

# ANÁLISIS DEL GENOMA COMPLETO DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA OBTENIDO A PARTIR DE UN LINFOSARCOMA

Sabrina Carla Fischer Alpuin

Licenciatura en Ciencias Biológicas,  
Orientación Biología Molecular

## **Tesis de Grado**

Unidad de Biofísica de Proteínas  
Institut Pasteur de Montevideo

Laboratorio de Virología Molecular  
Centro de Investigaciones Nucleares  
Facultad de Ciencias  
UdelAR

Orientador: Dr. Gonzalo Moratorio

Co-orientador: Dr. Otto Pritsch

## AGRADECIMIENTOS

Le quiero agradecer a mis padres, mis hermanos, mis abuelas, tíos y primos por ser mi principal impulso en cada momento especial de mi carrera, por su gran ayuda y su plena confianza en mí.

También a mis amigas, Agus, Vicky y Majo por estar siempre a mi lado compartiendo cada momento.

A quienes forman parte del Laboratorio de Virología Molecular, a Pilar Moreno, Martín Soñora, Álvaro Fajardo, Victoria Comas, Natalia Echeverría, Ricardo Recarey, y Juan Cristina por sus enseñanzas, su tiempo, su dedicación y buena compañía.

Al equipo de VLB de la Unidad de Biofísica de Proteínas del Instituto Pasteur, a Lorena Tomé, Gonzalo Obal, Gonzalo Rama, Federico Carrión, Sergio Bianchi, y Otto Pritsch, por su total disposición y dedicación.

A Juan Cristina y a Otto Pritsch por abrirme las puertas de sus Laboratorios en los cuales reafirmé mi verdadero interés por la investigación. Les estoy realmente muy agradecida.

A Mabel Berois y Fernando Lopez por aceptar ser los correctores del trabajo.

A quien fue mi orientador desde el comienzo de mi carrera, una persona que confió en mí, en mi interés por aprender, en mis ganas de conocer, y que dedicó gran parte de su tiempo para que mi formación sea lo más completa, a Gonzalo Moratorio. Gracias por darme la oportunidad de ser parte de este grupo tan lindo y por transmitirme tantas enseñanzas.

Y a cada persona que conocí y me brindó su ayuda en la realización de este trabajo.

## INDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1 LEUCOSIS BOVINA ENZOOTICA</b> .....	<b>10</b>
1.1.1 MARCO TEÓRICO DE LA ENFERMEDAD.....	10
1.1.2 FORMAS CLÍNICAS .....	11
1.1.3 TRANSMISIÓN.....	11
1.1.4 EPIDEMIOLOGÍA .....	12
<b>1.2 VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA</b> .....	<b>14</b>
1.2.1 CLASIFICACIÓN .....	14
1.2.2 ESTRUCTURA DEL VIRIÓN .....	16
1.2.3 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA .....	18
1.2.3.1 Determinantes genéticas virales requeridas para la activación y regulación de la expresión génica .....	20
1.2.4 TRANSCRIPCIÓN Y EVENTOS POST-TRANSCRIPCIONALES .....	21
1.2.5 VARIABILIDAD GENÉTICA .....	22
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1 GENERAL</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2 ESPECÍFICOS</b> .....	<b>25</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS</b> .....	<b>26</b>
3.1.1 EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR ANIDADA .....	26

3.1.2 AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DE VLB -----	28
3.1.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA -----	29
3.1.4 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR -----	30
3.1.5 PRECIPITACIÓN DEL ADN -----	31
3.1.6 CLONACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DE BLV -----	31
3.1.6.1 Adenilación de los extremos -----	31
3.1.6.2 Ligación al vector de clonado <i>p-Gem T-Easy</i> -----	31
3.1.6.3 Transformación de E. Coli con los plásmidos recombinantes -----	32
3.1.6.4 Plaqueo -----	32
3.1.6.5 Reconocimiento de células transformantes-recombinantes por $\alpha$ - complementación -----	33
3.1.6.6 Extracción del ADN plasmídico por Lisis Alcalina -----	34
3.1.7 CONFIRMACIÓN DE CLONES POSITIVOS -----	35
3.1.8 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS EFECTIVAMENTE CLONADOS -----	36
<b>3.2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS -----</b>	<b>37</b>
3.2.1 ENSAMBLADO Y ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA -----	37
3.2.2 ALINEAMIENTO DE GENES -----	37

3.2.3 ANÁLISIS DEL MODELO EVOLUTIVO -----	37
3.2.4 CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS -----	38
3.2.5 PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA EN 3D DE LA REGIÓN U3 DEL ARN -----	38
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----</b>	<b>41</b>
4.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN -----	41
4.2. OPTIMIZACIÓN DE LA TECNICA DE AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DE VLB-----	41
4.2.1 Amplificación del genoma completo en cinco fragmentos solapados -----	41
4.2.2. Amplificación del genoma completo en dos fragmentos largos solapados—	42
4.3 AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DE VLB EN CINCO FRAGMENTOS CON LA TÉCNICA OPTIMIZADA -----	45
4.4. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR OBTENIDOS Y EVALUACIÓN DE LOS MISMOS -----	46
4.5. LIGACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y DIGESTIÓN -----	47
4.6 ANÁLISIS BIOINFORMATICO DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL GENOMA DE VLB -----	52
4.6.1. Ensamblado de la secuencia “LS” -----	52
4.6.2 Análisis filogenético de VLB utilizando genomas completos -----	52
4.6.3 Análisis comparativo de la región 5’LTR -----	54

4.6.4 Predicción de la estructura en 3D del ARN en la región U3 del LTR -----	56
4.6.5 Comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas estructurales: Gag; Pol; Pro y Env -----	58
4.6.6 Comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas no estructurales: Tax; Rex; G4 y R3 -----	65
<b>5. CONCLUSIONES -----</b>	<b>69</b>
<b>6. PERSPECTIVAS -----</b>	<b>70</b>
<b>7. REFERENCIAS -----</b>	<b>71</b>

## ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
aLRT	prueba aproximada de la razón de la verosimilitud ( <i>approximate Likelihood Ratio Test</i> )
ARN	Acido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
CRE	elemento de respuesta a AMP-cíclico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>env</i>	gen codificante de la glicoproteína gp 51 de envoltura
FLK	Células de riñon fetal ovino ( <i>Fetal Lamb Kidney cells</i> )
g	Aceleración de la gravedad
gp 30	glicoproteína transmembrana de VLB
gp 51	glicoproteína de superficie de VLB
GRE	Elemento de Respuesta a Glucocorticoides
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humanos
hr	hora/s
HTLV	Virus de la Leucemia de células T de los Humanos
IPTG	Isopropil Tiogalactósido
kb	kilopares de bases
LBE	Leucosis Bovina Enzoótica
LP	Linfocitosis Persistente
LS	Linfosarcoma
LTR	Repetidos Terminales Largos ( <i>Long terminal repeats</i> )
mg	miligramo/s
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
min	minuto/s
ml	mililitro/s

mM	mili Molar
NES	Señal de Exportación Nuclear
ng	nanogramo/s
NLS	Señal de Localización Nuclear
OIE	Organización mundial de sanidad animal ( <i>Office International des Épizooties</i> )
pb	pares de bases
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica ( <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Solución amortiguadora de fosfato ( <i>Phosphate buffered salt</i> )
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
pH	potencial de Hidrógeno
<i>pol</i>	gen de la polimerasa ( <i>polymerase</i> )
<i>prot</i>	Proteasa
RBD	Dominio de unión al Receptor ( <i>Receptor Binding Domain</i> )
rp24	p24 recombinante
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfafo de sodio ( <i>sodium docecil sulfate</i> )
seg	segundo/s
STLV	Virus de la Leucemia de células T de los Simios
SU	glicoproteínas gp 51 de superficie
TA	Temperatura Ambiente
TM	glicoproteínas gp 30 transmembrana
TxRE	Elemento de Respuesta a Tax
U	Unidad/es
μl	microlitro/s
UV	Ultravioleta
V	Voltio/s
VLB	Virus de la Leucosis Bovina ( <i>Bovine Leukemia Virus</i> )



## RESUMEN

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una patología infecciosa producida por un virus denominado Virus de la Leucosis Bovina (VLB). El VLB pertenece a la familia *Retroviridae*, y al género Deltaretrovirus. En la enfermedad pueden distinguirse tres formas clínicas: a) Asintomática, b) Linfocitosis Persistente (LP), caracterizada por una expansión policlonal no maligna de células B CD5+ y c) Linfosarcoma, caracterizada por la formación de tumores. Es ampliamente aceptado que la mayoría de los cánceres resultan de múltiples eventos celulares que se vuelven malignos luego de un prolongado período de latencia clínica, así como del rol crítico que juega el sistema inmune en el control de la progresión de esta enfermedad. Hasta el momento han sido reportadas solamente 5 secuencias genómicas completas de cepas de VLB, las cuales fueron aisladas de células mononucleares de sangre periférica de bovinos y otros orígenes no tumorales. Con el fin de contribuir a la comprensión de los mecanismos de leucemogénesis que induce VLB en el ganado, es necesario contar con secuencias de genomas completos de estirpes aisladas directamente de linfosarcomas.

En este estudio, se realizó el análisis detallado de un genoma completo de VLB aislado directamente del linfosarcoma de una vaca infectada. Se encontró una sustitución nucleotídica en el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) localizado en la región 5'LTR. También fueron detectadas sustituciones de aminoácidos en las proteínas de nucleocápside, gp51 y G4. Estas mutaciones o sustituciones de aminoácidos, podrían estar favoreciendo la supresión de la expresión viral en las células B infectadas, como una estrategia para evadir una respuesta inmune efectiva.

Dada a la mutación encontrada en el sitio GRE, se realizó la predicción de la estructura del ARN en la región U3 del 5'LTR de la secuencia obtenida del linfosarcoma, y se comparó con la estructura que formaría esta región en las secuencias provenientes de otros orígenes. Resultados en este estudio son coherentes con la hipótesis de la supresión de la expresión viral.

Asimismo, fueron realizados análisis filogenéticos utilizando genomas completos que revelaron una marcada diversificación genética entre VLB y los demás miembros del género Deltaretrovirus. Se observó también una estrecha relación genética entre virus HTLV y STLV, y una relación más distante con el clado de VLB.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 LEUCOSIS BOVINA ENZOOTICA

### 1.1.1 MARCO TEÓRICO DE LA ENFERMEDAD

La definición primaria de “leucosis” se refiere a una proliferación maligna del tejido linfoide o productor de linfocitos (Gatti, 2007). El primer caso reportado de leucosis bovina fue en el año 1871, por Leisering, quién detectó la presencia de nódulos amarillos en el bazo inflamado de una vaca (Gillet *et al.*, 2007).

Hoy en día la enfermedad es conocida como Leucosis Bovina Enzoótica (LBE), y su agente etiológico es un virus denominado Virus de la Leucosis Bovina (VLB). Este virus pertenece a la familia *Retroviridae* y al género Deltaretrovirus. El VLB infecta principalmente los linfocitos B, y en condiciones naturales se encuentra como ADN proviral integrado al genoma de los linfocitos infectados.

La infección por VLB se caracteriza por manifestar un largo período de latencia viral y por la ausencia de viremia. Es probable que el período de latencia sea una estrategia viral para escapar a la respuesta inmune del hospedero, y de esta forma dar lugar, eventualmente, al desarrollo de un proceso oncogénico (Pierard *et al.*, 2010). Cuando las células infectadas son aisladas y cultivadas *in vitro* ocurre un drástico incremento en la transcripción viral, lo que sugiere que el provirus se encuentra de alguna forma reprimido *in vivo* (Powers y Radke, 1992). Esta estrategia también se observa en otros miembros de la familia *Retroviridae*, como en el virus linfotrópico de células T de humanos tipo 1 (HTLV-1) que le permite una protección efectiva contra el reconocimiento por el sistema inmune del hospedero (Merezak *et al.*, 2001). En condiciones naturales VLB infecta exclusivamente al bovino,

pero en forma experimental infecta e induce leucosis también en ovinos (Johnson *et al.*, 1994). Es importante destacar que al día de hoy no existe una vacuna efectiva contra el VLB.

### 1.1.2 FORMAS CLÍNICAS

En la mayoría de los animales infectados (60%), nunca se observan signos de la enfermedad y se convierten en portadores asintomáticos del virus, a este estado de la enfermedad se lo denomina AL, por aleucémicos. Extrañamente, un tercio del ganado infectado presenta linfocitosis persistente (PL) caracterizada por una expansión policlonal no maligna de células B CD5+. Finalmente, solo entre un 5 y 10% de los bovinos infectados desarrollan la forma clínica linfosarcoma (LS) caracterizada por la formación de tumores que determinan el refugio, sacrificio o la muerte de los animales afectados. Es importante destacar que para el ingreso a esta etapa clínica no es necesario presentar previamente una etapa de linfocitosis persistente (Llames *et al.*, 2001; Kettmann *et al.*, 1994; Burny *et al.*, 1988;).

Se cree que tanto factores de la genética del hospedero como de la genética de la estirpe viral infectante están involucrados en la patogenia de la enfermedad (Willems *et al.*, 2000).

### 1.1.3 TRANSMISIÓN

El contagio se da por traspaso de linfocitos infectados con el virus de un bovino enfermo a uno sano. La transmisión puede ser horizontal (de animal a animal) o vertical (de madre a hijo). En las secreciones y fluidos biológicos como leche, sangre, calostro, secreción nasal, saliva, semen y orina se pueden llegar a encontrar linfocitos infectados, transformando a estos fluidos en una fuente de contagio. No obstante la mayor proporción de linfocitos infectados se encuentran en la sangre, por lo tanto cualquier medida de manejo o práctica veterinaria como extracción de sangre, vacunación, tatuaje, etc. que se practican sin tomar las medidas higiénicas correspondientes, son una importante forma de diseminación de la enfermedad (denominada iatrogénica). Los artrópodos hematófagos

como tábanos y mosquitos podrían ser otra vía de transmisión (Gatti, 2007; Gillet *et al.*, 2007). La infección afecta a bovinos en general pero las producciones intensivas como los tambos son las más involucradas.

#### 1.1.4 EPIDEMIOLOGÍA

La LBE presenta una distribución a nivel mundial, y ha sido listada por la Organización Mundial de la Salud Animal como una enfermedad de importancia para el comercio internacional (OIE, 2010). Actualmente, existen programas de erradicación de esta enfermedad en diferentes países, como Australia y algunos estados miembros de la Unión Europea (UE), muchos de los cuales recientemente han logrado erradicar esta patología (Acaite *et al.*, 2007; Nuotio *et al.*, 2003). Sin embargo, en otras partes del mundo, la prevalencia de la LBE ha aumentado y se ha reportado que más del 50% del ganado vacuno lechero se encuentra infectado con el VLB, dando lugar a importantes pérdidas económicas en la producción lechera y en la exportación del ganado (Kobayashi *et al.*, 2010). A fin de evitar la infección con este virus y su contagio se implementaron estrategias tales como el aislamiento de animales infectados, inmunización pasiva a través del calostro, vacunación con proteínas virales o cepas atenuadas. Hasta el momento, ninguno de estos últimos métodos ha logrado la combinación óptima de eficiencia, economía y seguridad (Gillet *et al.*, 2007).

En América del Sur, se han reportado niveles de prevalencia predial que rondan entre un 35 y 45% en Colombia, Venezuela y Chile (Alfonso *et al.*, 1998; Islas *et al.*, 1990; Marín *et al.*, 1978), mientras que en Brasil alcanzó niveles de hasta un 70,4% (Del Fava y Pituco, 2004; Melo, 1992; Abreu *et al.*, 1990). En el año 2001, Trono y colaboradores, realizaron el primer estudio a nivel de todo el territorio Argentino, analizando rodeos de tambos de las principales regiones lecheras de ese país y encontraron una prevalencia general de establecimientos del 84%, mientras que la prevalencia individual resultó ser del

32,85 % de los animales. En Uruguay, si bien estudios epidemiológicos llevados a cabo desde hace dos décadas indican que existía una prevalencia de la enfermedad del 20-25% en los establecimientos afectados, hoy en día es posible encontrar animales positivos en prácticamente el 100% de los establecimientos lecheros. Además de afectar la producción directa en el país por aquellas vacas que manifiestan la enfermedad tumoral, existen investigaciones en donde se ha encontrado que los animales infectados presentan una disminución significativa en la producción lechera (Zaffaroni *et al.*, 2007).

En un estudio realizado en Uruguay sobre 53 establecimientos lecheros del Departamento de Florida, donde se recolectaron en forma aleatoria muestras de sangre de 1060 animales, el análisis serológico permitió proyectar una prevalencia para la LBE en dicho Departamento de 46,62% (Guarino, 2001). Según este trabajo, la prevalencia de LBE aumentó en comparación con muestreos previos lo cual podría relacionarse con la inexistencia de programas de control de la enfermedad y la tendencia de la infección a difundirse más rápidamente. Asimismo, en el año 2003 la seroprevalencia por ELISA en 60 establecimientos de los departamentos de San José, Florida y Colonia fue de 77%, 72% y 57%, respectivamente (Zaffaroni *et al.*, 2007).

## 1.2. VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA

### 1.2.1 CLASIFICACIÓN

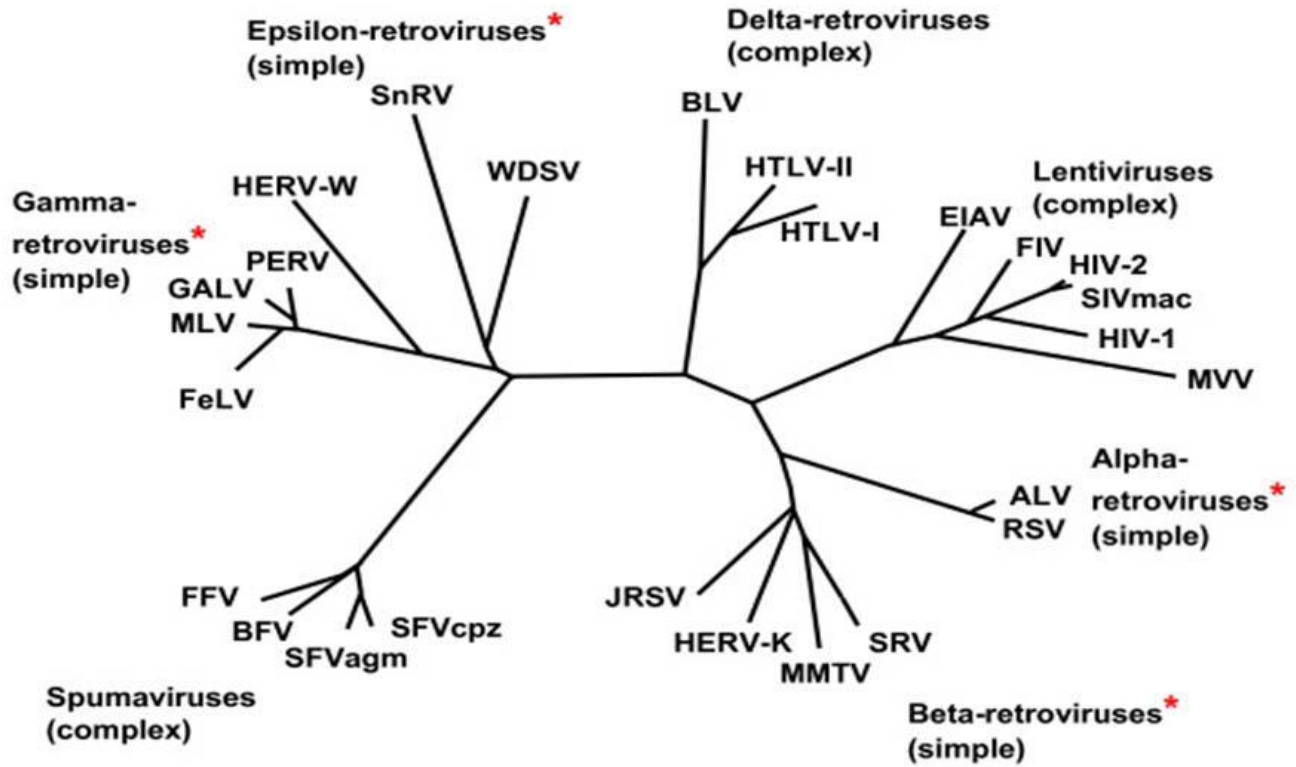
El VLB pertenece a la familia *Retroviridae*, y al género *Deltaretrovirus*, con los cuales comparte dos características particulares:

1) invierten el orden en el que naturalmente fluye la información genética en los sistemas biológicos, ya que son virus de ARN por lo que necesitan de una transcriptasa reversa para convertir este ARN en ADN

2) integran su genoma en el genoma del hospedero. Este proceso se encuentra mediado por una enzima denominada integrasa. La forma integrada de un retrovirus es denominada provirus. Los genes de este provirus son expresados por mecanismos celulares que sintetizan las nuevas partículas virales.

El VLB comparte su organización genómica con los virus linfotrópicos de células T de humanos (HTLV-1 y HTLV-2) y de simios (STLV-1, STLV-2 y STLV-3) (ICTVdB Management, 2006).

Los virus integrantes del género *Deltaretrovirus* son capaces de regular la expresión de sus propios genes, mediante la síntesis de proteínas reguladoras expresadas a partir de su propio genoma. Esta propiedad, conferida por una región genómica ubicada entre el gen *env* y el *LTR 3'*, es compartida por todos los lentivirus que provocan inmunodeficiencia en humanos (VIH), simios (VIS), bovinos (VIB) y felinos (VIF), entre otros; y otros como el Virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE), Virus de la Artritis-Encefalitis Caprina (VAEC) y Virus Visna-Maedi (VISNA); y los espumavirus, como el virus espumoso de los simios (VFS); y les confiere el nombre de “retrovirus complejos” (Figura 1).

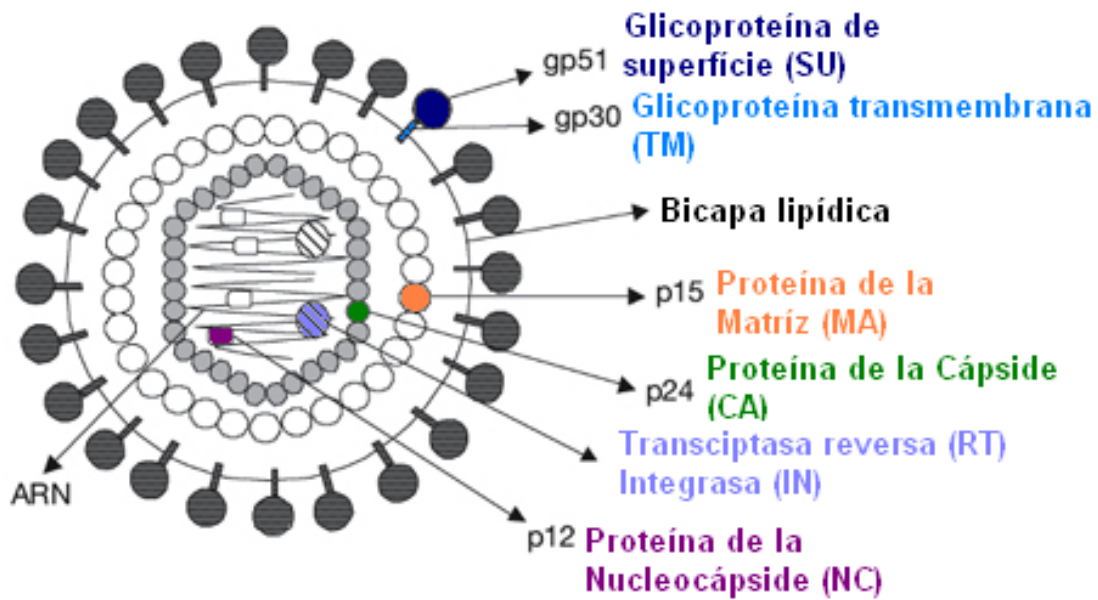


**Figura 1. Árbol filogenético de los diferentes miembros de la familia Retroviridae.** Basado en la secuencia del gen *pol* y realizado mediante el método de “neighbor-joining”. SnRV, retrovirus de serpiente; WDSV, virus del sarcoma de leucomas dérmicos; BLV, Virus de la Leucosis Bovina; EIAV, Virus de la Anemia Infecciosa Equina; RSV, Virus del Sarcoma de Rous; IAP, partícula intracisternal tipo A de ratón; FeLV, Virus de la Leucosis Felina. (Tomado de Field 5th edition a través de Compilation by D. Griffiths, University College, London).

### 1.2.2 ESTRUCTURA DEL VIRIÓN

La partícula viral tiene un diámetro de entre 60 y 125nm. Bajo el microscopio electrónico se observa la partícula viral con un núcleo central electrón denso rodeado por una envoltura celular con proteínas virales (Gillet *et al.*, 2007). El virión presenta en su interior dos copias de un genoma de ARN, simple hebra de polaridad positiva, de 8700 nucleótidos aproximadamente. Las proteínas CA (también denominada p24) forman la cápside que contiene el ARN viral en interacción con proteínas de la nucleocápside NC (también denominada p12). Dos proteínas enzimáticas (RT e IN) requeridas, respectivamente, para la transcripción reversa y la integración del genoma viral, también se ubican empaquetadas dentro de la cápside. La proteína de la matriz MA (p15) interconecta la cápside con la envoltura externa. La envoltura está formada por una bicapa lipídica de origen celular junto con un complejo de proteínas virales insertadas en ella [glicoproteína de superficie SU (también denominada gp51) y glicoproteína transmembrana TM (gp30)] que intervendrán en el reconocimiento, la adsorción y la penetración a su célula blanco (linfocito B). (Gillet *et al.*, 2007) (Figura 2).





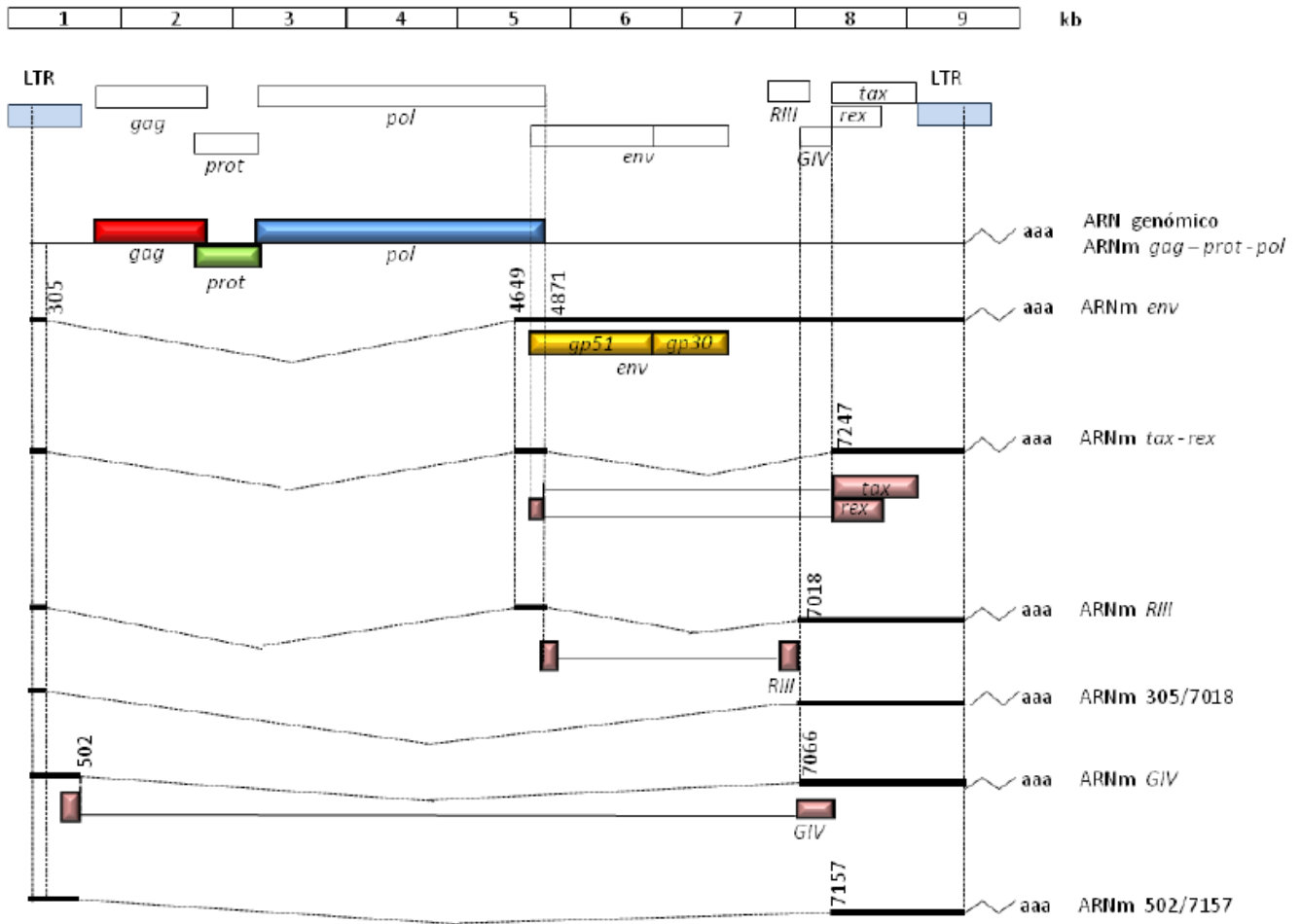
**Figura 2. Esquema representativo de la partícula retroviral de VLB.** En la figura se esquematizan las proteínas que conforman la estructura del virión de VLB. Cada proteína representativa y su nombre correspondiente se indican con el mismo color (Adaptado de *Retrovirology* 2007, 4:18).

### 1.2.3 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

El genoma viral está formado por dos moléculas de ácido ribonucleico de aproximadamente 9kb, flanqueadas por regiones R de los repetidos largos terminales (LTRs). Presentan un Cap en el extremo 5', y una cola poliA en el límite R del extremo 3' (Gillet *et al.*, 2007).

Durante la infección retroviral, su genoma de ARN es retro-transcripto a ADN complementario doble hebra, el cual una vez en el núcleo de la célula infectada, se integra en forma persistente al genoma celular organizándose entonces como cromatina, al igual que todos los genes celulares. En este momento se pasa a denominar "provirus" (Colin *et al.*, 2011).

El provirus se encuentra flanqueado por dos secuencias idénticas de LTRs (estructura conformada por tres regiones denominadas U3-R-U5) y contienen los marcos de lectura abiertos (sigla en inglés ORFs) correspondientes a *gag*, *prot*, *pol* y *env*. El gen *gag* codifica para proteínas estructurales internas del virión [MA (p15), CA (p24) y NC (p12)]; *pro* codifica para la proteasa viral (p14); *pol* da lugar a la transcriptasa reversa RT con un dominio integrasa IN; y *env* codifica para las glicoproteínas de la envoltura del virión [SU (gp51) y TM (gp30)]. Otros ORFs dan lugar a los factores de regulación Tax, Rex, RIII y GIV. Éstas son proteínas que se codifican en la denominada *región X* del genoma del VLB y que presentan una importante función en la regulación de la transcripción del genoma viral (Gillet *et al.*, 2007) (Figura 3).



**Figura 3. Representación esquemática del genoma proviral de VLB, con los marcos de lectura y mapa transcripcional.** El genoma proviral completo, incluyendo los dos LTRs es de 8714 pares de bases, según la secuencia de Genbank K02120, reportada por Sagata *et al.* (1985b). Los sitios de splicing para los diferentes transcritos se indican según la posición inicial. (Adaptado de *J. Virology*, 1993 67:1, 39-52).

1.2.3.1 Determinantes genéticas virales requeridas para la activación y regulación de la expresión génica:

#### Repetidos terminales largos (LTRs)

El LTR en 5' contiene los promotores necesarios para la regulación del inicio de la transcripción e interactúa con los factores específicos tanto celulares como virales. Sus principales elementos reguladores son tres copias de una secuencia potenciadora, no estrictamente conservada, de 21 pb denominadas elementos de respuesta a Tax (TxRE). Los TxREs son esenciales para la respuesta del promotor a la proteína viral transactivadora Tax (Derse *et al.*, 1987). El LTR en posición 3' contiene las secuencias necesarias para la poliadenilación de los mensajeros virales (Colin *et al.*, 2011; Llamas *et al.*, 2001; Kettmann *et al.*, 1994).

La accesibilidad de la región 5'LTR a los factores transactivadores determinará la expresión del ADN proviral, y dependerá entonces de mecanismos epigenéticos tales como modificaciones post-traduccionales en las colas de las histonas, y metilaciones del ADN (Brenner *et al.*, 2006).

#### Región X

Además de los genes estructurales *gag*, *pol*, y *env* requeridos para la síntesis de la partícula viral, transcripción reversa, e integración en todos los retrovirus, el genoma del VLB contiene la denominada región X (también denominada pXBL) ubicada entre el gen *env* y el 3' LTR, que contiene los genes reguladores transactivadores. Esta región codifica para cuatro proteínas: Tax, Rex, RIII y GIV. Rex es una fosfoproteína nuclear de regulación post-transcripcional, estabilizando y permitiendo la exportación hacia el citoplasma de los ARNs genómicos y de los ARNs mensajeros que codifican para las proteínas estructurales. RIII estaría implicada, al igual que Rex, en la regulación post-transcripcional de la expresión viral. Por otro lado, GIV está localizada en el núcleo y la mitocondria;

se cree que está implicada en la transformación celular. R3 y G4 no son indispensables para la infectividad in vivo pero la integridad de estos genes es esencial para la propagación eficiente de la infección dentro del hospedero (Gillet *et al.*, 2007). Se ha visto que la delección de los ORFs para G3 y G4, por más de que permite la infección celular, conduce a una drástica reducción de la propagación viral (Willems *et al.*, 1994). Finalmente Tax, una proteína localizada principalmente en el núcleo, es un activador transcripcional viral que aumenta la unión de factores de transcripción al ADN, promoviendo la síntesis de proteínas virales. Esta proteína presenta también un potencial oncogénico, actuando en cooperación con la oncoproteína Ha-ras en la transformación completa de fibroblastos embrionarios primarios de rata (Willems *et al.*, 1990). Cabe destacar que Tax no se une directamente al TxRE presente en el 5'LTR, sino que previamente a su unión interactúa con proteínas celulares como ser los factores de transcripción CREB, ATF-1 y ATF-2 (Adam *et al.*, 1996).

#### 1.2.4 TRANSCRIPCIÓN Y EVENTOS POST-TRANSCRIPCIONALES

Durante la replicación y expresión de proteínas del VLB intervienen tres ARN mensajeros (ARNm), los cuales son generados mediante el mecanismo de splicing post-transcripcional. De esta forma a partir de un transcrito primario de 8.5kb se expresan las proteínas de los genes *gag* y *pol*, y también se produce la progenie viral (ARN genómico) (Haas *et al.*, 1992) (Figura 3).

El transcrito primario sufre fenómenos de splicing simple y doble; y madura en dos ARNm subgenómicos, de 4.2 kb y 2.1kb, que son utilizados para la expresión del gen *env* y de los genes reguladores *tax* y *rex*, respectivamente (Alexandersen *et al.*, 1993).

Se han identificado in vitro, otros 6 ARNm subgenómicos alternativos. Se ha comprobado la expresión a partir de dos marcos de lectura, llamados *RIII* y *GIV*, que codifican para proteínas de regulación cuyo rol no ha sido aún bien establecido (Rovnak y Casey, 1999; Alexandersen *et al.*, 1993) (Figura 3).

El producto de expresión del gen *rex*, p18Rex, actúa a nivel post-transcripcional, como regulador de la expresión de los diferentes ARN transcriptos, aumentando la transcripción de los genes estructurales (Rovnak y Casey, 1999; Derse, 1988). Como resultado de la regulación positiva sobre los genes estructurales, Rex inhibe indirectamente la expresión de los genes de regulación *tax* y *rex*. La función de Rex es Tax independiente y requiere de una secuencia presente en las regiones U3-R de la LTR 3', a la cual se une directamente (Xiao y Buehring, 1998).

Finalmente, se ha demostrado que la proteína RIII inhibe la función de Rex *in vitro*, induciendo a la sobreproducción de proteínas de regulación y la falta de expresión del genoma viral completo (Willems *et al.*, 1994), y se ha asociado a la linfocitosis persistente con una elevada expresión del gen *GIV* (Alexandersen *et al.*, 1993).

La presencia continua de anticuerpos en los animales infectados indica la existencia de estimulación antigénica constante, lo que sugiere que VLB no persiste en un verdadero estado de latencia, sino que mantiene una frecuencia excepcionalmente baja de expresión, que se encontraría fuertemente regulada (Willems *et al.*, 1995).

#### 1.2.5 VARIABILIDAD GENÉTICA

Los virus de ARN explotan todos los mecanismos conocidos para generar variabilidad genética, los más frecuentes son la mutación y la recombinación. La mutación es un mecanismo clave en la generación de variación genética en los virus cuyo genoma está constituido por ARN, y el mismo se debe mayoritariamente a la carencia de actividad de corrección de errores de las ARN polimerasas, lo que determina una frecuencia de error del orden de  $10^{-4}$  sustituciones por nucleótido en cada ciclo replicativo. Ésta, es responsable de la generación de gran número de variantes virales en el curso de

una infección (Bartenschlager y Lohmann 2000). Sin embargo, a pesar de que VLB es un virus ARN, el mismo presenta una baja variabilidad genética debida principalmente a su latencia en el genoma del hospedero, y el uso de la mitosis celular como principal vía de replicación de su genoma.

El análisis y estudio de la variabilidad genética de VLB en diferentes zonas geográficas puede ser de gran interés para la medicina veterinaria, ya que involucra aspectos relacionados con la patogenicidad, diagnóstico y eventualmente, el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación y de manejo animal. Uno de los últimos estudios en el campo de la variabilidad genética de las estirpes de VLB circulantes en Uruguay, así como también de su epidemiología molecular y modo de evolución destaca la presencia de siete genotipos circulantes en América del Sur (Moratorio *et al.*, 2010).

Hoy en día, la información existente sobre genomas de VLB es sumamente escasa, de hecho, solamente cinco secuencias completas se encuentran en la base de datos, de las cuales una es proveniente de un cultivo celular persistentemente infectado, otra es obtenida mediante la infección experimental de una oveja (Dube *et al.*, 2009) y solamente 3 son salvajes. Estas son cepas virales de Argentina, Bélgica, Japón y Australia (Dube *et al.*, 2000; Coulston *et al.*, 1990; Rice *et al.*, 1985; Sagata *et al.*, 1985a).

Si bien ha sido demostrada la existencia de variantes genéticas de Tax que determinan algunas diferencias en el comportamiento biológico del VLB (Dube *et al.*, 2009), hasta el momento no se han vinculado variantes naturales en la genética del virus asociadas a las diferentes expresiones clínicas de la enfermedad. Estudios recientes vinculan la heterogeneidad genética de la estirpe de VLB infectante con el proceso de leucemogénesis desarrollado (Inoue *et al.*, 2011). Por otro lado, algunos autores han correlacionado distintos aspectos de la genética bovina con una posible resistencia a la enfermedad (Rodríguez *et al.*, 2011). Es de destacar que para aproximarnos a entender la patogenia

de la enfermedad causada por el VLB, es de fundamental importancia el análisis y estudio exhaustivo de los genomas virales. En este caso, enfocaremos nuestro análisis en aquellas estirpes asociadas al desarrollo de linfoma, intentando responder si existe algún aspecto en la genómica del VLB asociado a la manifestación tumoral propiamente dicha.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GENERAL

El objetivo central de este trabajo es obtener y analizar molecularmente el genoma completo del Virus de la Leucosis Bovina proveniente de una muestra de linfoma.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Formación y entrenamiento en técnicas de biología molecular y celular para la obtención de la secuencia completa del genoma del VLB.
- Estudio de la variabilidad genética de la estirpe secuenciada mediante un análisis bioinformático empleando diferentes abordajes evolutivos.
- Identificación de mutaciones características con el fin de contribuir a responder cuánto puede influir la genética viral en la manifestación clínica tumoral de la enfermedad.
- Modelización de la estructura en 3D de aquellos sitios reguladores del genoma del virus donde se hayan identificado mutaciones características que puedan estar implicadas en el desarrollo de la manifestación tumoral.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

El diagnóstico de animales con linfosarcoma fue realizado por veterinarios especializados, Una vez refugados se procedió a la necropsia correspondiente de modo de obtener las muestras de tumor solido. La misma perteneció a una vaca de un establecimiento lechero y fue cedida para la realización de este trabajo. A partir de ésta, se realizó la caracterización molecular del genoma proviral.

#### 3.1.1 EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR ANIDADA

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de muestras de tumor solido mediante digestión con proteinasa K y precipitación con NaCl, según protocolo modificado de Miller, Dykes y Polesky (1988). El ADN obtenido fue cuantificado mediante la medida de absorbancia a 280-260nm en un nanodrop.

Posteriormente para confirmar la presencia del VLB, se realizó un ensayo de PCR anidada que amplifica una región altamente conservada del gen *env*, que codifica para la glicoproteína de superficie gp51 de la envoltura viral del VLB. Para el primer round de amplificación se utilizaron los oligonucleotidos: 5`-ATG CCY AAA GAA CGA CGG-3` (sentido) y 5`- CGA CGG GAC TAG GTC TGA CCC - 3` (antisentido). La mezcla de reacción para el PCR fue preparada en un volumen final de 50 µl conteniendo: buffer de reacción 1x (20mM Tris HCl pH 8.4, 50mM KCl); 1,5mM de cloruro de magnesio (Perkin Elmer); 200 µM de dNTP's; 200 nM de cada cebador específico; 0,2 U de la enzima Taq Platinum (Invitrogen) y H<sub>2</sub>O bidestilada y deionizada hasta completar el volumen final de 45µl. A los 45 µl de la mezcla de reacción anterior se le adicionaron 5 µl de ADN (100ng). Las reacciones de

amplificación se realizaron en un termociclador programable (Perkin Elmer Cetus 2400) bajo las siguientes condiciones: 2 min a 95 °C, y 35 ciclos de: 45 seg a 95 °C, 45 seg a 58 °C, 1 min a 72 °C; y una extensión final de 7 min a 72 °C. Mediante esta PCR se obtiene un producto de amplificación correspondiente a un fragmento de 903 pares de bases (pb).

El segundo *round*, realizado a partir de 1 µl del producto de la primera amplificación, se realizó utilizando los oligonucleótidos 5'-CTT TGT GTG CCA AGT CTC CCA GAT ACA-3' (sentido) y 5'-CTG TAA ATG GCT ATC CTA AGA TCT ACT GGC-3' (antisentido). Las condiciones de amplificación fueron: 2 min a 95 °C y 35 ciclos de: 45 seg a 95 °C, 45 min a 57 °C; y una extensión final de 1 min a 72 °C. El tamaño del fragmento amplificado es de 440 pb (Ballagi-Pordani *et al.*, 1992). Se realizó la siguiente reacción en un volumen final de 50 µl conteniendo: 1 µl del producto de amplificación del primer *round*; 1x buffer (20mM Tris HCl pH 8.4, 50mM KCl); 200 nM de cada cebador; 0.2 mM dNTPs; 1.5 mM de Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>) y 0.2 U de Taq polimerasa (Invitrogen, CA, USA).

Para la visualización de los productos de PCR, se realizó la electroforesis en gel de agarosa (2 %) con tinción de bromuro de etidio (EtBr) y marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen, CA, USA). En todos los ensayos se utilizaron un control positivo, un control negativo y un control de calidad del ADN extraído. Como control positivo se utilizó ADN de células FLK (Fetal Lamb Kidney) persistentemente infectadas con VLB (Van der Maaten y Miller, 1975). Como control negativo se utilizó agua destilada filtrada en lugar de ADN genómico. Como control sistémico de la presencia de ADN genómico en las muestras a diagnosticar se amplificó un fragmento de 400 pb perteneciente al gen que codifica para la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Tiscornia *et al.*, 2004).

Todo esto se realizó con fines de proveer y documentar un correcto diagnóstico, el cual es imprescindible de realizar anteriormente a la elección de la muestra a trabajar durante el proyecto.

### 3.1.2 AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DE VLB

Para hacer más exitosa la amplificación del genoma completo de VLB se diseñaron diferentes estrategias de amplificación y clonación del mismo, para lo que se realizó el diseño de oligonucleótidos específicos que permitieran amplificar el genoma completo en fragmentos solapantes (Figura 4 y Tabla 1).

A partir del ADN extraído del linfoma seleccionado, se realizó la amplificación del genoma viral utilizando diferentes estrategias:

a) La primera y más ambiciosa fue la amplificación del genoma completo en dos fragmentos largos solapados utilizando los juegos de oligonucleótidos: 1F-GP51R (que amplifica 5744pb aproximadamente) y GP51F-20R (de 3890pb aprox.) (ver Fig. 4A). Las condiciones de amplificación fueron: 30 seg a 98 °C seguido de 35 ciclos de 10 seg a 98 °C (desnaturalización), 30 seg a 64 °C (hibridación de los oligos) y 3 min a 72 °C (extensión), seguido de una etapa de extensión final de 10 min a 72°C.

b) La segunda estrategia consistió en la amplificación del genoma viral en 5 fragmentos solapados utilizando los juegos de oligonucleótidos: 1F-6R (esperando un tamaño de 1,8kb aproximadamente); 5F-12R (2,5kb aprox.); 11F-GP51R (2,9kb aprox.); GP51F-18R (2,5kb aprox.) y TaxF-20R (1,4kb aprox) (ver Fig.4B). Utilizando un termociclador en gradiente de temperatura, las condiciones de amplificación fueron: 30 seg a 98°C seguido de 30 ciclos de 10 seg a 98°C (desnaturalización), 30 seg a 52°C (para el fragmento 1F-6R) y a 60°C (para los cuatro fragmentos

restantes) (hibridación de los oligos), y 3 min a 72°C (extensión), seguido de una etapa de extensión final de 10 min a 72°C.

Las PCRs se realizaron en un volumen final de 50µl conteniendo: 10 µl de buffer Phusion 5x, 1 µl de dNTPs 10mM (Fermentas®), 1µl de cada juego de los oligonucleótidos anteriormente mencionados en concentraciones de 10µM cada uno, 0,5µl de enzima PHUSION de New England Biolabs 5U/µl, y 1,5µl de la extracción de ADN proveniente de linfoma para asegurarnos de estar incorporando aproximadamente 200ng de ADN por cada reacción. Para completar el volumen final se agregaron 35µl de agua destilada filtrada Milli-Q.

En todos los ensayos, se realizó un control positivo utilizando 1µl de una muestra de ADN proveniente de linfoma de una vaca con Leucosis Bovina cuyo genoma se logró obtener previamente. Como control negativo, se utilizó agua destilada filtrada Milli-Q en lugar de ADN genómico. La amplificación del genoma en cinco fragmentos se realizó por duplicado con el fin de optimizar la técnica aumentando la cantidad de ADN final

### 3.1.3 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los productos del PCR fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 1,2%.

Para la obtención del gel se preparó una solución de agarosa en buffer TAE 1X (40mM Tris- Acetato, 10mM EDTA pH 8) y se calentó hasta que se tornara transparente. Se mezcló con bromuro de etidio (EtBr), un agente intercalante de ADN que bajo luz UV emite fluorescencia permitiendo visualizar las bandas. Se dejó enfriar unos minutos la mezcla anterior, y la preparación se vertió dentro de la camilla del gel previamente montada dentro de la cuba, nivelada de forma correcta. Se dejó gelificar por

aproximadamente 20 minutos para poder retirar los peines que genera los pocillos del gel donde se aplica el producto de PCR y se vierte sobre el gel 100 ml de TAE 1X, como buffer de corrida.

A continuación se sembraron los 50 $\mu$ l de cada producto de PCR con 10 $\mu$ l de buffer de carga 6X compuesto de Azul de bromofenol , Xilen-cianol y Glicerol. Se sembró también, como referente de corrida, un marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen®). La corrida fue realizada durante 30 min a 90 voltios (V) para que el frente de corrida alcance las tres cuartas partes del gel. Los geles fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta y documentados mediante el uso de un procesador de imágenes BDA Digital Compact (Biometra GmbH).

#### 3.1.4 PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados a partir del gel de agarosa, utilizando el kit de purificación de QIAquick Gel Extraction (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante. Durante la purificación se eliminan los dímeros de oligonucleótidos y productos inespecíficos que se hayan generado en la reacción de PCR y que puedan interferir con la secuencia de interés. Los volúmenes de elución de los purificados fueron diferentes dependiendo de la estrategia utilizada: en las PCRs que amplificaron el genoma en dos fragmentos largos, el paso de elución de la purificación fue en un volumen final de 35 $\mu$ l, mientras que los productos de PCR correspondientes a los 5 fragmentos solapados (que fueron realizados en duplicado) fueron eluidos en 60 $\mu$ l. Las purificaciones fueron evaluadas mediante la medida de absorbancia 260-280nm en el nanodrop, así como mediante su comparación con un marcador de Peso Molecular de cantidad en ng/ $\mu$ l conocida en una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

### 3.1.5 PRECIPITACIÓN DEL ADN

A fin de lograr una mayor concentración de los ADN purificados (en el caso de lo que fueron eluidos en 60µl), se realizó la precipitación de los mismo. Con este fin se le incorporó el volumen necesario de H<sub>2</sub>O Milli-Q para llegar a un volumen final de 100µl y posteriormente se le adicionó a cada tubo 4µl de Cloruro de Sodio (NaCl) 5M y 200µl de Etanol (EtOH) al 100% a modo de neutralizar las cargas y deshidratar el ADN respectivamente. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 4°C con máxima velocidad (16000g) durante 15 minutos, lo que permitió observar el pellet blanco correspondiente al ADN en el fondo del tubo. Se descartó el sobrenadante y luego se realizaron 3 lavados con EtOH al 70% frío y posterior centrifugación a 4°C y máxima velocidad durante 10 minutos. Se dejó secar bien el pellet y el mismo se resuspendió en 40µl con H<sub>2</sub>O Milli-Q. Los ADN concentrados fueron cuantificados midiendo su absorbancia por nanodrop.

### 3.1.6 CLONACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DE VLB

#### 3.1.6.1 Adenilación de los extremos

El vector pGem-T-Easy (Promega) que se utilizó para clonar los productos de PCR se encuentra diseñado para ligar secuencias de ADN con adenina en sus extremos 5', como poseen los productos amplificados con polimerasas que poseen actividad transferasa terminal (ejemplo la Taq ADN polimerasa). La ADN polimerasa PHUSION carece de esa actividad. A fin de ligar el producto de PCR, se procedió por lo tanto al agregado de adenina en sus extremos 5'. Esto se realizó incubando a 72°C durante 30 minutos una solución de 10 µl que contenía: 7µl del producto de PCR purificado y precipitado (aproximadamente unos 7 ng/µl ADN), 0,5µl de dATP, 1µl de Taq polimerasa (Invitrogen), 1µl del buffer correspondiente para Taq invitrogen 10X y 0,5µl de MgCl<sub>2</sub>, 50mM.

### 3.1.6.2 Ligación al vector de clonado *p-Gem T-Easy*

La ligación al vector de clonado pGem-T-Easy (Promega) se realizó en una solución de 10  $\mu$ l que contenía: 3  $\mu$ l del producto de la adenilación, 1  $\mu$ l de pGem-T-Easy (50 ng/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l de ADN ligasa T4 (Promega) (3U/ $\mu$ l) en 6 $\mu$ l del buffer de reacción [30 mM Tris-HCl pH 7.8, 5% PEG, 20 mM DTT y 20 mM MgCl<sub>2</sub>]. La concentración molar de inserto en la mezcla de reacción se estimó en 2 nM mientras que la del plásmido pGem-T Easy fue de 2,5 nM. La mezcla se incubó toda la noche a 4°C.

### 3.1.6.3 Transformación de E. Coli con los plásmidos recombinantes

La transformación de la cepa Escherichia Coli (E.Coli) XL1-Blue con pGem-T-Easy recombinante se realizó utilizando el método de shock térmico (Sambrook y Maniatis, 1989). Para la transformación, las células quimiocompetentes (E.Coli) fueron extraídas del freezer a -80°C y colocadas directamente en hielo por 5 minutos. A cada tubo conteniendo aproximadamente 50 $\mu$ l de células se les incorporó 0,5 $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol y 3 $\mu$ l de producto de ligación. Se dejaron los tubos 30 minutos en hielo, y luego se realizó el shock térmico por 45 segundos a 42°C. A cada reacción de transformación se le incorporaron 800 $\mu$ l de medio LB (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl) a temperatura ambiente y se incubaron las células a 37°C por una hora con agitación a 220rpm.

### 3.1.6.4 Plaqueo

Las células XL1 transformadas se sembraron, en condiciones asépticas, en placas de LB-agar [10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl, 15 g/l agar] que contenían ampicilina (100  $\mu$ g/ml), 40  $\mu$ l de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -Dgalactopiranosido) 20 ng/ $\mu$ l y 7  $\mu$ l de IPTG (isopropil  $\beta$ -tiogalactopiranosido) 1M sobre las placas.



Primero se sembraron 150µl de las células transformantes en cada placa. Las células restantes en los tubos se concentraron aún más en su medio de cultivo centrifugando a máxima velocidad por 3 minutos cada tubo, descartando parte del sobrenadante y resuspendiendo el pellet celular en 150ul de LB Una vez culminado el proceso se dejaron las placas en estufa a 37°C durante toda la noche.

#### 3.1.6.5 Reconocimiento de células transformantes-recombinantes por $\alpha$ -complementación

El vector de clonado pGem-T- Easy, de 3015 pares de bases, incluye un pequeño fragmento del gen de la  $\beta$  galactosidasa (gen *lacZ*) de *E. coli* que contiene secuencias reguladoras y codifica para los primeros 146 aminoácidos de la porción amino terminal de la enzima (fragmento  $\alpha$ ). Dentro de esta región se encuentra un sitio de clonado múltiple que mantiene el marco de lectura del fragmento  $\alpha$ . Este vector se utiliza junto con células hospederas que expresan la porción carboxilo terminal de la  $\beta$  galactosidasa (fragmento  $\omega$ ). Ni el fragmento  $\alpha$  que porta el plásmido ni el fragmento  $\omega$ , codificado en el genoma de la bacteria, son activos por separado sino que se asocian para dar lugar a la enzima activa. Este tipo de mecanismo, donde mutantes con deleciones en el segmento proximal del operador del gen *lacZ* son complementados por mutantes negativos para la  $\beta$  galactosidasa que poseen el segmento proximal del operador intacto, es llamado  $\alpha$ -complementación.

Las bacterias transformadas no recombinantes *lac* + resultantes son fácilmente reconocibles porque forman colonias azules en presencia del cromógeno X-Gal. Este último es sustrato de  $\beta$  galactosidasa y genera un producto azul al ser hidrolizado por la enzima. Habitualmente, la inserción de un fragmento en el sitio de clonado del plásmido impide esta  $\alpha$ -complementación al producir un

fragmento  $\alpha$  inactivo. De esta forma, las bacterias transformadas con plásmidos recombinantes forman colonias blancas en presencia de X-gal y así son reconocidas.

La expresión del fragmento  $\omega$  se encuentra regulada por el represor lac el cual puede ser desplazado por una molécula de IPTG. De este modo la presencia de IPTG es necesaria para que se de la  $\alpha$ -complementación (Langley y Zabin, 1976).

En condiciones de esterilidad, las colonias blancas seleccionadas fueron crecidas en tubos conteniendo 4ml de medio LB-ampicilina durante toda la noche a 37°C con agitación a 220 rpm.

#### 3.1.6.6 Extracción del ADN plasmídico por Lisis Alcalina

La extracción del ADN plasmídico de las bacterias transformadas se realizó mediante el método conocido como "Miniprep por Lisis Alcalina". Para ello el cultivo crecido durante toda la noche fue centrifugado a máxima velocidad durante 3 minutos y el sobrenadante fue aspirado. El pellet fue resuspendido primero en 100 $\mu$ l de una solución fría P1 [50 mM Glucosa 25 mM Tris-Cl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)]. A cada tubo se le agregó 200 $\mu$ l de solución fresca P2 [0,2 N NaOH 1% (w/v) SDS] y se dejó reposar en hielo por 5 minutos. Luego se incorporaron 150 $\mu$ l de una solución fría P3 [60ml Acetato de Potasio (5M), 11,5 ml Ácido acético glacial, 28,5 ml H<sub>2</sub>O], se dejó nuevamente 5 minutos en hielo, y se centrifugaron los tubos a 4°C a máxima velocidad por 8 minutos. Se conservó el sobrenadante que presenta el ADN plasmídico y se le incorporó 800 $\mu$ l de EtOH al 100%. Se centrifugó a 4°C máxima velocidad por 5 minutos donde el ADN se precipitó en el pellet. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 $\mu$ l de EtOH 70%. Luego de 5 minutos en hielo se centrifugó a 4°C máxima velocidad por 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar bien el pellet en el tubo. Cada tubo conteniendo el pellet de ADN plasmídico fue resuspendido en una solución

conteniendo 35µl de agua pura Milli-Q y 1µl de la enzima RNasa (10mg/ml). Por último se dejó incubando a 65°C por 10 minutos, temperatura óptima donde es activa la RNasa.

### 3.1.7 CONFIRMACIÓN DE CLONES POSITIVOS

Visualización del inserto por digestión con enzima de restricción

Una forma de confirmar la presencia del inserto es a través del uso de enzimas de restricción que permitan la liberación del mismo. Para ello se seleccionaron las minipreps cuyos vectores contienen el inserto de un tamaño menor a 3kb (tamaño aproximado del vector) siendo 1F-6R (de 1,8kb) y TaxF-20R (de 1,4kb) a modo de poder discriminar las bandas al momento de correr la digestión en un gel de agarosa.

La digestión se realizó en un volumen final de 20µl conteniendo: 4µl del ADN producto de la Miniprep, 0,5µl de enzima de restricción EcoR1 (10U/µl), 2µl de su solución buffer 10X correspondiente y H<sub>2</sub>O pura Milli-Q suficiente para completar el volumen final. El mix de reacción se dejó a 37°C durante 4 hrs.

Previo a la corrida electroforética de los productos de digestión, se realizó un análisis bioinformático utilizando el programa “NEB cutter V2.0”, para conocer si las secuencias clonadas de VLB 1F-6R y TaxF-20R presentan algún sitio de corte interno para la enzima de restricción EcoR1. Para ello, primero se realizó un Blast con los juegos de oligonucleótidos de ambos fragmentos (ver Tabla 1) en una secuencia del genoma completo de VLB seleccionada de la base de datos del *National Center of Biothecnology Information (NCBI)*. Utilizando el programa se determinó el patrón de sitios de cortes internos para diferentes enzimas, entre ellas la de nuestro interés EcoR1. Este análisis es de gran

utilidad porque nos permite conocer el patrón de bandas que se espera obtener luego de la corrida electroforética de las digestiones.

#### Visualización por amplificación por PCR

Para el caso de las minipreps que contienen como inserto fragmentos del genoma de VLB de un tamaño similar al del vector (aprox 3kb), las cuales son: 5F-12R (de 2,5 kb), GP51F-18R (de 2,9 kb) y 11F-GP51R (de 2,5 kb), la confirmación de la presencia del mismo se realizó por PCR. En primer lugar se realizó una dilución 1:10 de cada miniprep de ADN. Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25µl conteniendo: 5µl del buffer 5X para la enzima PHUSION, 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,25µl de Enzima ADN polimerasa PHUSION (5U/µl), 1µl de la dilución 1:10 de la miniprep, 0,5µl de cada oligonucleótido sentido y antisentido correspondiente al fragmento a amplificar y H<sub>2</sub>O pura Milli-Q para completar el volumen de reacción. Las condiciones de amplificación fueron: 30 seg a 98 °C seguido de 25 ciclos de: 10 seg a 98 °C (desnaturalización), 30 seg a 58°C (hibridación de los oligos) y 3 min a 72 °C (extensión); seguido de una etapa de extensión final de 10 min a 72°C.

Los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con EtBr.

#### 3.1.8 SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS EFECTIVAMENTE CLONADOS

La secuenciación del ADN se realizó con un ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit<sup>®</sup> y un ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (ambos de Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) en el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay. Se utilizaron los mismos oligonucleótidos con los cuales se amplificaron los segmentos del genoma, así como también los oligonucleótidos internos de cada fragmento (ver Fig. 4) y los oligonucleótidos que reconocen el sitio donde se ubica el inserto en el vector: SP6 y T7. El uso de

oligonucleótidos internos permite una secuenciación en ambas direcciones del genoma con el fin de evitar cualquier discrepancia que pueda interferir con la lectura y posteriores análisis de las secuencias obtenidas.

### 3.2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS

#### 3.2.1 ENSAMBLADO Y ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA

Se montó la secuencia del genoma del VLB de la muestra de linfoma alineando los fragmentos obtenidos con los oligonucleótidos de secuenciación, con secuencias de genomas completos de VLB provenientes del *GeneBank* utilizando el programa CLUSTAL W y MUSCLE (Thompson *et al.*, 1994; ).

#### 3.2.2 ALINEAMIENTO DE GENES

Las secuencias obtenidas en este trabajo así como aquellas obtenidas de la Base de Datos para cada uno de los genes estudiados fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL W y MUSCLE (Thompson *et al.* 1994).

#### 3.2.3 ANÁLISIS DEL MODELO EVOLUTIVO

Se utilizó el programa Model Generator (Keane *et al.*, 2006) a fin de determinar el modelo evolutivo que mejor describía nuestro juego de datos el cual utiliza el criterio informativo de Akaike (AIC) y el Hierarchical Likelihood Ratio Test. AIC toma en consideración tanto la medida en que el modelo se ajusta a las series observadas como el número de parámetros utilizados en el ajuste, de esta forma busca el modelo que describa adecuadamente las series y tenga el mínimo AIC. En todos los casos el AIC y el Hierarchical Likelihood Ratio Test indicaron que el modelo de sustitución General Time Reversible +  $\Gamma$  (GTR+ $\Gamma$ ) era el modelo que mejor describía nuestros datos de secuencia.

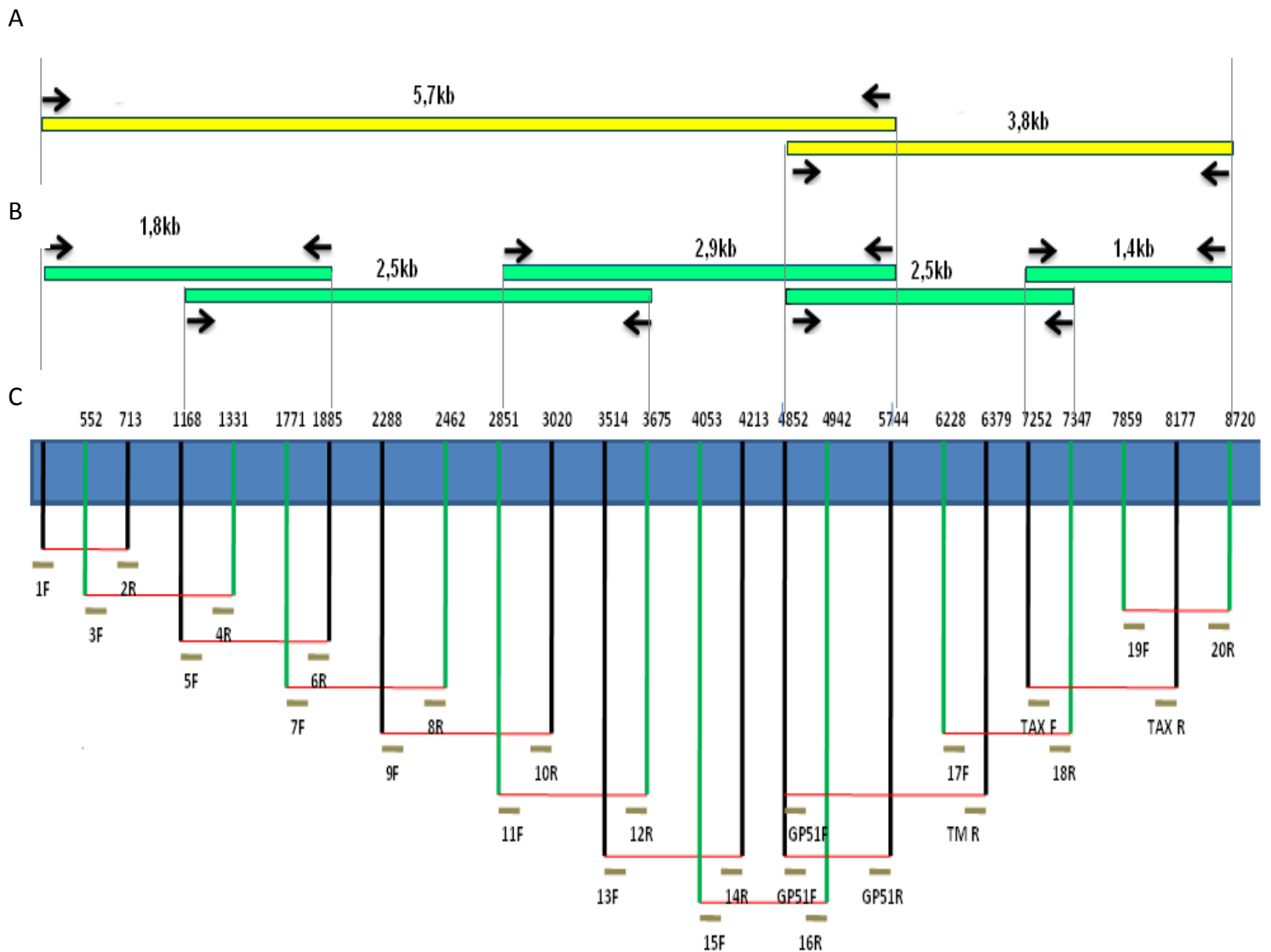
### 3.2.4 CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOLES FILOGENÉTICOS

Utilizando el modelo obtenido mediante la utilización del programa Model Generator, se construyeron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) utilizando el programa PhyML para genomas completos de VLB y de otros miembros del género Deltaretrovirus. (Guidon *et al.*, 2005) (disponible en: <http://www.phylogeny.fr/phylo.cgi/phyml>).

Como medida de la robustez de cada rama de los árboles filogenéticos utilizamos una Prueba de Relación de Probabilidad Aproximada (Approximate Likelihood Ratio Test –aLRT-), que demuestra que la rama estudiada provee una probabilidad significativa contra la hipótesis nula que involucra colapsar esa rama del árbol, pero dejar el resto de la topología del árbol idéntica (Anisimova y Gascuel, 2006).

### 3.2.5 PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA EN 3D DE LA REGIÓN U3 DEL ARN

Se realizó la predicción de la estructura en 3D de la región U3 presente en el 5'LTR del genoma de VLB. La misma fue realizada para la secuencia que se obtuvo de la muestra de linfoma así como también para la secuencia obtenida de la línea celular persistentemente infectada FLK, disponible en la Base de Datos (secuencia EF600696). Se compararon los diseños que utilizan la mínima energía libre para su conformación y se analizó principalmente el sitio de respuesta a glucocorticoides (GRE). Este análisis fue realizado utilizando el servidor del programa “The Vienna RNA websuite” (disponible en: <http://rna.tbi.univie.ac.at>).



**Figura 4. Esquema representativo de los productos de PCR y del diseño de oligonucleótidos internos para obtener el genoma completo del VLB .** A) genoma completo obtenido en dos fragmentos mediante el uso de los pares de oligonucleótidos 1F-GP51R (de 5,7kb) y GP51F-20R (de 3,8kb). B) genoma completo amplificado en cinco fragmentos utilizando los juegos de oligonucleótidos: 1F-6R (tamaño aprox. de 1,8kb), 5F-12R (de 2,5kb), 11F-GP51R (de 2,9kb), GP51F-18R (de 2,5kb) y TaxF-20R (de 1,4kb). C) Diseño de oligonucleótidos internos que permiten la amplificación y secuenciación del genoma completo del VLB.

**Tabla 1.** En la tabla se observa el nombre de los oligos diseñados y utilizados para la amplificación y secuenciación del genoma completo de VLB. "F": Sentido (Foward) y "R": Antisentido (Reverse)

Nombre	Secuencia 5' - 3'
GENO-01F	TGTATGAAAGATCATGCCGAC
GENO-02R	AGCCTTTGCGCGCTTTGVVGA
GENO-03F	ATTGATCACCCCGGAACCTA
GENO-04R	GGAGATTTTTCCAGGCCTGAAGCC
GENO-05F	ATGACCAGCCTAACGGCAGCA
GENO-06R	CTAATTCGGTCCCACTAAGAG
GENO-07F	TTCCATTGGAAACGAGACTG
GENO-08R	ATTTGGTTTCCGTACCGGGAA
GENO-09F	CGAGCCACATTGGATTAGAAC
GENO-10R	AATTGGGGATGAGATCTGCAA
GENO-11F	GGTCACAATGTTATCAAGCCC
GENO-12R	AATATGCTCCTCGTCCTGTAG
GENO-13F	AATTGTGGCCCCAGATTTCT
GENO-14R	TGGGTTATATCGGCCTGCCAA
GENO-15F	TTGTCTCGATGGCCGAACCCA
GENO-16R	GGAGCATCTCCAAGTCTGGAT
GENO-17F	AGCTCCTCCGGCAGGCTCCC
GENO-18R	GGCACCAGGCATCGATGGTG
GENO-19F	ATTCTACCCCTAGGCGAGCC
GENO-20R	CTCTCCTGGCCGCTAGAGGGC
GP51F	ATGCCYAAAGAACGACGG
GP51R	CGACGGGACTAGGTCTGACCC
Tax F	CAAGTGTGTTGTTGGGGGCC
Tax R	CCAAGCTTCAAAAAGGCGGGAGAGC
TMR	TCAAGGGCAGGGTCGGAAGG



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

El ADN de la muestra de linfoma de una vaca infectada con el Virus de la Leucosis Bovina fue extraído mediante la técnica de digestión con proteinasa K, y la calidad y cantidad del mismo fueron evaluados, como mencionamos anteriormente mediante la medida de absorbancia a 260- 280nm. La concentración del ADN obtenida, fue de 361,6ng/μl. A partir de este valor decidimos incorporar en las reacciones de PCR 1,5μl de ADN, de manera de incorporar aproximadamente 200ng de ADN por reacción.

### 4.2. OPTIMIZACIÓN DE LA TECNICA DE AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DE VLB

#### 4.2.1 Amplificación del genoma completo en cinco fragmentos solapados

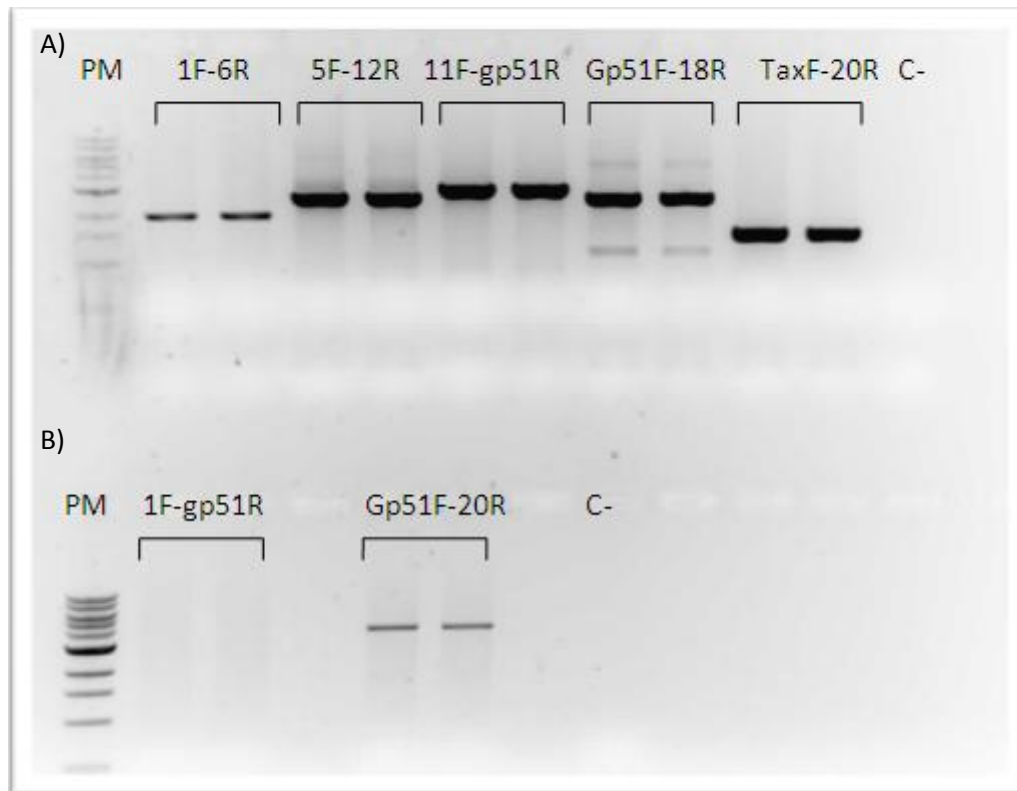
Como se mencionó anteriormente una de las estrategias implementadas a fin de amplificar el genoma completo de VLB consistió en la amplificación del mismo en 5 segmentos solapados (Ver Figura 4). Mediante este procedimiento se obtuvo una muy buena amplificación en cuatro de los cinco fragmentos que amplifican el genoma completo de VLB. Estos fueron: 5F-12R (de 2,5kb aprox), 11F-GP51R (de 2,9kb aprox), Gp51F-18R (de 2,5kb aprox) y TaxF-20R (de 1,4 kb). El primer segmento, 1F-6R (de 1,8kb aprox) amplificó correctamente pero en menor intensidad (Figura 5A). Con motivo de optimizar la obtención del fragmento 1F-6R, se realizó una PCR que fue sometida a diferentes condiciones de temperatura de hibridación de los oligonucleótidos. Para ello se utilizó un termociclador en gradiente de temperatura. Se colocaron a 50°C, 52°C, 53°C, 55°C y 57°C de temperatura de hibridación respectivamente. El control negativo se colocó a la temperatura 50°C.

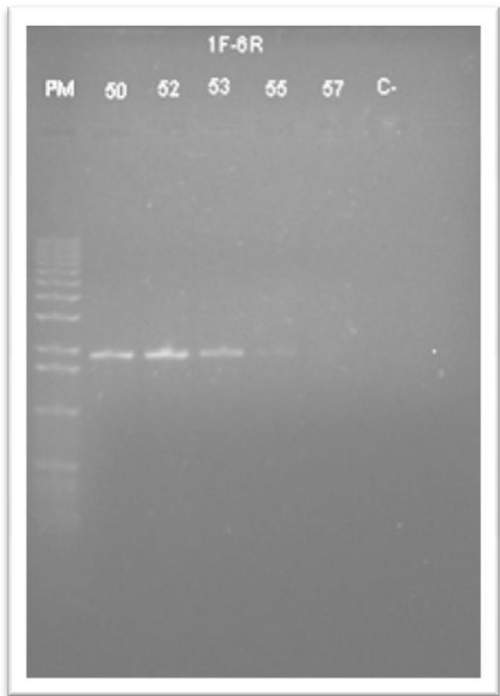
Se obtuvieron bandas del tamaño esperado para el fragmento 1F-6R de aprox. 1,8kb. Fue óptima la amplificación a menores temperaturas de hibridación de los oligonucleótidos (50° y 52°C) (Figura 6).

#### 4.2.2 Amplificación del genoma completo en dos fragmentos largos solapados

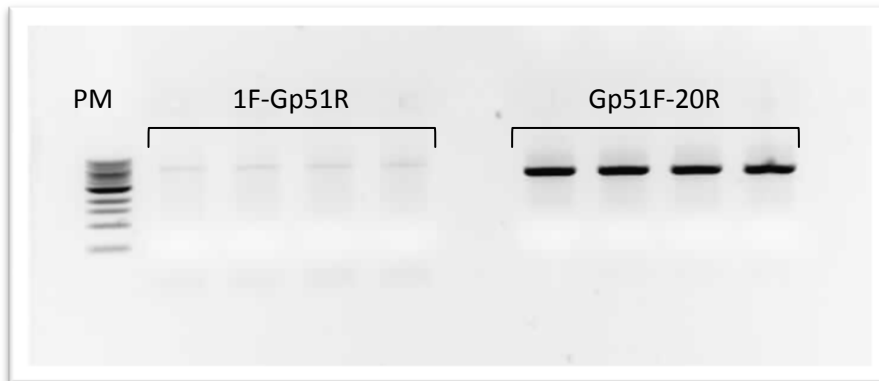
Respecto a la amplificación del genoma completo en dos fragmentos largos, se obtuvo la banda correspondiente al fragmento Gp51F-20R de 3,8kb aproximadamente, mientras que para 1F-Gp51R de 5,7kb no se observó producto de amplificación en el gel (Figura 5B). Dados estos resultados, un nuevo intento fue realizado cambiando los parámetros: temperatura de hibridación de oligonucleótidos y tiempo de elongación. Se bajó la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos de 64°C a 62°C para hacer la reacción menos específica, y se aumentó el tiempo de elongación de 3min a 3:30min. Se obtuvieron mejores resultados bajo estas nuevas condiciones de amplificación (Figura 7). Las bandas correspondientes al fragmento Gp51F-20R (de 3,8kb aprox.) se observan con mayor intensidad en comparación a las obtenidas en su primer intento de amplificación (Figura. 5B). Respecto al fragmento 1F-Gp51R (de aprox. 5,7kb) se obtuvieron bandas muy tenues, apenas visibles. Estos resultados sugieren que bajo estas nuevas condiciones la amplificación se optimizó para el fragmento de 3,8kb, y se mejoró para el de 5,7kb. Se realizaron posteriores intentos para optimizar la obtención del fragmento 1F-Gp51R de 5,7kb. Se probó su amplificación disminuyendo aún más la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos, pasando de 62°C a 58°C pero no se obtuvieron resultados. Asimismo se intentó aumentar la cantidad de ADN en el mix de reacción, incorporando 2µl del mismo (280ng aprox.). Desafortunadamente tampoco se obtuvieron resultados.

En este momento decidimos continuar con el objetivo general del trabajo basándonos en el diseño optimizado de amplificación del genoma completo en cinco fragmentos, a medida que nuevos intentos fueran realizados para la obtención de 1F-Gp51R.





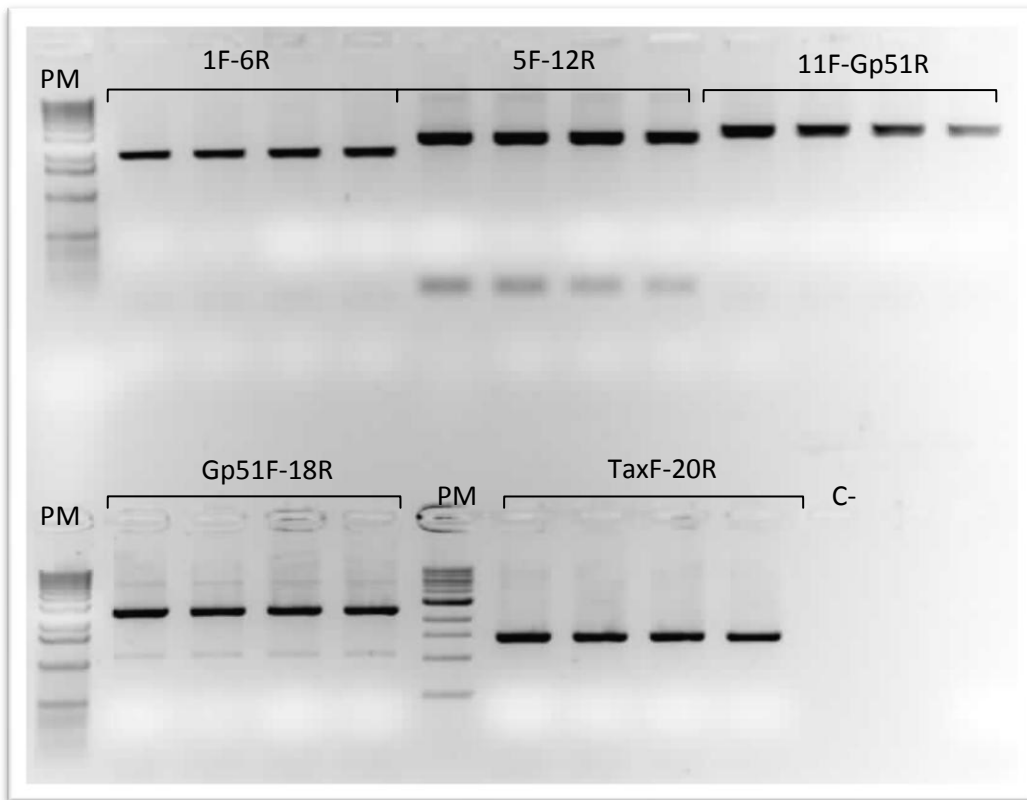
**Figura 6.** Electroforesis en gel de los productos de PCR para el fragmento 1F-6R (de 1,8kb) del genoma del VLB a diferentes temperaturas de hibridación de los oligonucleótidos. Se realizó un gel al 1,2% de agarosa teñido con EtBr PM: Peso Molecular de 1kb. 50, 52, 53, 55 y 57 corresponden a las temperaturas (°C) de hibridación de oligonucleótidos utilizadas en cada reacción de amplificación del fragmento. C-: Control Negativo.



**Figura 7.** Electroforesis en gel de los productos de PCR de los fragmentos 1F-Gp51R (de 5,7kb) y Gp51F-20R (de 3,8kb aprox.) del genoma de VLB. Se realizó un gel al 1% de agarosa teñido con Bromuro de Etidio. Cada PCR se realizó por duplicado, y se sembró 25µl del producto de reacción con 5µl de Buffer de Carga 6x en cada pocillo. PM: Peso Molecular de 1kb.

#### 4.3 AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DE VLB EN CINCO FRAGMENTOS CON LA TÉCNICA OPTIMIZADA

A fin de obtener el genoma completo de VLB perteneciente a la muestra de linfoma de una vaca infectada, se realizó la amplificación por PCR de los cinco fragmentos que resuelven el genoma completo bajo las condiciones de tiempo y temperatura optimizadas anteriormente. Cada reacción fue realizada por duplicado. Se obtuvo una excelente amplificación de los cinco segmentos. Las bandas que se visualizan en el gel migraron según el tamaño esperado (Figura 8).



**Figura 8. Electroforesis en de los productos de PCR que amplifican el genoma completo de VLB en cinco fragmentos (por duplicado).** Se realizó un gel al 1% de agarosa teñido con Bromuro de Etidio donde se sembraron 25µl de producto de PCR con 5µl de buffer de carga 6x en cada pocillo. PM: Peso Molecular de 1kb (#N3232S). C-: Control negativo. Las bandas obtenidas coinciden con los tamaños de las bandas esperadas: 1F-6R (de 1,8kb aprox.), 5F-12R (de 2,5kb aprox.), 11F-GP51R (de 2,9kb aprox.), GP51F-18R (de 2,5kb aprox.), TaxF-20R (de 1,4 kb).

#### 4.4. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR OBTENIDOS Y EVALUACIÓN DE LOS MISMOS

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados y con motivo de confirmar la calidad de la purificación, se corrieron en un gel de agarosa (2%) 5 $\mu$ l de cada producto de purificación. Como se puede observar en la figura 9, se obtuvieron bandas con los tamaños esperados para cada uno de los cinco fragmentos amplificados del genoma de VLB.



**Fig. 9. Electroforesis en gel de los cinco purificados de ADN del genoma de VLB.** Se realizó un gel al 2% de agarosa teñido con Bromuro de Etidio donde se sembraron 5 $\mu$ l de cada producto de purificación con 1 $\mu$ l de Buffer de carga 6x en cada pocillo. PM: Peso Molecular de 1kb. 1F: fragmento 1F-6R (de ~1,8kb); 5F: fragmento 5F-12R (de ~2,5kb); 11F: fragmento 11F-Gp51R (de ~2,9kb); Gp51F: fragmento Gp51F-18R (de ~2,5kb); y TaxF: fragmento TaxF-20R (de ~1,4kb).

Los purificados fueron cuantificados mediante medidas de absorbancia en el espectrofotómetro nanodrop. Los valores obtenidos son coherentes al ser comparados con las intensidades de las bandas obtenidas en el gel de agarosa (ver Figura 9). A fin de aumentar la concentración, los purificados fueron precipitados y re-suspendidos en volúmenes menores (ver Tabla 2).

**Tabla 2. Cuadro comparativo de las concentraciones de ADN obtenidas para los productos de purificación y para los productos de purificación-precipitación.**

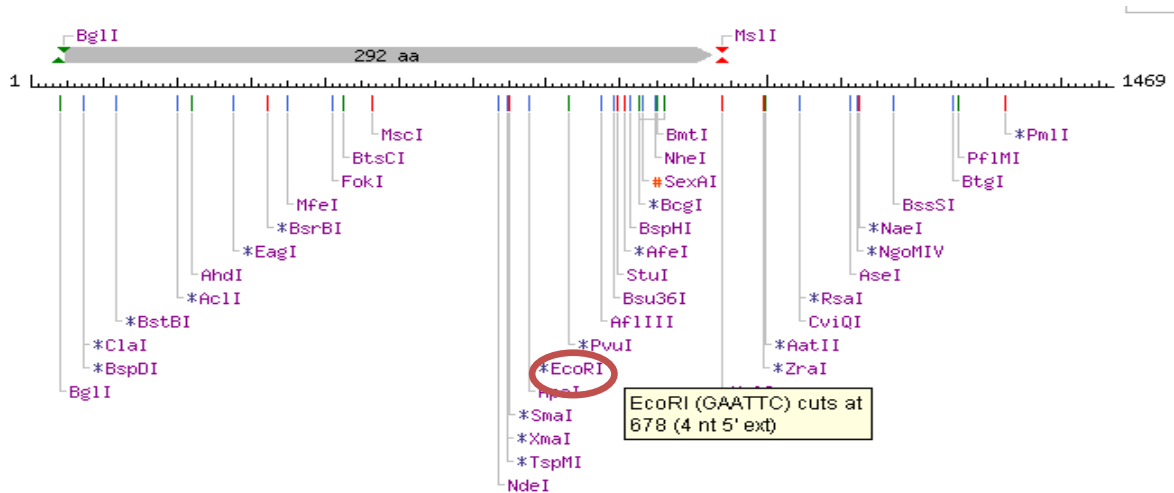
Fragmento	Tamaño aproximado del fragmento (en kb)	Concentración del Purificado (en ng/μl)	Concentración del Purificado-Precipitado (en ng/μl)
1F-6R	1,8	7,5	8,6
5F-12R	2,5	16,4	22,5
11F-Gp51R	2,9	19,6	22,8
Gp51F-18R	2,5	8,6	14
TaxF-20R	1,4	12,1	15,2

#### 4.5 LIGACIÓN, TRANSFORMACIÓN Y DIGESTIÓN

Los productos de PCR purificados fueron ligados en el vector PGEM T easy y posteriormente amplificados en células *E. coli* X-L1blue. La presencia del inserto fue verificada mediante digestión con enzima de restricción.

A fin de determinar la enzima a utilizar, se realizó un análisis bioinformático del patrón de cortes del genoma completo de VLB con enzimas de restricción para la secuencia de VLB código EF600696 (seleccionada de la Base de Datos). Este análisis dio un único sitio de corte para la enzima EcoRI en la posición 7929 de los 8720 nucleótidos que presenta la secuencia seleccionada. Este sitio de corte queda ubicado dentro del fragmento que se amplifica con el par de oligonucleótidos TaxF-20R. De los 1458 pb que representan la secuencia enmarcada por estos oligonucleótidos, EcoRI reconoce su sitio de corte (GAATTC) en el nucleótido 678, es decir, en el centro del fragmento (Figura 10).

En base a estos resultados es que se espera obtener una banda que correspondería a los dos fragmentos de aprox. 700pb, que resultan de la digestión del fragmento TaxF-20R con EcoRI.



**Figura 10. Patrón de cortes con diferentes enzimas de restricción para la secuencia flanqueada por los oligonucleótidos TaxF y 20R del genoma de VLB.** Se seleccionó la secuencia genómica de VLB de código de acceso en Gene Bank EF600696 y utilizando el programa NEBcutter 2.0 se analizan los sitios de corte para diferentes enzimas de restricción. Se resalta con rojo el sitio que reconoce la enzima EcoRI.

La corrida electroforética de los productos de digestión con la enzima EcoRI dio los siguientes resultados:

Para los plásmidos cuyo inserto era el fragmento 1F-6R se obtuvieron dos bandas, la primera con una migración de 3kb aproximadamente (el tamaño del vector PGem-T-Easy), y la otra de un tamaño aproximado de 1,8kb. Esta segunda banda coincide con el tamaño del fragmento clonado del genoma de VLB 1F-6R. Todos los clones seleccionados y para los cuales se realizó la miniprep de ADN plasmídico fueron positivos para este fragmento (Figura 11A).

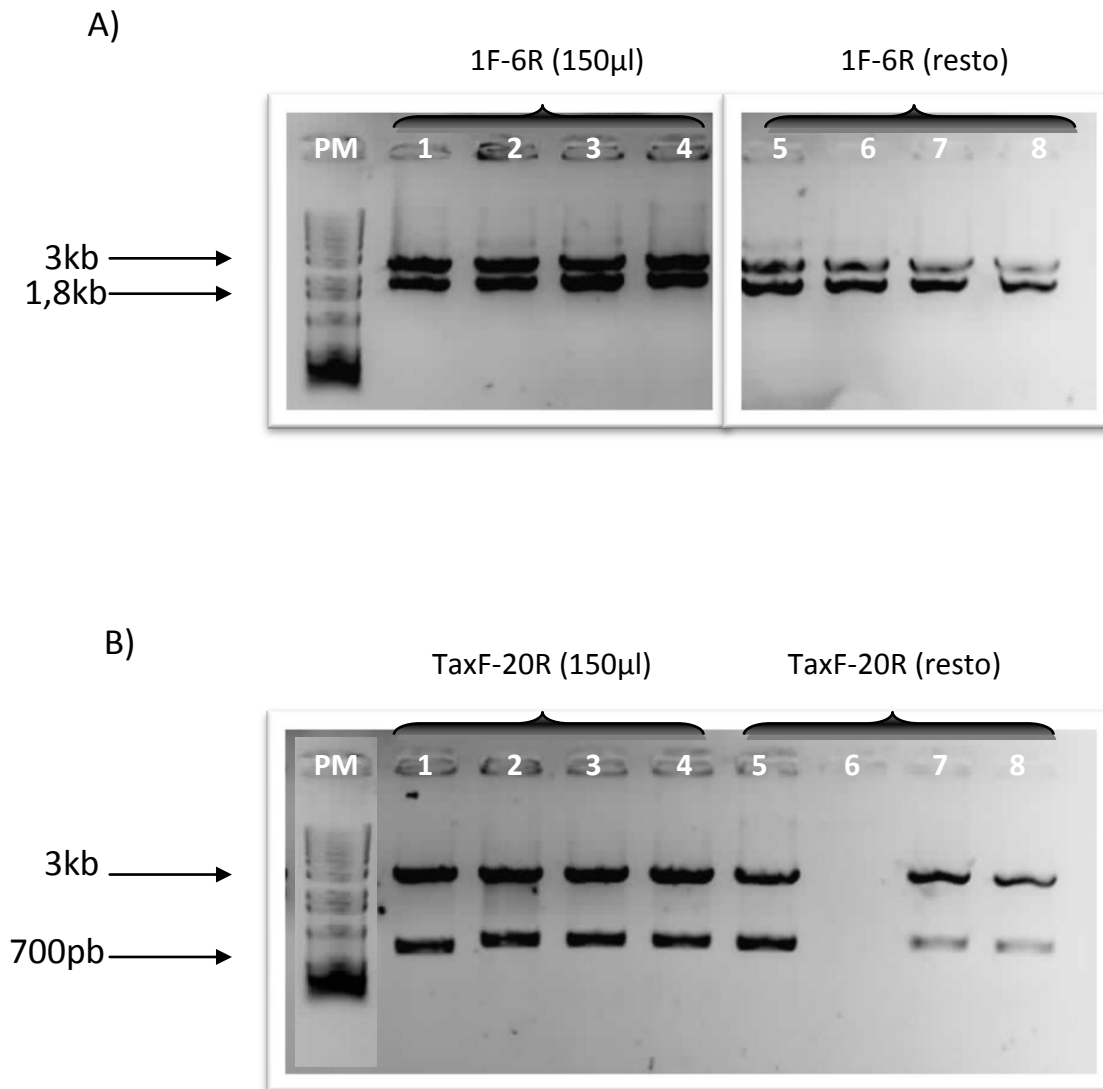
Para los plásmidos conteniendo como inserto el fragmento TaxF-20R (de 1,4kb aprox.), su digestión dio como resultado una banda con un tamaño de migración de 3kb y otra con un tamaño de 700pb aproximadamente. Considerando el análisis bioinformático del patrón de cortes de enzimas de



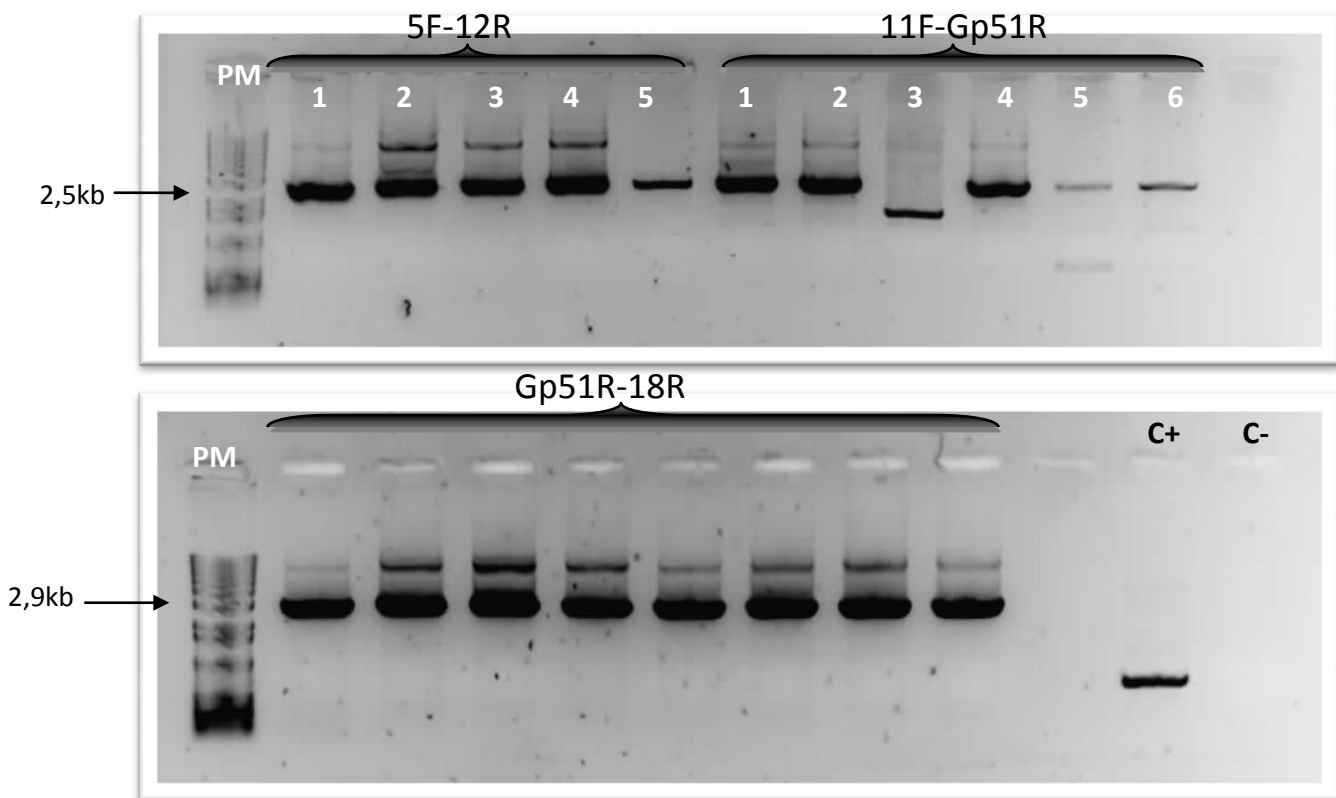
restricción en el genoma de VLB (Figura 10), este resultado coincide con el esperado. Solo en un clon (“resto 2”) no se obtuvieron bandas (Figura 11B).

Debido a que algunos de los plásmidos recombinantes contenían como inserto los fragmentos del genoma de VLB de tamaño semejante al del vector de 3kb, se realizó una PCR específica para confirmar la presencia de los diferentes insertos. Luego de la corrida electroforética se obtuvieron bandas de fuerte intensidad.

Para las minpreps conteniendo el fragmento 5F-12R se obtuvo la banda esperada de aproximadamente 2,5kb en todos los clones seleccionados. Para las minipreps con el inserto Gp51F-18R se amplificó el fragmento de aproximadamente 2,9kb en 5 de los 6 clones seleccionados. Para aquellas conteniendo el inserto 11F-gp51R, se amplificaron las bandas de aproximadamente 2,5kb en todos los clones seleccionados. El control positivo corresponde a una banda de 700pb que se amplifica utilizando el juego de oligonucleótidos 1F-2R y corresponde a la región 5’LTR del genoma de VLB. Por otro lado, el control negativo fue realizado de forma correcta y por lo tanto no se obtuvo producto de amplificación (Figura 12).



**Figura 11. Corrida electroforética en gel de los productos de digestión con la enzima EcoR1.** Se realizó un gel al 1% de agarosa teñido con Bromuro de Etidio A) Digestiones de las minipreps con el inserto 1F-6R de 1,8kb. En los carriles del 1 al 4 las digestiones corresponden a minipreps de clones crecidos a partir del sembrado de 150 $\mu$ l de células transformadas. Los carriles del 5 al 6 corresponden a la digestión de las minipreps seleccionadas de clones crecidos a partir del sembrado del “resto” de las células. B) Digestiones de las minipreps con el inserto TaxF-20R de 1,4kb. En los carriles del 1 al 4 las digestiones corresponden a minipreps de clones crecidos a partir de la siembra de 150 $\mu$ l de células transformadas. Los carriles restantes corresponden a digestiones de las minipreps seleccionadas de clones crecidos a partir de la siembra del “resto” de las células.



**Figura 12. Electroforesis en gel de los productos de PCR para fragmentos del genoma de VLB de tamaño semejante al del vector P-Gem-T- Easy de 3kb.** Se realizó un gel al 1 % de agarosa teñido con Bromuro de Etidio. Se seleccionaron 5 minipreps donde se amplificó el fragmento 5F-12R de 2,5kb; 6 minipreps donde se amplificó 11F-Gp51R de 2,5kb; y 8 minipreps donde se amplificó Gp51F-18R de 2,9kb. C+: Control positivo, corresponde a la región LTR del genoma de VLB de aprox. 700pb. C-: Control negativo.

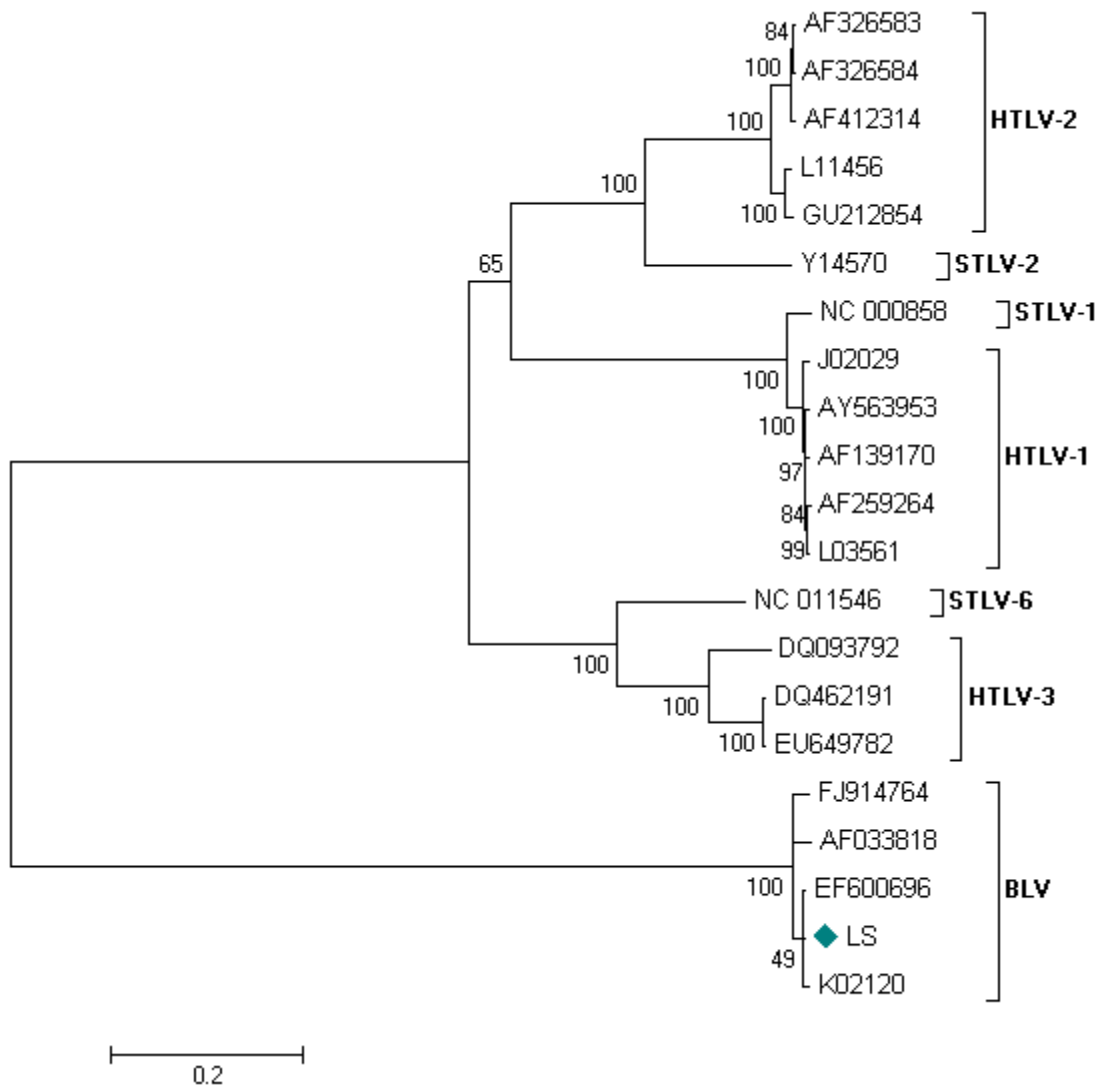
#### 4.6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA SECUENCIA COMPLETA DEL GENOMA DE VLB.

##### 4.6.1. Ensamblado de la secuencia “LS”

Cada uno de los cinco fragmentos amplificados y clonados fueron secuenciados utilizando oligonucleótidos internos solapados diseñados por nuestro grupo. Los mismos pueden observarse en la figura 4 que esquematiza el diseño abordado para la realización de las diferentes reacciones de secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y corroboradas por al menos tres reacciones de secuenciación en ambos sentidos para cada uno de las secuencias obtenidas, a fin de obtener la secuencia nucleotídica del genoma completo de VLB la cual denominamos “LS” haciendo referencia al origen de la manifestación clínica Linfoma.

##### 4.6.2 Análisis filogenético de VLB utilizando genomas completos

A modo de comenzar el estudio bioinformático de la estirpe de VLB amplificada, clonada y secuenciada por nosotros realizamos un primer análisis filogenético para determinar las relaciones genéticas definitivas entre las cepas de VLB y cepas de otros miembros del género Deltaretrovirus, HTLV y STLV. Se construyeron arboles filogenéticos de máxima verosimilitud los cuales mostraron una filogenia donde todas las cepas se agrupan en el árbol de acuerdo al tipo de virus, con altos valores de aLRT en cada caso. Estos estudios revelan una marcada diversificación genética entre VLB y los demás miembros del género Deltaretrovirus. Se aprecia también una mayor relación genética entre virus HTLV y STLV, y una más distante con el clado de VLB (Figura 13). Estos resultados pueden explicarse en parte debido a que HTLV y STLV presentan como célula blanco a los linfocitos T, mientras que VLB infecta a los linfocitos B.



**Figura 13. Árbol filogenético de máxima verosimilitud utilizando secuencias del genoma completo de cepas de Deltaretrovirus.** En esta figura se observa las secuencias de las cepas previamente descritas por el número de acceso y a la derecha de cada cepa se indica el virus al que pertenece (HTLV, STLV y VLB). La cepa de VLB aislada de linfoma se identifica con un rombo a color. El valor de cada uno de los nodos muestra el valor de aLRT. La barra en la parte inferior del árbol denota distancia genética.

#### 4.6.3 Análisis comparativo de la región 5'LTR

Se alineó la secuencia completa "LS" con otros genomas completos de VLB disponibles en GeneBank. Las secuencias seleccionadas han sido obtenidas de diferentes orígenes y cuyos códigos de acceso fueron los siguientes: EF600696 (origen: FLK, línea celular persistentemente infectada); FJ914764 (corresponde a una cepa proveniente de una infección experimental de una oveja con una estirpe Argentina); AF257515 (estirpe Argentina obtenida de PBMC); K02120 (Japonesa, extraída de células tumorales) y AF033818 (de USA-Belga, obtenida de PBMC).

Se comparó la región 5'-LTR de nuestra secuencia "LS" con la de las cepas seleccionadas de VLB mencionadas anteriormente. Este estudio reveló que esta región del genoma se encuentra altamente conservada entre las diferentes estirpes de VLB en estudio. La única diferencia significativa entre nuestra secuencia y las cepas aisladas a partir de otros orígenes fue una sustitución encontrada en el tercer elemento potenciador de esta región y en el sitio de unión GRE (Figura 14). Estudios previos han determinado que GRE confiere capacidad de respuesta a los glucocorticoides como la dexametasona en presencia del transactivador Tax (Niermann y Buehring, 1997). En ausencia de Tax, mutaciones de GRE disminuyen significativamente la actividad basal del LTR (Xiao y Buehring, 1998). Esto plantea la hipótesis de que estas alteraciones pueden haber permitido un mejor silenciamiento de la transcripción viral de las cepas de linfoma, como una estrategia para permitir el escape al reconocimiento por parte de la respuesta inmune del hospedero (Merezak et al, 2001; Xiao y Buehring, 1998).



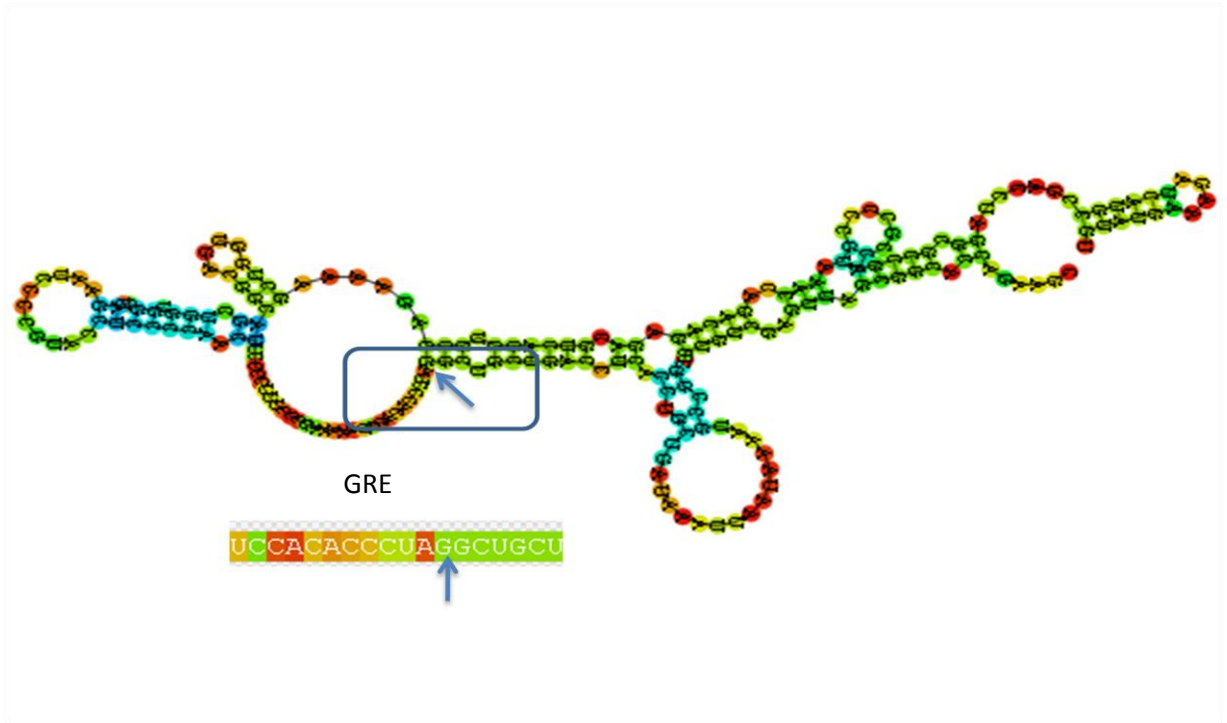
**Figura 14. Análisis comparativo de la región 5'-LTR de secuencias de VLB de cepas aisladas a partir de diferentes orígenes y de linfosarcoma.** En la figura se pueden observar los alineamientos correspondientes a secuencias nucleotídicas pertenecientes a la cepa de VLB aislada de linfosarcoma (LS) y a cepas aisladas de diferentes orígenes. EF600696 (FLK, línea celular persistentemente infectada); FJ914764 (corresponde a una cepas proveniente de una infección experimental de una oveja con una estirpe Argentina); AF257515( estirpe Argentina obtenida de PBMC); K02120 (Japonesa, extraída PBMC)

#### 4.6.4. Predicción de la estructura en 3D del ARN en la región U3 del LTR

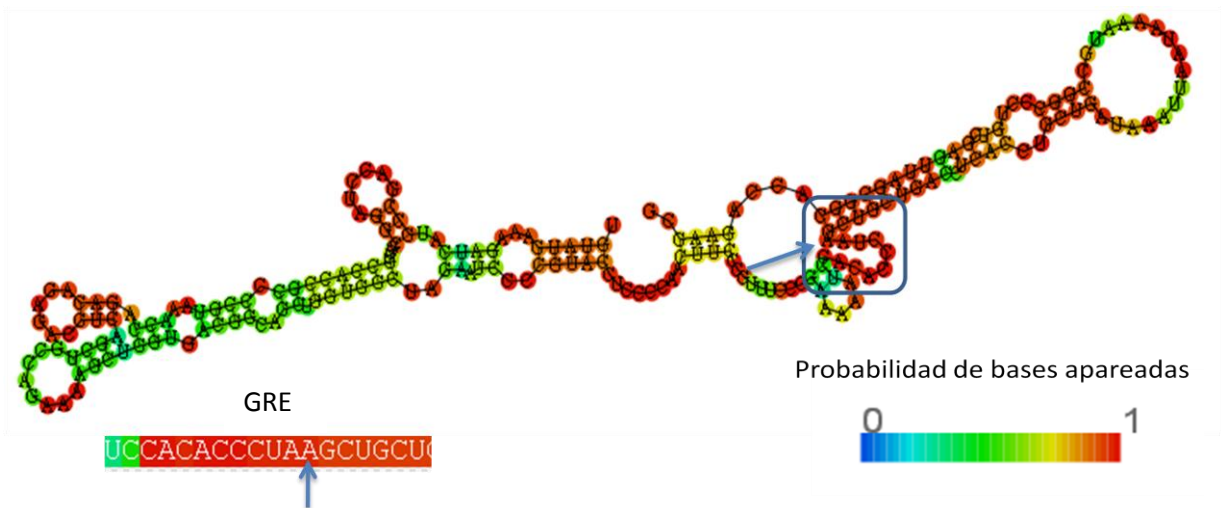
Dada la sustitución encontrada en el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE), seleccionamos la región U3 del LTR del genoma de VLB (que contiene el sitio GRE) y realizamos una predicción de la estructura 3D del ARN para la secuencia proveniente del linfoma "LS" y para una secuencia proveniente de otro origen (secuencia EF600696 de FLK) (ver Figura 15). Se seleccionó la estructura que requiere la mínima energía libre para su formación. Los sitios GRE de ambas secuencias dieron estructuras con diferencias significativas en las probabilidades de aparearse entre bases. Para la secuencia obtenida de linfoma, el elemento de respuesta a glucocorticoide (GRE) conforma una estructura secundaria más compleja y con mayor probabilidad de apareamiento de bases en comparación a la estructura óptima para la secuencia de origen FLK. El sitio de la mutación G→A hace más inaccesible el reconocimiento del sitio GRE en la secuencia que derivará en el desarrollo del tumor (Ver Fig. 15). De este modo interpretamos que este sitio forma una estructura más difícil de ser reconocida por factores de transcripción relacionados, lo cual coincide con la hipótesis de que mutaciones allí están relacionadas con un mejor silenciamiento de la transcripción viral de las cepas de linfoma, como una estrategia para permitir el escape al reconocimiento por parte de la respuesta inmune del hospedero y seguir adelante con la manifestación tumoral (Merezak *et al.*, 2001; Xiao y Buehring, 1998).



A



B



**Figura 15. Predicción de la estructura 3D de la región U3 del ARN del genoma de VLB obtenido de células FLK (A) y de linfoma (B).** En el recuadro azul se muestra el sitio GRE y con una flecha se indica la base donde se encontró la mutación en la secuencia “LS” (G→A). Se seleccionaron las estructuras que se conforman con la menor energía libre para cada caso. Los colores representan la probabilidad de que las bases formen pares apareados. Para las regiones donde las bases no forman pares, los colores representan la probabilidad de que las bases no estén apareadas. El análisis se realizó utilizando el programa RNAfold websuite.

#### 4.6.5 Comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas estructurales: Gag; Pol; Pro y Env

Se alinearon las secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales *gag*, *pol*, *prot* y *env* del genoma obtenido a partir de linfoma "LS" con las secuencias seleccionadas provenientes de diferentes orígenes y reportadas en la base de datos. (Figura 16).

- a) Gag. Gag incluye tres dominios principales: la matriz (p15-MA), la cápside (p24-CA) y la nucleocápside (p12-NC). Las proteínas NC de todos los *Retrovirus* comparten la característica de tener un alto porcentaje de residuos básicos y dominios de dedos de zinc involucrados en el empaquetamiento del ARN. Estudios previos han demostrado que las sustituciones en muchos residuos de aminoácidos básicos y todos los residuos en los dominios de los dedos de zinc en el dominio NC de VLB, reducen significativamente el empaquetamiento del ARN (Wang *et al.*, 2003). Se puede apreciar que los dedos de zinc y los aminoácidos básicos se encuentran bien conservados entre todas las estirpes involucradas en este estudio. No obstante, se observa una sustitución de una Prolina a una Serina (P340S) en la proteína NC de la secuencia LS (Figura 16-A).
- b) PR. Todos los *Retrovirus* competentes para la replicación, como VLB, codifican una proteasa aspártica (PR) (Leis *et al.*, 1988). La comparación de la secuencia aminoacídica de PR de la cepa obtenida "LS" con la de las otras cepas de VLB analizadas en este estudio, dan cuenta de una única sustitución de aminoácidos (V165I) (Fig. 16-B). Esta sustitución está por fuera de los sitios de clivaje involucrados en la función de la PR de VLB (Sperka *et al.*, 2007; Bagossi *et al.*, 2005).

- c) Pol. Comparando la secuencia de aminoácidos de *pol*, se encuentran dos sustituciones, una de ellas se ubica en la región de la RT (T377A), mientras que la otra se encuentra en la región endonucleasa (S573P). Más estudios serán necesarios para establecer los efectos que estas sustituciones pueden causar en la fidelidad o procesividad de la polimerasa de VLB (Figura 16-C).
- d) Env. La proteína de envoltura de los *Retrovirus*, que es sintetizada a partir del gen *env*, le confiere a éstos la capacidad de infectar las células del hospedero. El complejo proteico Env se compone de las subunidades de gp 51, la glicoproteína de superficie (SU), que se ancla a los viriones mediante su asociación con las subunidades de la proteína transmembrana gp 30 (TM). La comparación de la proteína Env de la cepa "LS" con respecto a las cepas de VLB aisladas de PBMC y otros orígenes, revela una sustitución ubicada en un epítipo conformacional de SU (D134N), más específicamente en una región previamente relacionada en la neutralización, denominada "segundo dominio de neutralización" (Johnston *et al.*, 2002; Callebaut *et al.*, 1993;) (Figura 16-D). Asimismo, se ha demostrado que esta región puede contener también el dominio de unión al receptor (RBD), análogo al RBD de los miembros del género *Gammaretrovirus* (Johnston *et al.*, 2002). Este cambio representa una firma molecular para estirpes que circulan en nuestro país y no estaría asociado a la patología tumoral de la enfermedad (Moratorio *et al.*, 2010).

(A)

*gag*

1 **P15-MA** 50 100

LS **MGNSPSYNPPAGISPSDWLNLQSAQRLNPRPSDFDTDLKNYIHWFKHTQKKPWTFTSGGPTSCPPGRFGRVPLVLA TLNEVLSNDGGAPGASAPEEQP**

EF600696 .....

AF033818 .....R.....A.....K.....E.....

FJ914764 .....Y.....S.....T.....

K02120 .....E.....

AF257515 .....Y.....S.....T.....

101 **P24-CA** 150 200

LS **PPYDPPAVLPII SEGNRNRHRAWALRELQDIKKEIENKAPGSQVWIQTLRLAILQADPTPADLEQLCQYIASPVDQTAHMTSLTAATAAAEAANTLQGFN**

EF600696 .....

AF033818 .....I.....

FJ914764 .....

K02120 .....I.....-

AF257515 .....V.....

201 250 300

LS **PQNGTLTQOSAQP NAGDLRSQYQNLWLQAWKNLPTRPSVQPWSTIVQGPAESYVEFVNRLQISLADNLPDGVPKPEIIDSLSYANANKECQQILQGRGLV**

EF600696 .....

AF033818 .....

FJ914764 .....S.....

K02120 .....-.....S.....-.....R.....-

AF257515 .....

301 **P12-NC** 350 **Zn finger** **Zn finger**

LS **AAPVGQKLQACAHWAPKMKQPAILVHTPGPKMPGPRQPASKRPPPGPCYRCLKEGHWARD CPTKATGPPPGPCPICKDPSHWKRDCPTLKSKN**

EF600696 .....V.....V.....P.....

AF033818 .....V.....P.....T.....

FJ914764 .....I.....P.....T.....L.....

K02120 ..--.....L.....P.....

AF257525 .....I.....P.....T.....L.....

(B) *pro*

1 50 100

LS **RSFPLETRLNSNPQIKK LIEGGLSAPQTITPITDLSLEAELECLLSIPLARSRPSVAVYLSGPWLQPSQNQALMLVDTGAE~~MT~~VLPQNWLV RDYPRIPAAV**

EF600696 .....

AF033818 .....V.....P.....

FJ914764 .....T.....R.....T.....

K02120 .....

AF257525 .....T.....E.....T.....

ANÁLISIS DEL GENOMA COMPLETO DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA OBTENIDO A PARTIR DE UN LINFOSARCOMA

```

101                               150
LS      LGAGGVSRNRYNWLQPLTLALKPEGPFITIPKILVDTFDKWQILGRDVLSRLQASISIPEEIRPPVG
EF600696 .....V.....
AF033818 .....V...M..
FJ914764 .....VP.....
K02120 .....S.....V.....
AF257515 .....I.....S..L...I.....V.....

```

**(C) pol**

```

1                               50                               100
LS      GASIPFKLERLQALQDLVHRSLEAGYISPWDGPGNNPVFPVRKPNGAWRFVHDLRATNALTKPIPALSPGPPDLTAIPTHLPHIICLDLKDFAFFQIPVED
EF600696 .....
AF033818 .T.....T.....
FJ914764 .T.....L.....T.....
K02120 .....P.....
AF257515 .T.....T.....R.PP.....

101                               150                               200
LS      RFRSYFAFTLPTPGGLQPHRRFAWRVLPQGFINSPALFERALQEPLRQVSAAFSQSLIVSYMDDILIASPTEEQRSQCYQALAAARLRDLGFQVASEKTRO
EF600696 ...P.....
AF033818 .....
FJ914764 .....T.....
K02120 ...F.LS...S.....Y.....S.
AF257515 .....T.....

201                               250                               300
LS      TPSPVPFLGQMVHEQIVTYQSLPTLQISSPISLHQLQAVLGDLQWVSRGTPPTRRPLQLLYSSLKGIIDPRAIQLSPEQLQGI AELRQALSHNARSRYN
EF600696 .....
AF033818 .....N.....
FJ914764 .....L.....
K02120 .....-.....
AF257515 .....L.....

```

ANÁLISIS DEL GENOMA COMPLETO DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA OBTENIDO A PARTIR DE UN LINFOSARCOMA

	301	350	400
LS	EQEPLLAYVHLTRAGSTLVLFQKGAQFPLAYFQTPLTDNQASPWGLLLLLGCQYLOQTQALSSYAKPILKYHNLPKASLDNWIQSSSEDPRVQELLQLWPO		
EF600696	.....T.....		
AF033818	.....T.....		
FJ914764	.....T.....		
K02120	.....T.....		
AF257515	.....V.TF.....C.....		

	401	450	500
LS	ISSQGIQPPGPWKTLITRAEVFLTPQFSPDPIPAALCLFSDGATGRGAYCLWKDHLDFQAVPAPESAQKGE LAGLLAGLAAAPPEPVNIWVDSKYLYSL		
EF600696	.....		
AF033818	.....E.....L.....		
FJ914764	.....E.....L.....		
K02120	.....		
AF257515	.....V.....E.....L.....		

	501	550	<b>endonuclease</b>	600
LS	LRTLVLGAWLQDPVPSYALLYKSLLRHPAIFVGHVRSRSSASHPIASLNNYVDQLLPLETPEQWHKLTHCNPRALSRWPNPRISAWDPRSPATLCETCQ			
EF600696	.....N.....S.....V.....			
AF033818	.....S.....			
FJ914764	.....S.....			
K02120	.....V.....S.....			
AF257515	.....V.....S.....V.....			

	601	650	700
LS	KLNPTGGGKMRTIQRGWAPNHIWQADI THYKYKQFTYALHVFVD TYSGATHASAKRGLTQTQMTIEGLLEAIVHLGRP KKLNTDQGANYTSKTFVRFCCQF		
EF600696	.....R.....		
AF033818	R.....		
FJ914764	.....R.A.....		
K02120	.....T.....		
AF257515	.....R.A.....		

	701	750	800
LS	GVSLSHHV PYNPTSSGLVERTNGLL KLLSKYHLDEPHLPMTQALS RALWTHNQINLLPILKTRWELHHS PPLAVISEGGETPKGSDKLF LYKLPQGNNR		
EF600696	.....		
AF033818	.I.....		
FJ914764	.....I.....		
K02120	.....D.....L.....		
AF257515	.....I.....		

ANÁLISIS DEL GENOMA COMPLETO DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA OBTENIDO A PARTIR DE UN LINFOSARCOMA

	801		850
LS	RWLGPLPALVEASGGALLATDPPVWVPWRLLKAFKCLKNDGPEDAHNRSSDG		
EF600696	.....		
AF033818	.....N.....		.....P.....
FJ914764	.....I.....		.....P.....
K02120	.....		
AF257515	.....I.....		.....P.....

(D)env

|→ conformational epitopes F,G,H

	1	Leader peptide	→gp51	50		ND	100	
LS	MPKERRSRRRPQPIIRWVSLTLLTLLALCRPIQ			TWRC	SLSLGNQ	QWMTAYNQ	EAKFSISIDQILEAHNQSPFCAKSPRYTLDSVNGYPKIYWPPP	QGRRRF
EF600696	..K.....							
AF033818	.....Q.....		.....T.....			PR.....	F.....	
FJ914764	.....Q.....	T.....					F.....	
K02120	.....							
AF257515	.....Q.....		F.....				F.....	

Conformational epitopes F,G,H-|

	101		ND	150	CD8 <sup>+</sup> -T Cell epitope	epitope E	200
LS	GARAMV	TYDCEPRCPYVGADHFDCPHWDNA	SQANQGSFYVNHQILSLHL	KQCH	GIFTLTWEIW	GYDPLITFSLHKIPDPPQPD	FPQLNSDWVPSVRSWAL
EF600696	.....		D.....				
AF033818	.....H.....		D.....				
FJ914764	.....		D.....D.....		G.....		
K02120	.....						
AF257515	.....		D.....D.....				

	201	epitope B	epitope B'	250	epitopes D D'	TMHR	epitope A	300	
LS	LLNQ	TARAF	PDCAICWEPSPPWAFE	ILVYNKTI	SSSG	PGLALPDAQIFWVNTSSFN	TQGWHHPSQR	LLFNVSQGNALLPPIISLVNLSTASSAPPT	RVR
EF600696	.....								
AF033818	.....		G.....		L.....			V.....	
FJ914764	.....				L.....	I.....			K.....
K02120	.....								
AF257515	.....			S.....					
				L.A.....		I.....	V.....	F.G.....	GFF..S...K



**Figura 16. Comparación de secuencias de aminoácidos de las proteínas estructurales de cepas de VLB reportadas y de la cepa aislada de linfoma.** En la figura se puede observar los alineamientos de aminoácidos correspondientes a: A) Gag; B) Pro; C) Pol y D) Env. Al igual que en la figura 14, LS corresponde a la cepa aislada de linfoma, EF600696 (FLK, línea celular persistentemente infectada); FJ914764 (corresponde a una cepa proveniente de una infección experimental de una oveja con una estirpe Argentina); AF257515 (estirpe Argentina obtenida de PBMC); K02120 (Japonesa); AF033818 (USA- Belga , PBMC)



#### 4.6.6 Comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas no estructurales: Tax; Rex; G4 y R3

Como se menciona en la introducción, además de los genes estructurales (*gag*, *pro*, *pol* y *env*), el provirus de VLB contiene una región llamada X, ubicada entre el gen *env* y el LTR 3', que codifica al menos cuatro proteínas: Tax, Rex, G4 y R3 (Van der Broeke *et al.*, 1999).

Estudios previos sobre los dominios funcionales de la proteína Tax de VLB han identificado un motivo de dedos de zinc (aminoácidos 30 a 53), un dominio transactivador (aminoácidos 157 a 197) y dos sitios de fosforilación (aminoácidos 106 y 293) (Willems *et al.*, 1989; Willems 1991) (Figura 17-A). Se han descrito una serie de mutantes de Tax de VLB con una mayor capacidad de estimular la transcripción dirigida por LTR, en comparación con la Tax salvaje (Tajima y Aida, 2000). Sin embargo, en las cepas de VLB analizadas en este estudio, no se observa ningún cambio aminoacídico relacionado con una mayor actividad transcripcional.

Las proteínas Rex de los *Deltaretroviruses* actúan facilitando la exportación de ARN virales conteniendo intrones (Choi *et al.*, 2005). En esta región no se observan diferencias en la secuencia de aminoácidos entre "LS" y las secuencias seleccionadas restantes (Figura 17-B).

La secuencia de aminoácidos de G4 incluye un tramo amino-terminal de residuos hidrofóbicos (aminoácidos 1 a 24) seguido de posibles sitios de clivaje proteolítico y una región rica en argininas (aminoácidos 58 a 72), situada en el centro de la proteína (Alexandersen *et al.*, 1993) (Figura 17-C). Al comparar la secuencia "LS" con las restantes provenientes de diferentes orígenes, se observa una sustitución (A29V) en la cepa proveniente del linfosarcoma. La posible implicancia de esta sustitución en la patogenia de VLB es aún desconocida.

La proteína R3 contiene 44 aminoácidos y se compone de una región hidrofílica N-terminal, seguida por una región hidrofóbica. La comparación de su secuencia no presenta sustituciones significativas (Fig. 17-D).

**(A)tax**

**Zn finger**

LS MASVVGWGP HSLHACPALVLSNDVTIDAWCPLCGPHERLQFERIDTTLTCETHRINWNTADGRPCGLNGTLFPRLHVSETRPQGPRRLWINCPLPAVRAQP  
 EF600696 .....  
 AF033818 ..... T ..... F .....  
 FJ914764 ..... P ..... T ..... F ..... A .....  
 K02120 .....  
 AF257515 ..... H ..... T ..... F ..... A .....

157 **Leucine-rich activation domain**

LS GPVSLSPFERSPFQPYQCQLPSASSDGCPIIGHGLLPWNNLVTHPVLGKVLILNQMANFSLLP SFDLLVDPLRLSVFAPDTRGAI RYLS TLLTLC PATC  
 EF600696 ..... R .....  
 AF033818 ..... Q ..... P ..... V .....  
 FJ914764 ..... V ..... P .....  
 K02120 .....  
 AF257515 ..... V ..... P . N .....

LS ILPLGEPFSPNPVICRFPRDSNEPPLSEFELPLIQTPGLSWSVPAIDLFLTGPPSPCDRLHVWSSPQALQRF LHDPTLTWSELVASRKIRLDSPLK LQLL  
 EF600696 .....  
 AF033818 ..... TS ..... Y ..... G . L .....  
 FJ914764 ..... L .....  
 K02120 ..... P .....  
 AF257515 ..... L .....

303

LS ENEWSRLF  
 EF600696 .....  
 AF033818 .....  
 FJ914764 .....  
 K02120 .....  
 AF257515 .....

**(B)rex**

**NES**

LS MPKERRSRRRPQPIIRWRQNYFLSFKQVLLVGGPTLYMPARPWFCPMMSPSPMGAPSAGPMSDSNSKGSTPRSPARPTVSTGPPMDDLAASMERCSLDCM  
 EF600696 ..... K .....  
 AF033818 ..... N ..... P ..... L ..... H .....  
 FJ914764 ..... T ..... P ..... P ..... S .....  
 K02120 .....  
 AF257515 ..... T ..... T ..... P ..... S .....

ANÁLISIS DEL GENOMA COMPLETO DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA OBTENIDO A PARTIR DE UN LINFOSARCOMA

**NLS**

```

LS          SPRPAPKGPDDSGSTAPFRPFALSPARRFHFPSSGPPSSPTNANCRPLATVAPLSGTAFFPGTT
EF600696   .....
AF033818   .....S.....S.....
FJ914764   .....S.....
K02120     .....
AF257515   ...G.....S.....
    
```

**(C)G4**

1 **Leader peptide** ▼▼

**MYB**

**ARR**

100

```

LS          LACTRVCFLSYFLFLAARALSFCAQPHPVAFGPPFLTVPIKSLPFPQRLPLHLLFPPRHRLPRRALRALRDPLPDNDKIIISCLLSKCCWLGAPLSTCLPGPGFVQ
EF600696   .....A.....
AF033818   .....A.....
FJ914764   .....G...F.....A.....
K02120     .....A.....
AF257515   .....RA.....L.....
    
```

**(D)R3**

```

LS          1                               44
MPKERRSRRRPQPIIRWVLMNVFPCNKPQQRHSSHIQ QHLGRLF
EF600696   ...K.....
AF033818   .....I.....
FJ914764   .....I.....V.....
K02120     .....
AF257515   .....I.....V.....L.....
    
```

**Figura 17. Comparación de secuencias de aminoácidos de las proteínas no estructurales de cepas de VLB aisladas de linfoma y otras disponibles.** Se observan los alineamientos de aminoácidos correspondientes a: A) Tax; B) Rex; C) G4 y D) R3. Al igual que en la figura 16, LS corresponde a la cepa aislada de linfoma, EF600696 (FLK, línea celular persistentemente infectada); FJ914764 (corresponde a una cepa proveniente de una infección experimental de una oveja con una estirpe Argentina); AF257515 (estirpe Argentina obtenida de PBMC); K02120 (Japonesa); AF033818 (USA- Belga, PBMC)

## 5. CONCLUSIONES

Los análisis filogenéticos realizados revelan una marcada diversificación genética entre VLB y los demás miembros del género Deltaretrovirus. Se observa también una estrecha relación genética entre virus HTLV y STLV, y una relación más distante con el clado de VLB.

Se logró amplificar, clonar y secuenciar por primera vez el genoma completo de VLB (de 8700 nucleótidos aproximadamente), partiendo de una muestra de linfoma de una vaca infectada. La misma se obtuvo mediante un diseño de amplificación del genoma en cinco fragmentos solapados.

La secuencia obtenida, la cual llamamos "LS", fue comparada con secuencias de genomas completos disponibles en la base de datos de orígenes no tumorales (PBMC, o de la línea celular FLK). Su análisis permitió observar ciertas diferencias en sitios particulares, a pesar del alto grado de conservación que presentan las principales regiones estructurales, enzimáticas y regulatorias del genoma de VLB.

La sustitución encontrada en el sitio GRE del 5'-LTR de la cepa de VLB aislada del linfoma, podría estar implicada en favorecer el silenciamiento viral de forma de potenciar la progresión de la enfermedad tumoral. Esta hipótesis es coherente también con los resultados obtenidos de la estructura en 3D que conforma el ARN en la región U3 del 5'LTR.

Se observó una sustitución de Prolina a Serina (P340S) en la proteína de la nucleocápside (p12-NC) en la cepa de VLB aislada de linfoma.

Se observó también un cambio relevante en un importante epítipo de la glicoproteína de superficie SU-gp51 (D134N), más específicamente en una región previamente relacionada en la neutralización, denominada "segundo dominio de neutralización". Este cambio no estaría relacionado con la manifestación tumoral de la enfermedad y representaría una firma molecular de estirpes circulantes en nuestro país.

En la cepa de VLB analizada en este estudio, no se observa ningún cambio aminoacídico en la proteína Tax relacionado con una mayor actividad transcripcional, tal como fueron reportados en trabajos anteriores.

## 6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas a este trabajo y parte de resultados preliminares que hemos obtenido, nos proponemos ampliar el número de secuencias de genomas completos de VLB partiendo de diferentes hospederos que padezcan las distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad. De esta forma podremos realizar un análisis comparativo más robusto, a fin de contestar cuánto puede influir la estirpe viral en la enfermedad.

Del mismo modo, sería interesante realizar un análisis comparativo de secuencias de genomas completos de VLB obtenidos de un mismo hospedero, de diferentes compartimentos como ser PBMC y linfoma, para aquellos que presentan esta manifestación clínica de la enfermedad. En este caso se podría evaluar si existen cambios genéticos relacionados con diferentes tropismos celulares.

Por todo lo que antecede, sería interesante generar una Base de Datos de libre acceso que sea específica para el Virus de la Leucosis Bovina, en la cual además de encontrar las secuencias de los genomas de VLB, sea un sitio de información actualizada sobre todo lo que se conoce respecto a la enfermedad que este agente causa. Esta idea es una forma de contribuir al conocimiento del tema y ampliar la participación de quienes están involucrados en el estudio de la Leucosis Bovina desde diferentes enfoques, un tema de suma importancia ya que afecta la salud y bien estar del ganado vacuno y trae consigo consecuencias para la producción del país.

## 7. REFERENCIAS

Abreu V.L.V., Silva J.A., Modena C.M., Moreira É.C., Figueiredo M.M.N. 1990. Prevalência da leucose enzoótica bovina nos estados de Rondônia e Acre. *Arq bras med vet zootec* 42: 203-210.

Acaite J, Tamosiunas V, Lukauskas K, Milius J, Pieskus J. 2007. The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. *Prev Vet Med.* 15; 82(1-2):83-9

Adam E, Kerkhofs P, Mammerickx M, Burny A, Kettmann R, Willems L.1996. The CREB, ATF-1, and ATF-2 transcription factors from bovine leukemia virus-infected B lymphocytes activate viral expression. *J Virol* 70:1990-9.

Alexandersen S., Carpenter S., Christensen J., Storgaard T., Viuff B., Wannemuehler Y., Belousov J., Roth J.A. 1993. Identification of alternatively spliced mRNAs encoding potential new regulatory proteins in cattle infected with bovine leukemia virus. *J Virol* 67: 39-52.

Alfonso R., Almansa J.E., Barrera J.C. 1998. Serological prevalence and evaluation of the risk factors of bovine enzootic leukosis in the Bogotá savannah and the Ubaté and Chiquinquirá Valleys, Colombia. *Rev Sci Tech* 17: 723-732.

Anisimova M., Gascuel O. 2006. Approximate likelihood ratio test for branches: a fast, accurate and powerful alternative. *Syst Biol* 55: 539–552.

Bagossi P., Sperka T., Feher A., Kadas J., Zahuczky G., Miklossy G., Boross P., Tozser J. 2005. Amino acid preferences for a critical substrate binding subsite of retroviral proteases in type 1 cleavage sites. *J Virol* 79: 4213-4218.

Ballagi-Pordany, A.; Klintevall, K.; Merza, M.; Klingeborn, B.; Belak, S. 1992. Direct detection of bovine leukaemia virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. (B)*. 39: 69-77.

Bartenschlager R., Lohmann V. 2000. Replication of the hepatitis C virus. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* 14: 241-254.

Brenner,C. and Fuks,F. 2006. DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, 301, 45–66

Burny A., Cleuter Y., Kettmann R., Mammerickx M., Marbaix G., Portetelle D., Van den Broeke A., Willems L., Thomas R. 1988. Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv Vet Sci Comp Med* 32: 149-70.

Callebaut I., Voneche V., Mager A., Fumiere O., Krchnak V., Merza M., Zavada J., Mammerickx M., Burny A., Portetelle D. 1993. Mapping of B neutralizing and T-helper epitopes on the bovine leukaemia virus external glycoprotein gp51. *J Virol* 67: 5321–5327.

Choi E.A., Hope T.J. 2005. Mutational analysis of bovine leukemia virus Rex: identification of a dominant-negative inhibitor. *J Virol* 79: 7172-7181.

Colin L., Dekoninck A., Reichert M., Calao M., Merimi M., Van den Broeke A., Vierendeel V., Cleuter Y., Burny A., Rohr O., Van Lint C. 2011. Chromatin disruption in the promoter of Bovine Leukemia Virus during transcriptional activation. *Nucleic Acids Res* 39: 9559-9573.

Coulston J., Naif H., Brandon R., Kumar S., Khan S., Daniel R., Lavin M. 1990. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates. *J Gen Virol* 71: 1737–1746.

Del Fava C., Pituco E.M. 2004. Infecção pelo vírus da leucemia bovina (BLV) no Brasil. *O Biológico* 66: 1-8.

Derse, D. 1987. Bovine leukemia virus transcription is controlled by a virus-encoded trans-acting factor and by cis-acting response elements. *J Virol* 61: 2462-2471.

Derse D. 1988. Trans-acting regulation of bovine leukemia virus mRNA processing. *J. Virol.* 62: 1115-1119.

Dube S., Dolcini G., Abbott L., Mehta S., Dube D., Gutierrez S., Ceriani C., Esteban E., Ferrer J., Poiesz B. 2000. The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from Argentina. *Virology* 277: 379-386.

Dube S., Abbott L., Dube D.K., Dolcini G., Gutierrez S., Ceriani C., Juliarena M., Ferrer J., Perzova R., Poiesz B.J. 2009. The complete genomic sequence of an in vivo low replicating BLV strain. *Virology* 6: 120.



Gatti, M. 2007. Leucosis bovina, enfermedad de gran importancia y limitante para la exportación de ganado en pie. Laboratorios Santa Elena, Uruguay. Sitio Argentino de Producción Animal

Gillet N., Florins A., Boxus M., Burteau C., Nigro A., Vandermeers F., Balon H., Bouzar A.B., Defoiche J., Burny A., Reichert M., Kettmann R., Willems L. 2007. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in humans. *Retrovirology* 4: 18-49.

Guarino H. 2001. Plan Piloto de monitoreo en lechería. Principales enfermedades infecciosas en la cuenca lechera de Florida. *Revista del Plan Agropecuario* 96: 64.

Guindon S., Lethiec F., Duroux P., Gascuel O. 2005. PHYML Online - a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 33: W557–W559.

Haas L., Divers T., Casey J. 1992. Bovine leukemia virus gene expression in vivo. *J Virol* 66: 6223-6225.

ICTVdB Management. 2006. 00.061.1.05. Deltaretrovirus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA.

Inoue, E., Matsumura, K., Maekawa, K., Nagatsuka, K., Nobuta, M., Hirata, M., Minagawa, A., Osawa, Y., Okazaki, K. 2011. Genetic heterogeneity among bovine leukemia viruses in Japan and their relationship to leukemogenicity. *Arch. Virol.* 156(7):1137-41

Islas L.A., Inchaurtieta S.C., Muñoz P.G. 1990. Prevalencia de leucosis enzoótica bovina (LEB) en lecherías de las comunas de San Fernando, Chimbarongo y Placilla. *Monografías de Medicina Veterinaria* 12, 1.

Johnson R, Kaneene JB, Lloyd JW. 1994. Lymphocyte colony formation by aleukemic sheep infected with bovine leukemia virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 17(1):1-13.

Johnston E.R., Albritton L.M., Radke K. 2002. Envelope proteins containing single amino acid substitutions support a structural model of the receptor-binding domain of Bovine Leukemia Virus surface protein. *J Virol* 76: 10861-10872.

Juliarena, MA., Poli, M., Sala, L., Ceriani, C., Gutierrez, S., Dolcini, G., Rodríguez, EM., Mariño, B., Rodríguez-Dubra, C., Esteban, EN. 2008. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Anim Genet.* 39(4):432-8

Keane T.M., Creevey C.J., Pentony M.M., Naughton T.J., McInerney J.O. 2006. Assessment of methods of amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol* 6: 29.

Kettmann R., Burny A., Callenbaut I., Droogmans L., Mammerckx M., Willems I., Portetelle D. 1994. Bovine Leukemia Virus. En: J.A. Levy (ed.) *The Retroviridae*. Plenum Press, New York, N.Y. pp 39-81.

Kobayashi, S., Tsutsui,T., Yamamoto,T., Hayama,Y., Kameyama,K., Konishi,M., Murakami, K. Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. 2010. *BMC Vet Res.* 6: 1

Langley KE, Zabin I.1976. Beta-Galactosidase alpha complementation: properties of the complemented enzyme and mechanism of the complementation reaction. *Biochemistry.* 2;15(22):4866-75.

Leis J., Baltimore D., Bishop J.M., Coffin J., Fleigsner E., Goff S.P., Oroszlan S., Robinson H., Skalka A.M., Temin H.I., Vogt V. 1988. Standardized and simplified nomenclature for proteins common to all retroviruses. *J Virol* 62: 1808-1809.

Llames L., Goyache J., Domenech A., Arjona A., Suarez G., Gomez-Lucia E. 2001. Evaluation of virus excretion by cells persistently infected with the bovine leukaemia virus (BLV) using monoclonal antibodies. *J Clin Virol* 22: 31-39.

Marin C., DeLopez N.M., Alvarez L., Lozano O., Espana W., Castanos H., Leon A. 1978. Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela. *Ann Rech Vet* 9: 743-746.

Melo L.E.H. 1992. Leucose enzoótica dos bovinos. Prevalência da infecção em rebanhos leiteiros criados no agreste meridional do estado de Pernambuco. *Braz J Vet Res Anim Sci* 29: 157-158.

Merezak C., Pierreux C., Adam E., Lemaigre F., Rousseau G.G., Calomme C., Van Lint C., Christophe D., Kerkhofs P., Burny A., Kettmann R., Willems L. 2001. Suboptimal enhancer sequences

are required for efficient bovine leukemia virus propagation in vivo: implications for viral latency. *J Virol* 75: 6977-6988.

Merimi, M., Klener, P., Szynal, M., Cleuter, Y., Kerkhofs, P., Burny, A., Martiat, P. and Van den Broeke, A. 2007. Suppression of viral gene expression in bovine leukemia virus-associated B-cell malignancy: interplay of epigenetic modifications leading to chromatin with a repressive histone code. *J. Virol.*, 81, 5929–5939.

Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 12: 319-325.

Moratorio, G., Obal, G., Dubra, A., Correa A., Bianchi, S., Buschiazzi, A., Cristina, J., Pritsch, O., 2010. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in south america reveals diversification in seven distinct genotypes. *Arch Virol*. 155(4):481-9.

Niermann G.L., Buehring G.C. 1997. Hormone regulation of bovine leukemia virus via the long terminal repeat. *Virol* 239: 249-258.

Nuotio L, Rusanen H, Sihvonen L, Neuvonen E. 2003. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev Vet Med*. 30; 59(1-2):43-9.

OIE. Terrestrial Animal Health Code:

[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/2010/en\\_chapitre\\_1.11.9.htm](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2010/en_chapitre_1.11.9.htm)

Pierard V., Guiguen A., Colin L., Wijmeersch G., Vanhulle C., Van Driessche B., Dekoninck A., Blazkova J., Cardona C., Merimi M., Vierendeel V., Calomme C., Nguyen T., Nuttinck M., Twizere J.C., Kettmann R., Portetelle D., Burny A., Hirsch I., Rohr O., Van Lint C. 2010. DNA cytosine methylation in the Bovine Leukemia Virus promoter is associated with latency in a lymphoma-derived B-cell line. *J Biol Chem* 285: 19434-19449.

Powers MA, Radke K. 1992. Activation of bovine leukemia virus transcription in lymphocytes from infected sheep: rapid transition through early to late gene expression. *J Virol*. 66(8):4769-77.

Rice N.R., Stephens R.M., Burny A., Gilden R.V. 1985. The gag and pol genes of bovine leukemia virus: nucleotide sequence and analysis. *Virol* 142: 357-377.

Rodríguez, S., Florins, A., Gillet, N., De Brogniez, A., Sánchez-Alcaraz, M., Boxus, M., Boulanger, F., Gutiérrez, G., Trono K., Alvarez, I., Vagnoni, L., Willems, L. 2011. Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for HTLV. *Viruses* 3, 1210-1248.

Rovnak J., Casey J. 1999. Assessment of bovine leukemia virus transcripts in vivo. *J Virol* 73: 8890-8897.

Sagata N., Yasunaga T., Ikawa Y. 1985a. Two distinct polypeptides may be translated from a single spliced mRNA of the X genes of human T-cell leukemia and bovine leukemia viruses. *FEBS Lett* 192: 37-42.

Sagata N., Yasunaga T., Tsuzuku-Kawamura J., Ohishi K., Ogawa Y., Ikawa Y. 1985b. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 677-681.

Sambrook, J., Maniatis, T. 1989, *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Sperka T., Miklossy G., Tie Y., Bagossi P., Zahuczky G., Boross P., Matuz K., Harrison R.W., Weber I.T., Tozser J. 2007. Bovine leukemia virus protease: comparison with human T-lymphotropic virus and human immunodeficiency virus protease. *J Gen Virol* 88: 2052-2063.

Tajima S., Aida Y. 2000. The region between amino acids 245 and 265 of the bovine leukemia virus (BLV) Tax protein restricts transactivation not only via the BLV enhancer but also via other retrovirus enhancers. *J Virol* 74: 10939-10949.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res* 22: 4673-4680.

Tiscornia, A.C.; Cayota, A.; Landoni, A.I.; Brito, C.; Oppezzo, P.; Vuillier, F.; Robillo, C.; Digiero, G.; Gabús, R.; Pritsch, O. 2004. Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in chronic lymphocytic leukemia B cells in pro- and antiapoptotic culture conditions. *Leukemia*. 18(1): 48-56.

Trono K.G., Pérez-Filgueira D.M., Duffy S., Borca M.V., Carrillo C. 2001. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol* 83: 235-248.

Van Den Broeke A., Bagnis C., Ciesiolka M., Cleuter Y., Gelderblom H., Kerkhofs P., Griebel P., Mannoni P., Burny A. 1999. In vivo rescue of a silent tax-deficient bovine leukemia virus from a tumor-derived ovine B-cell line by recombination with a retrovirally transduced wild-type tax gene. *J Virol* 73: 1054-1065.

Van der Maaten, M.J.; Miller, J.M. 1975. Replication of bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Bibl. Haematol.* 43: 360-362.

Wang H., Norris K.M., Mansky L.M. 2003. Involvement of the matrix and nucleocapsid domains of the bovine leukemia virus Gag polyprotein precursor in viral RNA packaging. *J Virol* 77: 9431-9438.

Willems L., Chen G., Portetelle D., Mamoun R., Burny A., Kettmann R. 1989. Structural and functional characterization of mutants of the bovine leukemia virus transactivator protein p34. *Virol* 171: 615-618.

Willems L., Heremans H., Chen G., Portetelle D., Billiau A., Burny A., Kettmann R. 1990. Cooperation between bovine leukaemia virus transactivator protein and Ha-ras oncogene product in cellular transformation. *EMBO J* 9: 1577-1581.

Willems L.D., Kettmann R., Burny A. 1991. The amino acid (157-197) peptide segment of bovine leukemia virus p34tax encompass a leucine-rich globally neutral activation domain. *Oncogene* 6: 159-163.

Willems L., Kerkhofs P., Dequiedt F., Portetelle D., Mammerickx M., Burny A., Kettmann R. 1994. Attenuation of bovine leukemia virus by deletion of R3 and G4 open reading frames. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11532-11536.

Willems L., Kerkhofs P., Burny A., Mammerickx M., Kettmann R. 1995. Lack of LTR and ENV genetic variation during bovine leukemia virus-induced leukemogenesis. *Virol* 206: 769-772.

Willems, L., Burny, A., Collete D., Dangoisse, O., Dequiedt, F., Gatot, J.S., Kerkhofs, P., Lefebvre, L., Merezak, C., Peremans, T., Portetelle, D., Twizere, J.C., Kettmann, R. 2000. Genetic determinants of Bovine Leukemia Virus pathogenesis. *Aids research and human retroviruses* 16, 1787-1795

Xiao J., Buehring G.C. 1998. In vivo protein binding and functional analysis of cis-acting elements in the U3 region of the bovine leukemia virus long terminal repeat. *J Virol* 72: 5994-6003.

Zaffaroni R., Piaggio J., Nuñez A., de Freitas J., Suanes A., Cernicchiaro N., Gil A. 2007. Evolución temporal de la seroprevalencia de la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) en la cuenca lechera sur del Uruguay. *V Jornadas técnicas veterinarias*, Montevideo, Uruguay pp 150-151.