Virol*. 2015;89:3471-83. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.03454-14>
13. **Mackenzie JM, Khromykh AA, Jones MK, Westaway EG.** Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology*. 1998;245:203-15. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1998.9156>
14. **Kapoor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusukawa J, Ebner KE, Padmanabhan R.** Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J Biol Chem*. 1995;270:19100-6. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.32.19100>
15. **Chua JJ, Ng MM, Chow VT.** The non-structural 3 (NS3) protein of dengue virus type 2 interacts with human nuclear receptor binding protein and is associated with alterations in membrane structure. *Virus Res*. 2004;102:151-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2004.01.025>
16. **Heaton NS, Perera R, Berger KL, Khadka S, Lacount DJ, Kuhn R J, *et al.*** Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:17345-50. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1010811107>
17. **Arias CF, Preugschat F, Strauss JH.** Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology*. 1993;193:888-99. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1993.1198>
18. **Teo KF, Wright PJ.** Internal proteolysis of the NS3 protein specified by dengue virus 2. *J Gen Virol*. 1997;78:337-41. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-78-2-337>