

Identificación y sobreexpresión de tres genes *hsp70* de *Spodoptera frugiperda* para evaluar su impacto sobre la productividad del sistema de expresión baculovirus-células de insecto

Enrique Paz Cortés, Laura A. Palomares

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, CP 62210, epaz@ibt.unam.mx, laura@ibt.unam.mx

Palabras clave: Baculovirus, *hsp70*, estrés.

Introducción. El sistema de expresión heteróloga que emplea baculovirus (BV) como vector de expresión en células de insecto (CI), es ampliamente usado para producir proteínas recombinantes o complejos proteicos, vacunas recombinantes para humanos o de uso veterinario, como vector de terapia génica y hasta en control de plagas en agricultura, etc. Dada su relevancia biotecnológica, buscamos condiciones y factores del hospedero que puedan mejorar la productividad de este sistema. En particular estudiamos condiciones de estrés para la célula que se han asociado con un incremento de la progenie viral (1,2); sin embargo, no se conoce qué factores en particular pueden estar causando esta mejora.

Lo que se conoce hasta ahora es que la respuesta al estrés de las CI es importante para la infección con BV y que inhibirla tiene un efecto negativo en la infección, especialmente si se hace en tiempos tempranos (3). Se ha reportado que los genes *hsp70* tienen la mayor sobre expresión durante la infección con este virus (2,4), y recientemente se ha relacionado la presencia de proteína Hsp70 con la estabilidad de complejos de replicación y transcripción del BV (5).

Con este contexto decidimos estudiar si sobre expresar genes *hsp70* de *S.frugiperda* en tiempos tempranos de la infección podría alterar la dinámica del ciclo viral y generar un aumento en la producción de nuevas partículas virales o de la proteína recombinante de interés.

Metodología. Se usó la línea Sf9 de células de insecto y un BV generado para monitorear por fluorescencia la expresión en la fase tardía del ciclo de infección con RFP bajo el promotor *vp39* y la fase muy tardía con EGFP bajo promotor de poliedrina (BV_RFP/EGFP) (6). Los tres genes de *hsp70* fueron obtenidos de mRNA con sondas a partir de secuencias de transcriptomas y ESTs. Estos genes se clonaron en el mismo BV_RFP/EGFP, bajo el promotor temprano del gen *me53* de BV. Hasta ahora los rendimientos de progenie viral y proteína recombinante (EGFP y RFP) se han evaluado por titulación por punto final y por medición de fluorescencia respectivamente. Se planea evaluar la expresión de cada *hsp70* (A, B y C) por RT-PCR cuantitativo y por Western Blot, al igual que para las dos proteínas fluorescentes.

Resultados.

Se logró amplificar y secuenciar tres genes de *hsp70* de *S. frugiperda* que se nombraron *hsp70-A*, B y C respectivamente. Cada uno se clonó bajo un promotor temprano de BV y en el mismo BV control: BV_RFP/EGFP, formando los BV: Bv+hsp70-A, Bv+hsp70-B y Bv+hsp70-C. Para ver el efecto sobre la dinámica y rendimiento de la infección al sobre expresar cada *hsp70*, se infectaron cultivos con cada BV o una combinación de los tres con *hsp70* (Bv+hsp70ABC). Los

resultados en la **Fig. 1-A y 1-B** muestran que hay un aumento en la producción de los reporteros de fase tardía y muy tardía (RFP y EGFP) respecto al control y que varía de acuerdo a la *hsp70* que se está sobre expresando. En la **Fig. 1-C**, se observa que la cantidad de virus producidos en cada condición también aumenta cuando se sobre expresa alguna *hsp70*, aunque esta diferencia es estadísticamente significativa sólo en los tiempos de 24 y 36 horas post infección.

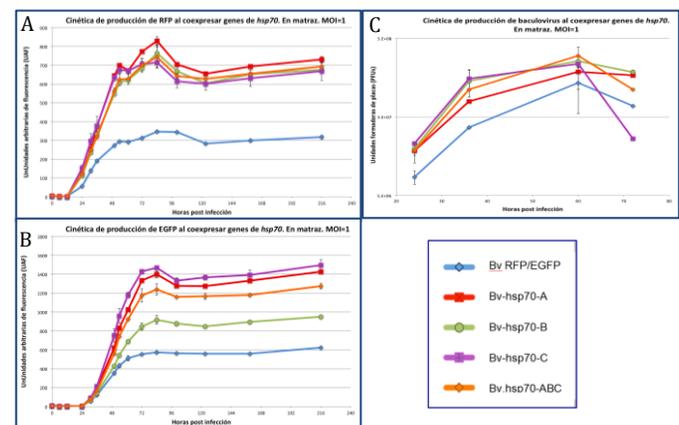


Fig. 1. La sobre expresión de genes *hsp70* aumenta la producción de los reporteros de la fase tardía y muy tardía además de aumentar la producción viral en tiempos tempranos post infección. A y B) Monitoreo de producción de RFP y EGFP. C) Título viral obtenido de cada cultivo a diferentes tiempos post infección.

Conclusiones. 1) Se generó un nuevo promotor para expresión temprana dentro del sistema BV-CI. 2) Se obtuvo la secuencia de tres genes *hsp70* de *S. frugiperda* no anotados previamente. 3) Se evaluó el efecto de sobre expresar las *hsp70-A*, B o C, de manera temprana durante una infección por BV. 4) Se encontró que cada *hsp70* tiene un efecto distinto al sobre expresarla y 5) todas causan un aumento en la producción de progenie viral y proteína recombinante.

Agradecimientos. Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM, a la M. en C. Ruth Pastor y al grupo GPR del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT IT-200418.

Bibliografía.

- Palomares LA, González M, Ramírez OT. (2000) Enzyme Microb Technol. 26(5-6):324-331
- Lyupina YV *et al.* (2010) Virology. 406(2):336-41
- Lyupina YV *et al.* (2014) Virus Res. 4:192:1-5
- Salem TZ *et al.* (2011) Virology. 412(1):167-78.
- Tung H *et al.* (2016) PLoS One. 11(2):e0148578
- Hidalgo D. *et al.* (2017). J Biotechnol. 259:56-62