

Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra la proteína mayoritaria de la cápsida del fago VGJΦ de *Vibrio cholerae*.

Gustavo Falero-Díaz, Boris L. Rodríguez,** Irelio Rodríguez, Javier Campos,* Eriel Martínez,* Rosa L. Solís y Rafael Fando.*

Departamento de Anticuerpos Monoclonales, Instituto Finlay, Avenida 27, No. 19805, La Lisa, Apartado Postal 16017, Código Postal 11600, Ciudad de La Habana. *Departamento de Genética, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25, No. 15802, Playa, Ciudad de La Habana, Apartado Postal 6412, Cuba.

Recibido: 7 de noviembre de 2006. Aceptado: 8 de diciembre de 2006.

Palabras clave: anticuerpos monoclonales, proteína de la cápsida de VGJΦ, fagos de *Vibrio cholerae*.
Key words: Monoclonal Antibodies, VGJΦ capsid protein, *Vibrio cholerae* phages.

RESUMEN. El fago VGJΦ es un nuevo fago filamentosos de *Vibrio cholerae* descrito recientemente. Este fago fue aislado de la cepa SG25-1 de *V. cholerae* O139 y es capaz de infectar la mayoría de las variantes (clásica, El Tor y O139) de este microorganismo. VGJΦ utiliza como receptor un pelo tipo IV denominado hemaglutinina sensible a manosa para infectar a *V. cholerae*. Una vez dentro de los vibriones, VGJΦ puede recombinarse con el fago CTXΦ (fago portador de los genes que codifican para la toxina colérica) para formar el fago híbrido HybPΦ, que puede ser exportado por los vibriones e infectar otras cepas de este microorganismo con la posibilidad de que se introduzcan los genes de la toxina del cólera en una cepa no patogénica de *V. cholerae* y la convierta en patogénica. Todo lo anterior, hizo necesario la obtención de anticuerpos monoclonales contra este nuevo fago para su estudio y caracterización. El antígeno utilizado para la obtención de ratones BALB/c con elevados títulos de anticuerpos específicos en suero fue la proteína mayoritaria de la cápsida del fago VGJΦ. En la generación de los hibridomas se emplearon procedimientos estándar de fusión celular. Los análisis primarios y secundarios de los híbridos generados se realizaron mediante la técnica de inmunoensayo de enzima ligada (ELISA), mientras que la caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos se hicieron utilizando las técnicas de Dot Blot, Western Blot y ELISA. También se obtuvo fluido ascítico en ratones BALB/c para producir los anticuerpos monoclonales, los cuales se purificaron mediante Cromatografía de Afinidad. Este es el primer reporte en el que se describe la producción de un anticuerpo específico contra el fago VGJΦ de *V. cholerae*.

ABSTRACT. The recently discovered VGJΦ filamentous phage of *Vibrio cholerae* was isolated from the SG25-1 strain of *V. cholerae* O139 and is capable of infecting most variants (classical, El Tor and O139) of this microorganism. VGJΦ infect *V. cholerae* using a specific receptor named mannose sensitive hemagglutinin (MSHA), which is a bacterial type IV pilus. Once inside pathogenic vibrios, VGJΦ can recombine with the CTXΦ phage (a phage which carries the cholera toxin genes) to form a hybrid phage called HybPΦ, which could be exported by vibrios to infect other strains of this microorganism, with the possibility to introduce the cholera toxin genes into a nonpathogenic *V. cholerae* strain, turning it pathogenic. For all these reasons and to characterize the VGJΦ phage, in this study, specific monoclonal antibodies were generated to this phage. BALB/c mice were immunized with the VGJΦ major capsid protein, giving high serum titles specific to this protein in all mice. Standard cellular fusion procedures were used to generate the hybridomas and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to analyze all of them. Characterization of the obtained monoclonal antibodies was made by Dot Blot, Western Blot and ELISA. Monoclonal antibodies were produced in ascites fluid and purified using affinity chromatography. This is the first description for the production of a specific antibody to the *V. cholerae* VGJΦ phage.

INTRODUCCION

La tecnología de anticuerpos monoclonales (AcMs), desarrollada a partir del reporte original de Georges Köhler y Cesar Milstein en 1975,¹ se ha convertido en una poderosa herramienta que ha revolucionado el uso de las inmunoglobulinas en los campos de la investigación básica, el diagnóstico, la inmunoterapia y los procesos

industriales. Cada año son más los reportes de nuevos AcMs obtenidos en todo el mundo contra una inmensa variedad de antígenos, avalando la gran importancia de esta tecnología y su aplicación en el desarrollo actual de las ciencias biomédicas y biotecnológicas.² Uno de los campos que no ha quedado exento del uso de los AcMs es el relacionado con él de las enfermedades infecto

Correspondencia:

Boris L. Rodríguez

*Departamento de Genética, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: boris.rodriguez@cnic.edu.cu.

contagiosas, y dentro de este, el estudio del cólera,^{3,4} en el cual los AcMs han sido de gran utilidad en el estudio del agente etiológico de esta enfermedad. También, su uso ha brindado una valiosa información en la definición de una estrategia en cuanto al desarrollo de nuevas vacunas anti-cólera.

V. cholerae, el agente causal del cólera, es una bacteria Gram negativa que es capaz de colonizar el intestino delgado humano y secretar la toxina colérica, su principal factor de virulencia.⁵ Se han descrito varios fagos filamentosos específicos para *V. cholerae*, dentro de los que se pueden citar: CTX Φ , VSK, fs1, fs2 y 493.⁶⁻¹⁰ El mejor estudiado de estos fagos es el CTX Φ , el cual desempeña un papel crucial en la patogenia de *V. cholerae*, ya que porta los genes que codifican para la toxina colérica.¹⁰ Recientemente se ha aislado, de la cepa SG25-1 de *V. cholerae* O139, un nuevo fago filamentosos denominado VGJ Φ ,¹¹ el cual es capaz de infectar cepas de los serotipos O1 (tanto del biotipo clásico como El Tor) y cepas O139. Como otros fagos filamentosos, usa un pelo tipo IV para infectar *V. cholerae*, en este caso, la hemaglutinina sensible a manosa (MSHA). Además, una vez dentro de la célula es capaz de integrarse al genoma bacteriano, en el mismo sitio cromosómico que el fago CTX Φ y recombinarse con él, para formar el fago híbrido HybP Φ ,¹¹ que al ser exportado por los vibriones puede infectar una cepa no patogénica de *V. cholerae*, introducir los genes de la toxina del cólera y convertirla en patogénica.

Teniendo en cuenta la importancia del estudio de este nuevo fago de *V. cholerae*, el presente trabajo tuvo como objetivos: obtener hibridomas productores de AcMs contra la proteína mayoritaria de la cápsida (PMC) del fago VGJ Φ de *V. cholerae* y realizar una caracterización preliminar de los AcMs obtenidos.

MATERIALES Y METODOS

Inmunización de ratones BALB/c

Ratones hembras de cuatro semanas de nacidos con aproximadamente 25 g de peso, procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio, fueron inmunizados por vía subcutánea con 20 μ g de PMC, emulsionados en adyuvante de Freund (Sigma). Los animales recibieron cuatro inyecciones administradas cada 14 d, la primera, en adyuvante completo y el resto, en adyuvante incompleto de Freund. Entre 7 y 10 d posteriores a la última inyección, se les extrajo sangre para la evaluación de anticuerpos específicos en suero mediante la técnica de ELISA.

ELISA para la detección de anticuerpos anti PMC

Para la detección de anticuerpos específicos en los sueros de los ratones o sobrenadantes de los cultivos de híbridos se empleó un sistema inmunoenzimático tipo ELISA. Se recubrieron placas High Binding (Costar) con 100 μ L/pozo de PMC a una concentración 10 μ g/mL y se incubaron toda la noche a 4 °C. Para evitar reacciones inespecíficas, se bloquearon los pozos con una disolución de leche descremada (Oxoid) al 2 % en PBS durante 1 h a 37 °C. Se añadieron a los pozos 100 μ L de los sueros de los animales inmunizados (en diluciones entre 1/1 000 y 1/10 000) o los sobrenadantes de cultivo sin diluir para su evaluación. Se emplearon como controles negativos sobrenadantes de hibridomas secretores de AcMs contra antígenos no relacionados. Las muestras se incubaron 2 h a 37 °C. Después de varios lavados con PBS-Tween 20 al 0,05 % (PBS-T), se incubó durante 1 h a 37 °C con anti-IgG (molécula completa) de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma) diluido apropiada-

mente en PBS-T y 1 % de leche descremada. Después de varios lavados, la reacción se reveló con 100 μ L/pozo de orto-fenilendiamina al 0,04 % en disolución estabilizadora de citrato 0,1 mol/L pH 5, con 0,05 % (v/v) de H₂O₂ al 30 %. La reacción de detuvo con 50 μ L/pozo de H₂SO₄ 5 mol/L. Para medir la absorbancia se empleó un lector de microELISA (Labsystems Multiskan^{RS} Multisoft) a una longitud de onda de 492 nm.

Fusión celular, clonaje por dilución limitante y criopreservación de los clones de interés

Se seleccionaron los animales con los mayores títulos de anticuerpos específicos en suero y se realizó una última inyección intravenosa, tres días antes de la fusión celular, con 10 μ g del antígeno en 100 μ L de PBS. Se empleó el bazo como fuente de linfocitos y se utilizó la línea de mieloma SP₂/O para realizar las fusiones celulares con polietilenglicol 1300 (Sigma, Hybri-Max) como lo describió Campbell.¹² Las células híbridas con capacidad para producir AcMs específicos para el antígeno de interés fueron seleccionadas mediante el ELISA descrito anteriormente. Los hibridomas positivos fueron clonados y reclonados por la técnica de dilución limitante y congelados en nitrógeno líquido en presencia de 10 % de dimetilsulfóxido y 10 % de suero fetal bovino.

Caracterización de los AcMs obtenidos

■ Determinación de isotipo

La clase y subclase de los AcMs obtenidos se detectó mediante un juego de reactivos para determinación de isotipo de AcM de ratón (Sigma ImmunoTypeTM Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit), siguiendo las instrucciones del fabricante.

■ Análisis de especificidad.

Se realizó mediante Western blot y Dot blot.

Western blot. Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % en presencia de dodecilsulfato de sodio y sin β -mercaptoetanol,¹³ aplicando en todos los carriles 10⁹ partículas de VGJ Φ purificadas. Posteriormente, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham) de 0,45 μ m según Towbin.¹⁴ Después de bloquear las membranas con leche descremada al 5 % durante 1 h a temperatura ambiente (TA), las muestras se dejaron reaccionar (sobrenadantes de cultivo) toda la noche a 4 °C. Se lavaron las membranas con PBS-T y se incubaron con anti-IgG (molécula, completa) de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma) diluido apropiadamente, durante 1 h a TA. La reacción se reveló con diaminobencidina (0,2 mg/mL) (Sigma) y 0,4 % de H₂O₂ en disolución de tris 0,02 mol/L, pH 7,6.

Dot blot. Sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m (Hybond-C, Amersham) se aplicaron 100 μ L de una suspensión de fago VGJ Φ (10¹¹/mL) purificado, utilizando el aparato Dot Blotter SRC 96D, Minifold I (Schleicher & Schuell, Germany) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de bloquear las membranas con leche descremada al 5 % durante 1 h a TA, las muestras se dejaron reaccionar (sobrenadantes de cultivo) toda la noche a 4 °C. Se lavaron las membranas con PBS-T y se incubaron con anti IgG (molécula completa) de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma), diluido apropiadamente, durante 1 h a TA. La reacción se reveló con diaminobencidina (0,2 mg/mL) (Sigma) y 0,4 % de H₂O₂ en disolución de tris 0,02 mol/L, pH 7,6. Se empleó el suero de ratones inmunizados con la PMC como control positivo y el sobrenadante de un AcM no relacionado como control negativo.

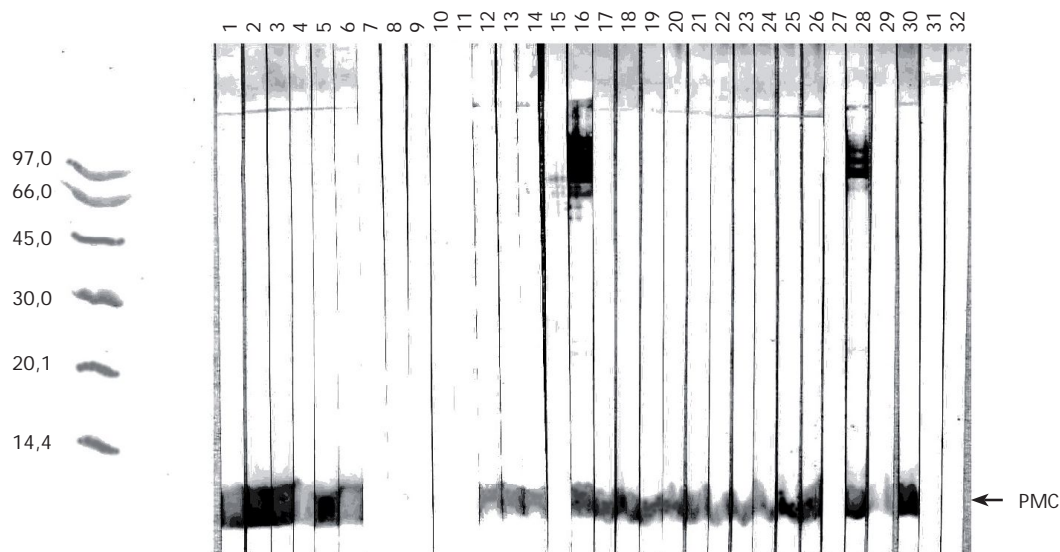


Fig. 1. Caracterización mediante Western blot de los sobrenadantes de los hibridomas generados. La muestra en los carriles 16 y 28 es suero de ratón inmunizado con el fago (Control +). La muestra en los carriles 31 y 32 es sobrenadante de AcM no relacionado (control -). Las marcas a la izquierda representan los patrones de peso molecular (Promega) y los números representan la masa molecular (kDa).

Producción de los AcMs en fluido ascítico y su purificación

Varios grupos de ratones BALB/c, con las mismas características descritas anteriormente, fueron pretratados con 0,5 mL de Pristane (Sigma) para irritarles el peritoneo y 7 a 10 d después, se les inoculó intraperitonealmente 1 mL de la suspensión celular (1 a 2 · 10⁶/mL) de cada uno de los hibridomas seleccionados. El fluido ascítico fue extraído del peritoneo, centrifugado y almacenado a -20°C hasta su uso. La purificación de los AcMs se realizó mediante cromatografía de afinidad en matriz de Proteína A sepharose fast flow (Amershan Pharmacia).¹⁵

RESULTADOS Y DISCUSION

Los bazos de los ratones con los mejores títulos en suero de anticuerpos específicos anti PMC, fueron utilizados como donante de linfocitos esplénicos para realizar las fusiones celulares. La eficiencia de fusión obtenida fue de un 88 %, mientras que la positividad de la fusión, considerada como el porcentaje de híbridos positivos en relación con la cantidad de híbridos tamizados, fue de un 9 %, valores ambos que se encuentran entre los indicadores establecidos para este tipo de procedimiento.¹² Es de destacar la elevada positividad que se logró en la fusión, lo que avala el adecuado esquema de inmunización aplicado a los ratones y la buena calidad del antígeno empleado.

Al evaluar la reactividad de los sobrenadantes de hibridomas que fueron positivos y negativos por ELISA

con la PMC, contra las partículas purificadas de VGJΦ por la técnica de Western blot (Fig. 1), se observó una buena correlación en los resultados. Además, todos los sobrenadantes positivos reaccionaron con una banda de proteína de bajo peso molecular (Fig. 1), donde se encuentra la PMC, ya que se le ha estimado un peso molecular de 2,5 kDa, calculado por SDS-PAGE convencional.¹¹ Sin embargo, los sobrenadantes de los híbridos 7B9 y 3F4 que habían reaccionado bien en ELISA, fueron negativos en el Western blot (Fig. 1, carriles 8 y 27), lo que pudiera deberse a que los anticuerpos secretados por estos hibridomas solo reconocen epitopes conformacionales de la PMC o a que los que reconocen, no se encuentran en la PMC que conforma el fago. Teniendo en cuenta estos resultados, el híbrido 7B9 y dos más (6E2 y 2H1), que habían sido positivos por ELISA y Western blot (Fig. 1, carriles 2 y 3) y que también presentaron buenas características de crecimiento, fueron seleccionados para ser clonados por dilución limitante y estabilizados. Estos tres hibridomas y sus AcMs correspondientes se denominaron 7B9F3, 6E2E9 y 2H1G6. Dada la diferente reactividad del híbrido 7B9 en ELISA y Western blot, los tres hibridomas clonados fueron analizados entonces para determinar su reactividad contra las partículas purificadas del fago por la técnica de Dot blot y los tres resultaron positivos (Tabla 1). Así también, los tres AcMs fueron analizados por ELISA y Western blot (Tabla 1 y Fig. 2, panel B) y solo el AcM 7B9F3 no reconoció la PMC de VGJΦ en Western blot (Fig. 2, panel B, carril 3),

Tabla 1. Caracterización de la especificidad de los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas resultantes.

| No. | Clón | ELISA ¹ D.O. _{492 nm} | Western blot ² | Dot Blot ³ | Clase-subclase | Características de reconocimiento |
|-----|-------|--|------------------------------|--------------------------|----------------|--------------------------------------|
| 1 | 2H1G6 | 0,741 | +++ | ++ | IgA | Epitope lineal |
| 2 | 7B9F3 | 1,645 | - | ++ | IgG2a | Epitope conformacional |
| 3 | 6E2E9 | 0,812 | +++ | +++ | IgG1 | Epitope lineal |

¹ Se emplearon placas recubiertas con 100 µL/pozo de PMC a una concentración 10 µg/mL.² Se aplicaron 10⁹ partículas del fago VGJΦ purificadas en todas las electroforesis y 10¹⁰ en todas las tiras de reacción³. A mayor cantidad de signos +, mayor intensidad de reacción.

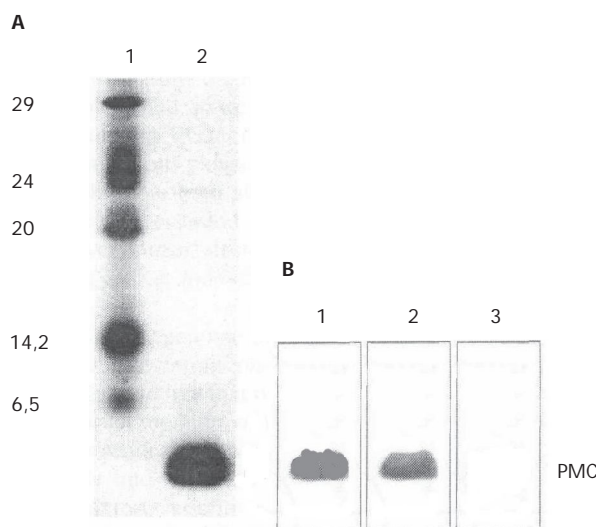


Fig. 2. Electroforesis y Western blot para evaluar la actividad específica de los AcMs obtenidos. A) Electroforesis en SDS-PAGE de 10^9 partículas del fago VGJΦ purificadas. Carril 1, marcadores de peso molecular (SIGMA), los números a la izquierda representa la masa molecular en kDa; Carril 2, partículas de fago purificadas. B) Análisis por Western blot de los AcMs seleccionados con 10^9 partículas del fago VGJΦ purificadas. Carril 1, AcM 6E2E9; Carril 2, 2H1G6 y Carril 3, 7B9F3.

aunque sí mantuvo su actividad específica cuando se evaluó mediante ELISA y Dot blot (Tabla 1). Este resultado es coherente con lo obtenido para el clon madre 7B9 y hace pensar que este AcM reconoce un epítipo conformacional de la PMC, el cual bajo las condiciones de la corrida electroforética se destruye y por ello, el AcM no puede reconocerlo (Fig. 2, panel B, carril 3). Sin embargo, el 7B9F3 sí reconoce las partículas de fago en el Dot blot (Tabla 1), ya que en este caso, el epítipo no se destruye. Teniendo en cuenta que las funciones de los diferentes epítopos de esta proteína aún no se conocen, contar con AcMs que reaccionen con varios de ellos será una magnífica herramienta para el estudio de las funciones de esta proteína mayoritaria del fago VGJΦ de *V. cholerae*. Sin embargo, para la completa caracterización de estos AcMs, se tendrá que profundizar en el estudio de la especificidad de epítopos y la determinación de la constante de afinidad de cada uno de ellos, para lo cual será necesario diseñar nuevos experimentos.

Por otra parte, los hibridomas obtenidos secretaron AcMs de varios isotipos (Tabla 1), incluido el IgA, que pudiera ser de mucha utilidad cuando se realicen estudios de infección *in vivo* con VGJΦ, ya que esta inmunoglobulina es la mayoritaria en las mucosas. Los AcMs 7B9F3 y 6E2E9 se purificaron de fluido ascítico y la concentración aproximada de AcM producido por

cada híbrido, estimada del proceso de purificación, fue 6,8 y 4,5 mg/mL, respectivamente.

CONCLUSIONES

Se generaron por primera vez hibridomas productores de AcMs que reconocen la proteína mayoritaria de la cápsida del fago VGJΦ de *Vibrio cholerae*.

Los AcMs generados pueden ser utilizados como herramienta fundamental en la caracterización de las funciones de la PMC del fago VGJΦ.

BIBLIOGRAFIA

1. Köler G. and Milstein C. Continuous cultures of fuses cell secreting antibodies of predefined specificity. **Nature**, **256**, 495-501, 1975.
2. Gavilondo J.V. Anticuerpos policlonales y monoclonales. Anticuerpos Monoclonales. J.V. Gavilondo (ed.), Elfos Científicas, La Habana, 25-38, 1995.
3. Miller J.F., Mekalanos J.J. and Falkow S. Coordinate regulation and sensory transduction and the control of bacterial virulence. **Science**, **243**, 916-921, 1989.
4. Albert M.J. *Vibrio cholerae* O139 Bengal. **J. Clin. Microbiol.**, **32**, 23-28, 1994.
5. Kaper J.B., Morris J.G. and Levin M.M. *Cholera*. **Clin. Microbiol. Rev.**, **8**, 48-56, 1995.
6. Honma Y., Ikema M., Toma C., Ehara M. and Iwanaga M. Molecular analysis of a filamentous phage (fs1) of *Vibrio cholerae* O139. **Biochim. Biophys. Acta**, **1362**, 109-112, 1997.
7. Ikema M. and Honma Y. A novel filamentous phage, fs2, of *Vibrio cholerae* O139. **Microbiology**, **144**, 1901-1909, 1998.
8. Jouravleva E.A., McDonald G.A., Garon C.F., Finkelstein M.B. and Finkelstein R.A. Characterization and possible function of a new filamentous bacteriophage from *Vibrio cholerae*. **Microbiology**, **144**, 315-319, 1998.
9. Kar S., Ghosh R.K., Ghosh A.N. and Ghosh A. Integration of the DNA of a novel filamentous bacteriophage VSK from *Vibrio cholerae* O139 into the host chromosomal DNA. **FEMS Microbiol. Lett.**, **145**, 17-22, 1996.
10. Waldor M.K. and Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous bacteriophage encoding cholera toxin. **Science**, **272**, 1910-1917, 1996.
11. Campos J., Martínez E., Susarte E., Rodríguez B.L., Marrero K., Silva Y., Ledón T., Del Sol R. and Fando R. VGJΦ, a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae*, integrates into the same chromosomal site as CTXΦ. **J. Bacteriol.**, **185**, 5685-5692, 2003.
12. Campbell A.M. Fusion Procedures, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Monoclonal Antibody Technology. Burdon R.H., and Knippenberg P.H. (Eds.) Elsevier, Amsterdam, New York and Oxford, 120-134, 1984.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. **Nature**, **227**, 680-686, 1970.
14. Towbin H., Staehlin T. and Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **76**, 4350-4355, 1979.
15. Tu Y.Y., James P.F. and Goldenberg D.M. Temperature affect binding of murine monoclonal IgG antibodies to protein A. **J. Immunol. Meth.**, **109**, 43-49, 1998.