

Expresión del gen del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en ratones transgénicos

F.O. CASTRO, A. PÉREZ, A. AGUILAR, G. DE LA RIVA, R. MARTÍNEZ, J. DE LA FUENTE y L. HERRERA

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba.

Recibido en mayo de 1989

Aprobado en mayo de 1989

RESUMEN

La introducción de ADN foráneo en los primeros estadios de desarrollo embrionario del ratón con vistas a obtener animales transgénicos, permite crear nuevos modelos animales para el estudio de enfermedades humanas. Con la finalidad de crear un modelo de portador sano del virus de la hepatitis B (VHB), fueron microinyectados embriones unicelulares murinos con un plasmidio recombinante que contenía el genoma completo del VHB excepto el gen codificante para las proteínas del core viral, bajo el control del promotor propio del VHB.

Se obtuvieron ratones transgénicos que presentaban integración y expresión del material genético viral. La expresión del gen del antígeno de superficie del VHB (HBsAg) fue cuantificada y se confirmó la segregación del transgen a la generación filial F1.

Se concluye que estos ratones transgénicos pueden representar un modelo de portador asintomático de la hepatitis B.

ABSTRACT

The insertion of foreign DNA into early mouse embryos allows the tagging of specific models for human diseases. In an effort to generate a model for the chronic carrier state of the hepatitis B virus (HBV) infection, fertilized one-cell eggs were microinjected with a recombinant plasmid that contains the complete HBV genome except for the core gene, under the control of the normal (HBV) promoter.

Transgenic mice integrated in their chromosomes the desired gene, as demonstrated by Southern and Dot blot hybridization techniques.

Expression of the HBV surface antigen (HBsAg) and segregation of the transgene in the first filial generation (F1) was confirmed.

The HBV transgenic mice may represent a model of the healthy carrier state in HBV infection.

INTRODUCCION

Entre las enfermedades infecciosas de mayor incidencia en Cuba, se encuentra la hepatitis viral del tipo B. El agente causante de esta enfermedad es un virus

circular conformado parcialmente por ADN de doble cadena. Después de la infección de los hepatocitos, la estructura viral es convertida a una molécula circular covalente, la cual es transcrita a dos grandes especies de ARN mensajero de 2,1 y 3,5 kilobases (kb) de talla respectivamente. A partir de estos transcritos son sintetizados las principales proteínas virales (Tiollais *et al.*, 1985).

La infección causada por VHB puede conducir a diferentes cuadros clínicos: hepatitis fulminante, aguda o crónica; carcinoma hepatocelular, cirrosis hepática y portador sano o asintomático de la enfermedad.

Recientemente han sido establecidos modelos que permiten la replicación y expresión del VHB en células transfectadas por ADN viral obtenido por ingeniería genética (Surreau *et al.*, 1986; Sells *et al.*, 1987; Tsurimoto *et al.*, 1987). Estos sistemas posibilitan la profundización en el conocimiento de los aspectos genéticos y moleculares de la replicación del VHB y de la síntesis de las proteínas virales, mas no permiten el estudio en conjunto de la enfermedad o de alguna de sus manifestaciones.

La carencia de modelos animales para el estudio de la infección causada por el VHB ha constituido un escollo para la mejor comprensión de los mecanismos de acción del virus.

En este sentido, varios grupos de investigadores han optado por la estrategia de generar ratones transgénicos portadores del genoma viral completo del VHB (Burk *et al.*, 1988; Araki *et al.*, 1989) o con delecciones que lo hacen no infectivo (Chisari *et al.*, 1985; Babinet *et al.*, 1985).

Los ratones transgénicos portadores del ADN viral introducido, expresan en diferentes órganos y tejidos y con intensidad variable el gen del antígeno de superficie del VHB, sin que se manifiesten síntomas clínicos ni lesiones hepáticas características de la infección causada por dicho virus.

Se han llevado a cabo estudios para comparar el antígeno de superficie expresado en los ratones transgénicos con el antígeno circulante en pacientes infectados, así como en portadores asintomáticos del VHB, sin encontrarse diferencias entre ambos antígenos.

En este trabajo se reporta la obtención y caracterización de ratones transgénicos que expresan el gen del HBsAg.

MATERIALES Y METODOS

Las enzimas de restricción y modificación empleadas, así como los oligonucleótidos sintetizados son un producto de Enzibiot (La Habana, Cuba)

Construcción genética

El plasmidio pUcHBV (figura 1) fue diseñado según se ha descrito (Babinet *et al.*, 1985).

Generación de los animales transgénicos

Varios cientos de copias del plasmidio pUcHBV linelizado mediante digestión con la enzima Hind III fueron microinyectados en embriones unicelulares de ratonas B6D2F1, apareadas con machos OF-1 (Cenpalab, La Habana), acorde con la metodología comúnmente usada (Hogan *et al.*, 1986) con algunas modificaciones (Castro y Aguilar, 1989a y b).

Extracción de ADN de los ratones

El ADN genómico fue extraído a partir de fragmentos de cola (1-2 cm) de los ratones (Hogan *et al.*, 1986).

Integración del ADN microinyectado

Con el objetivo de analizar la presencia e integración del ADN microinyectado en el genoma de los ratones fundadores (Fo) y sus progenies (F1), se utilizaron las técnicas de hibridación por Southern (Southern, 1975); Dot (Kafatos *et al.*, 1979) o la de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1985).

Southern blot: Muestras de 10 μg de ADN de cola de ratón fueron digeridas con la enzima EcoRI y aplicadas a un gel de agarosa al 0,8% en tampón TBE; el tiempo de corrida fue de 2 horas a 80 volts. El ADN digerido fue transferido a filtro de nitro celulosa e hibridado con el fragmento S (678 pares de bases) del genoma del VHB, marcado con alfa dATP³² (300 Ci/mmol, Amershan, UK) por extensión en M 13 (Collins y Hunsaker, 1985).

Dot blot: Muestras de 8 y 10 μg de ADN de cola de ratón fueron aplicadas en membrana de nylon (HybondTM N, Amershan, UK). Como sonda de hibridación se utilizó la misma que se ha descrito para el Southern blot.

PCR: Se amplificó el fragmento comprendido entre los nucleótidos +155 y +256 según Saiki *et al.* (1985). Se empleó 1 μg de ADN genómico, la amplificación se realizó en 25 ciclos, utilizando las condiciones descritas por Estrada *et al.* (1988), con la adición de 50 μCi de alfa dATP³² (Amershan, UK).

Cuantificación de la expresión del gen de HBsAg

La cuantificación de la expresión del gen del HBsAg en el suero de los ratones se llevó a cabo empleando un sistema RIA comercial (AUK-3 Sorin Biomedica, Italia).

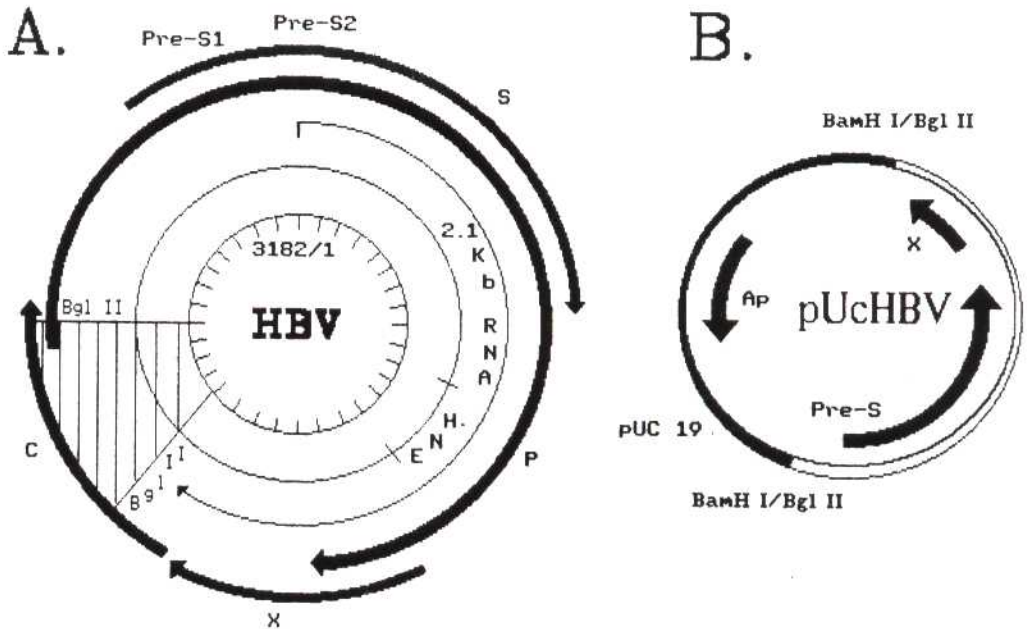


FIG. 1. Mapa del genoma del VHB (1a). El área sombreada corresponde al fragmento Bgl II de 445 pares de bases (pb) que codifica, para el antígeno del core, el cual ha sido escindido; el resto del genoma viral fue insertado en los sitios BamH I/Bgl II del plásmido pUc-19 (1b).

RESULTADOS Y DISCUSION

Un total de 301 embriones fueron microinyectados en varios grupos de experimentos. Doce ratones transgénicos portadores del gen codificante para el HBsAg fueron detectados por *Dot. Southern blot* y/o P.C.R. (figuras 2 y 3). La eficiencia de generación de animales transgénicos con respecto a los embriones microinyectados fue del 4%. Esto coincide con lo reportado por otros autores (Brinster *et al.*, 1985; Hogan *et al.*, 1986; De Pamphillis *et al.*, 1988).

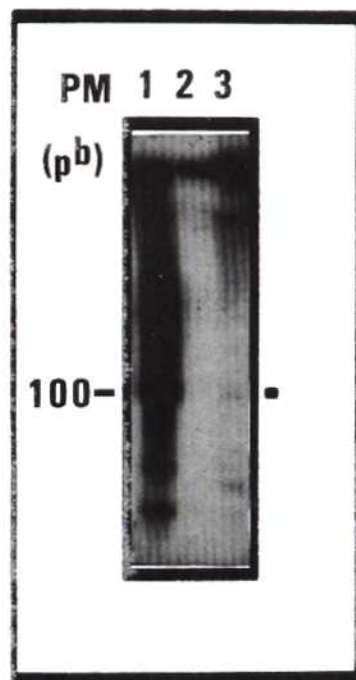
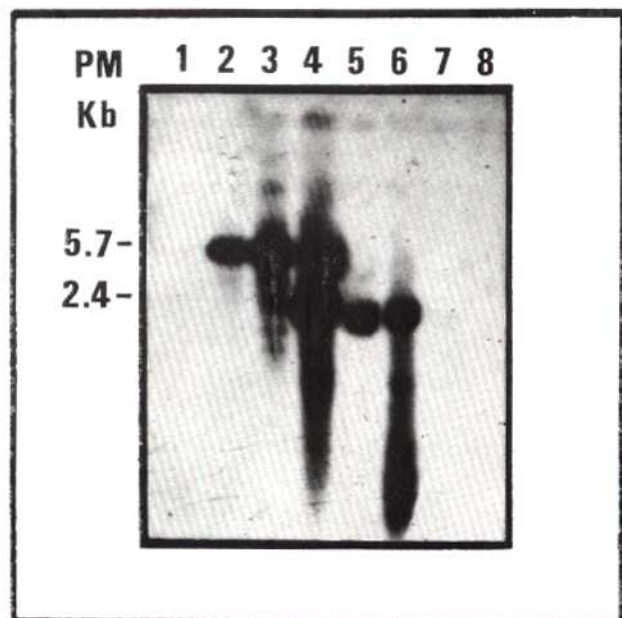


FIG. 2. Análisis por *Southern blot* de la integración de secuencias de VHB en ADN de colas de ratones F0; Línea 1: ADN de ratón (control negativo); Líneas 2 y 3: 0,2 y 1 μ g del plasmidio pUcHBV Hind III correspondiente a 10 y 50 copias por genoma respectivamente. Líneas 4-8: ADN de los ratones FO CB-88, CB-21, CB-45, CB-46 y CB-47 respectivamente. Digestión EcoRI.

FIG. 3. PCR de un fragmento de ADN de 100 pb del ratón transgénico CB-45 (línea 3); la línea 1 corresponde al control de células de CHO transfectadas con el genoma viral (Pérez *et al.*, 1988). Línea 2: control negativo.

El análisis por *Southern* del ADN de los ratones Tg[0HBs]CB-21, Tg[0HBs]CB-45 y Tg[0HBs]CB-88 (en lo adelante CB-21, CB-45 y CB-88 respectivamente), arrojó que la información microinyectada (plasmidio pUcHBV) se encontraba integrada en el genoma celular, pues no se detectó la presencia del plasmidio libre.

Al hibridar los ADN digeridos con EcoRI, con el fragmento S del gen del HBsAg preparado según lo descrito en Materiales y Métodos, aparece una banda de 2,4 kb que coincide con el fragmento EcoRI del plasmidio pUcHBV, portador del gen del HBsAg. En el ratón CB-88 se detectó además de la banda ya descrita, otra de aproximadamente 6 kb que pudiera contener secuencias genómicas del hospedero y que evidencian la integración del plasmidio pUcHBV en dos sitios cromosomales diferentes. Este fenómeno ha sido reportado por otros autores (Lacy *et al.*, 1983; Swift *et al.*, 1984).

El análisis del número de copias por genoma del plasmidio integrado se realizó incluyendo en los *Southern*s, cantidades conocidas del plasmidio pUcHBV equivalentes a 10 y 50 copias por genoma respectivamente. Como se aprecia en la tabla 1, el número de copias de pUcHBV por genoma varió desde 25 copias por genoma haploide (ratón CB-21) hasta 400 copias por genoma haploide en el caso del ratón CB-104.

Varios de los ratones transgénicos fundadores fueron analizados en estudios de cuantificación del HBsAg en el suero (tabla 1), mediante ensayo inmunoradiométrico directo no competitivo de tipo *sandwich*. Los animales CB-21 y CB-104, expresan niveles de trazas (3 ng) y más de 2 000 ng de HBsAg por mililitro de suero respectivamente.

Tabla 1
CUANTIFICACION DE LA EXPRESION DEL GEN DEL HBsAg EN EL SUERO
DE RATONES TRANSGENICOS

Ratón	Copias por genoma haploide*	HBsAg (ng/ml)
Tg[0HBs] CB-21	25	3,0
Tg[0HBs] CB-45	25	0
Tg[0HBs] CB-88	50	ND
Tg[0HBs] CB-104	400	2 000
Tg[0HBs] CB-117	100	0
Tg[0HBs] CB-142	200	0

* El número de copias del gen del HBsAg por genoma haploide se determinó mediante hibridación por *Dot*, empleando como estándar cantidades conocidas del plasmidio pUcHBV. Para la cuantificación de los niveles de HBsAg en el suero de los ratones, se extrajo sangre del plexo retro-orbital, y determinada la presencia de antígeno mediante radioinmunoensayo específico (AUK-3. Sorin, Biomedica. Italia).

ND: no determinado.

Estos resultados coinciden con los reportados por Babinet (Babinet *et al.*, 1985), utilizando una construcción genética similar. Por otra parte Chisari *et al.* (1985), reporta la obtención solo de niveles trazas de HBsAg en el suero de ratones transgénicos. Como posible explicación a tan bajos niveles de expresión del HBsAg, los autores proponen la ausencia de secuencias regulatorias fuertes en ratón, dentro del genoma del VHB.

La obtención de altos niveles de HBsAg en el suero de ratones transgénicos reportada en este y otros trabajos (Babinet *et al.*, 1985), contradicen dicha afirmación.

Para conocer los patrones de transmisión del transgen a las generaciones filiales, se aparearon los animales fundadores F0 que expresaban el gen de HBsAg con contrapartes no transgénicas (ratones de la línea OF-1). En la figura 4 se muestra el análisis por *Dot blot* de la progenie F1 obtenida a partir de la ratona fundadora Tg[0HBs]CB-104. De las cuatro crías obtenidas se comprobó que dos (50 %), habían integrado el gen del HBsAg, lo que evidencia que el nuevo carácter es transmitido de forma mendeliana.

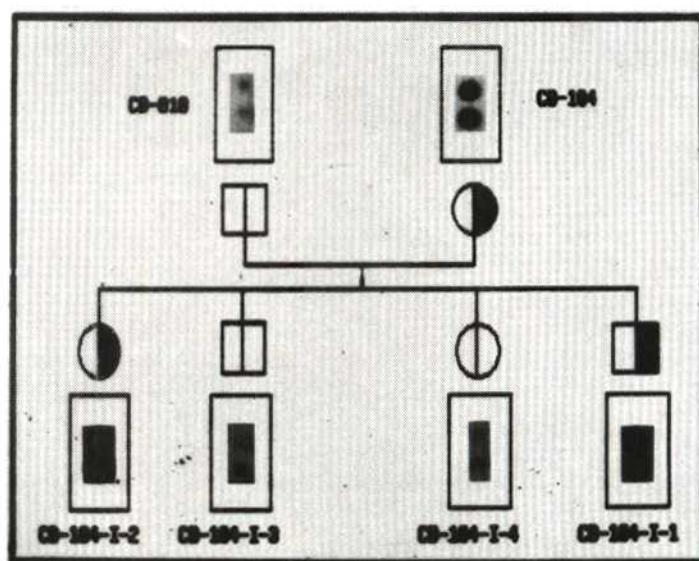


FIG. 4. Diagrama representativo de la transmisión del gen del HBsAg a la primera generación filial F1. Las señales obtenidas en la hibridación por *Dot* corresponden a 8 y 10 µg de ADN respectivamente.

En la actualidad se llevan a cabo estudios de caracterización del HBsAg secretado, así como de especificidad tisular en la expresión del HBsAg, con vistas a evaluar a los ratones transgénicos que expresan dicho gen como modelo de portadores asintomáticos del VHB.

REFERENCIAS

- ARAKI, K.; J.I. MIYAZAKI; O. HINO, N. TOMITA; O. CHISAKA; K. MATSUBARA y K.I. YAMAMURA (1989). *Expression and replication of hepatitis B virus genome in transgenic mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 207-211.
- BABINET, C.; H. FARZA; D. MORELLO; M. HADCHOUEL y C. POURCELL (1985). *Specific expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in transgenic mice*. Science 230: 1157-1160.
- BRINSTER, R.L.; H.Y. CHEN; M.E. TRUMBAUER; M.K. YAGLE y R.D. PALMITER (1985). *Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442.
- BURK, R.D.; J.A. DE LOIA; M.E. ELAWADY y J.D. GEARHART (1988). *Tissue preferential expression of the hepatitis B virus (HBV) surface antigen gene in two lines of HBV transgenic mice*. J. of Virology 62: 649-654.
- CASTRO, F.O. y A. AGUILAR (1989a). *Microinyección y trasplante de embriones unicelulares de ratón. I. Confección de microinstrumentos y obtención de embriones unicelulares*. Interferón y Biotecnología, 6, No. 1: 72-77.
- CASTRO, F.O. y A. AGUILAR (1989b). *Microinyección y trasplante de embriones unicelulares de ratón. II. Microinyección, cultivo y trasplante de los embriones*. Interferón y Biotecnología, 6, No. 2: 186-190.

- COLLINS, M.L. y W.R. HUNSAKER (1985). *Improved hybridization assays employing tailed oligonucleotide probes: A direct comparison with 5' end-labelled oligonucleotide probes and nick-translated plasmid probes*. Anal. Biochem. **151**: 211-224.
- CHISARI, F.V.; C.A. PINKERT; D.R. MILLICH; P. FILIPPI; A. McLAEHLEN; R.D. PALMITER y R.L. BRINSTER (1985). *A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state*. Science **230**: 1157-1160.
- DE PAMPHILIS, M.L.; S.A. HERNAN; E. MARTINEZ-SALAS; L.E. CHALIFOUR; D.O. WIRAK; D.Y. CUPO y M. MIRANDA (1988). *Microinjecting DNA into mouse ova to study DNA replication and gene expression and to produce transgenic animals*. Biotechniques **6**: 662-680.
- ESTRADA, M.P.; O. HERNANDEZ y J. DE LA FUENTE (1988). *Expresión directa de la hormona de crecimiento humana madura en Escherichia coli*. Interferón y Biotecnología, **5**, No. 2: 152-156.
- HOGAN, B.; F. CONSTANTINI y E. LACY (1986). *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.
- KAFATOS, F.C.; W.C. JONES y A. EFSTRATIADIS (1979). *Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure*. Nucleic Acid Res. **7**: 1541-1552.
- LACY, E.; S. ROBERTS; E.P. EVANS; M.D. BURTENSHAW y F. CONSTANTINI (1983). *A foreign betaglobin gene in transgenic mice: Integration at abnormal chromosomal positions and expression in inappropriate tissues*. Cell **34**: 343-358.
- PEREZ, A.; R. RODRIGUEZ; R. LEONARD; I. GUILLEN; L. HERNANDEZ; E. HERNANDEZ; C. SANTIZO; J. DE LA FUENTE y L. HERRERA (1988). *Síntesis y secreción del antígeno de superficie de la hepatitis B en células de mamíferos*. Interferón y Biotecnología, **5**, No. 3: 223-229.
- SAIKI, R.; S. SCHAT; F. FALOONA; K. MULLINS; G. HORN y H. ERLICH (1985). *Sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science **239**: 1350-1354.
- SELLS, M.A.; M.L. CHEN y G. ACS (1987). *Production of Hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 1005-1009.
- SOUTHERN, E. (1975). *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J. Mol. Biol. **98**: 503-517.
- SUREAU, C.; J.L. ROMET-LEMONNE; J.I. MULLINS y M. ESSEX (1986). *Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA*. Cell **47**: 37-47.
- SWIFT, G.H.; R.E. HAMMER; R.J. MacDONALD y R.L. BRINSTER (1984). *Tissue-specific expression of the rat pancreatic elastase I gene in transgenic mice*. Cell **38**: 639-646.
- TIOLLAIS, P.; C. POURCELL y A. DEJEAN (1985). *The hepatitis B virus*. Nature (London) **317**: 489-495.
- TSURIMOTO, T.; A. FUJIYAMA y K. MATSUBARA (1988). *Stable expression and replication of hepatitis B genome in a human cell line transfected with cloned viral DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 444-448.