

## Caracterización ultraestructural del reconocimiento específico de un anticuerpo monoclonal anti P24 del VIH-1 en células H9 y *E. coli*

L. LESCAILLE,<sup>1</sup> C. SANTIZO,<sup>2</sup> S. GARZÓN<sup>3</sup> y M. ZOLLINGER<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN), Apartado 6048, La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, La Habana, Cuba

<sup>3</sup> Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Montreal, Québec, Canadá, H3C 3J7.

<sup>4</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Montreal, Québec, Canadá, H3C 3J7.

*Recibido en junio de 1990*

*Aprobado en octubre de 1990*

### RESUMEN

Se realiza la caracterización del reconocimiento específico de un anticuerpo monoclonal contra la proteína P24 del VIH-1 mediante la combinación de métodos inmunológicos y ultraestructurales a través de la inmunomicroscopía electrónica de transmisión con el uso de oro coloidal como marcador en secciones ultrafinas de linfocitos de la línea celular H9 y células de *E. coli* transformadas para la expresión de las proteínas P24, GP41, GP160 y GP36. Se utilizó para el marcaje post-inclusión una sonda de IgG de cabra antiratón-oro (8 nm). Los resultados demostraron la especificidad del anticuerpo monoclonal utilizado para la proteína P24 en ambos tipos de células, así como la posibilidad de utilizar estos sustratos antigénicos con vistas a la evaluación de otros anticuerpos monoclonales y policlonales relacionados al VIH.

### SUMMARY

We carried out the characterization of the specific recognition of a monoclonal antibody against HIV-1 P24 protein by means of immunological and ultrastructural methods making use of transmission immunoelectron microscopy in ultra-thin sections using colloidal gold as a marker in ultrathin sections of lymphocytes from H9 cell line infected with HIV-1 and *E. coli* cells transformed for the expression of

P24, GP41, GP160 and GP36 proteins. Was used a goat anti mouse IgG-gold probe (8nm) for post-embedding immunogold labelling. The results showed the specificity of the monoclonal antibody for HIV-1 P24 protein in both kinds of cells, and the possibility of the use of those antigenic substrates for the evaluation of other polyclonal and monoclonal antibodies related to the HIV.

### INTRODUCCION

Los estudios morfológicos mediante microscopía electrónica del virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (VIH), muestran que dicho virus consiste, fundamentalmente, en una envoltura, un "núcleo" central rodeado por una membrana y un nucleoide excéntrico electrón denso.

Las estructuras virales han sido observadas de diferentes maneras, en dependencia del estado de maduración del virus y del plano de seccionamiento obtenido.

La formación de las partículas virales se produce en la membrana plasmática de la célula infectada, encontrándose gran número de partículas asociadas a la superficie celular, las cuales no presentan una morfología definida hasta el momento mismo del ensamblaje de todos sus componentes estructurales a nivel de la membrana celular en forma de "brotes", que resultan fácilmente accesibles a los anticuerpos marcadores. Las partículas maduras son usualmente redondeadas con un diámetro que oscila entre 85 y 110 nm.

Los antígenos mayores del virus (VIH-1) consisten en una glicoproteína de la envoltura externa (GP41), una proteína de la pared del "núcleo" (P24) y la enzima reverso transcriptasa (Schupbach *et al.*, 1984).

Para la identificación de estos antígenos a nivel celular se han utilizado diferentes técnicas tales como la inmunofluorescencia (Lapointe *et al.*, 1985; Pekovick *et al.*, 1986a), inmunomicroscopia electrónica con el uso de peroxidasa y ferritina como marcadores (Palmer *et al.*, 1985; Hausmann *et al.*, 1987) y más recientemente mediante el inmunomarcaje con sondas de oro coloidal en células de sangre periférica de individuos asintomáticos, procesadas para microscopia de barrido de alta resolución (STEM) (Herrera, M.I.)\* y en secciones ultrafinas de linfocitos H9 infectados con el VIH (Gelderblom *et al.*, 1987; Nakai *et al.*, 1989; Palmer *et al.*, 1989). Este procedimiento permite, no sólo la localización de los antígenos del virus, sino la caracterización de la especificidad de los anticuerpos primarios, tanto monoclonales como policlonales, utilizados en la inmunomarcaje.

En este sentido, el objetivo fundamental de nuestro trabajo es la caracterización inmunomorfológica y ultraestructural de la especificidad de un anticuerpo monoclonal anti P24 del VIH-1, obtenido en el CIGB, a través de la inmunolocalización del antígeno correspondiente en células H9 infectadas con el virus y las células de *E. coli* transformadas para la expresión de la proteína P24 del VIH-1, mediante inmunomicroscopia electrónica con el uso de una sonda de IgG de cabra anti ratón-oro (8 nm).

## MATERIALES Y METODOS

### Células

Como sustratos antigénicos se utilizaron linfocitos de la línea celular H9 no infectados e infectados con el VIH-1 y células de *E. coli* transformadas para la expresión de las proteínas recombinantes P24, GP41, GP160 del VIH-1 y GP36 del VIH-2.

Las células H9 (Popovic *et al.*, 1984) fueron fijadas en glutaraldehído al 1% en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7,4 y posteriormente deshidratadas en una serie de alcoholes. Dichas células fueron incluidas en Araldita 502 (Pekovic *et al.*, 1986b). Secciones finas (600-800 Å) fueron montadas en rejillas de níquel de 400 mesh.

Las células de *E. coli*, cepa HB101 clonadas para la expresión de proteínas recombinantes GP160 y P24 y la cepa W3110 para la GP41 y la GP36, fueron fijadas en una mezcla de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,5% en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4. Posteriormente las muestras fueron lavadas y embebidas en agarosa al 10% a 35°C. Las etapas de deshidratación, inclusión en Lowicryl K4M y la polimerización de los bloques a -30°C fueron realizadas según el procedimiento descrito por Carlemaln *et al.*, 1982. Secciones de 150-200 Å obtenidas en ultramicrotomo LKB-NOVA fueron montadas en rejillas de níquel recubiertas con una membrana de formvar-carbón.

\* Dato no publicado

### Anticuerpo monoclonal (AcM)

El AcM de tipo IgG1 específico contra el antígeno P24 del HTLV-III B/LAV-I procede del hibridoma 626/2 obtenido en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, mediante la fusión de esplenocitos de ratones inmunizados con el antígeno recombinante y el mieloma SP/0/Ag14. La especificidad del AcM por la P24 fue confirmada por las técnicas de ELISA, inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Western blot (Duarte *et al.*, 1990).

Para la evaluación de la afinidad del monoclonal empleado se utilizó como referencia el AcM producido por M. Popovic, en el NIH, Bethesda, M.D., E.U.A.

### Sonda de IgG cabra anti-ratón-oro coloidal

El coloide de oro monodisperso de 8 nm de diámetro se obtuvo con la introducción de algunas variantes al método de Frens, 1973 (Pierre Chanest, dato no publicado), el cual utiliza como agente reductor el citrato trisódico al 1%. El pH de la solución de oro fue ajustado a 9 con carbonato de potasio 0,2 M. La inmunoglobulina de cabra anti-ratón (H and L, purificada por Jackson Immunoresearch Lab.) a una concentración de 2 mg/ml fue dializada contra tampón bórax 2 mM, pH 9 durante 4 horas. Posibles agregados fueron eliminados mediante centrifugación a 35 000 rpm (100 000 g) durante 1 hora a 4°C en una centrífuga Beckman 40B, rotor 35K.

El número de oro determinado (Horisberger *et al.*, 1975) para la proteína fue de 0,14 mg de IgG cabra anti-ratón/10 ml de oro (8 nm). El acoplamiento de la IgG al oro y la posterior purificación de la sonda, se realizó acorde con el procedimiento descrito por Roth (1983).

Finalmente para garantizar la homogeneidad del tamaño de partículas (8 nm) del conjugado, este fue centrifugado en un gradiente continuo de glicerol (10-30%) en tampón Tris salino (TBS) 20 mM pH 8,2 y azida sódico 0,02%, durante 30 minutos a 20 000 rpm y a 4°C en una centrífuga Beckman, rotor SW41-T1. Se colectó la banda más oscura del gradiente, correspondiente al conjugado de mayor homogeneidad, almacenándose a 4°C hasta su uso.

### Marcaje inmunocitoquímico

El procedimiento para el marcaje inmunocitoquímico post-inclusión de las secciones de células H9 y células de *E. coli*, se realizó acorde a Garzón *et al.*, 1982 y Bendayan, 1984.

Las rejillas fueron colocadas sobre gotas de tampón Tris salino 0,05 M, pH 8 conteniendo Tween 20 al 0,05%, durante 5 minutos. Posteriormente fueron transferidas a gotas (20 µl) del anticuerpo monoclonal diluido 1/100 (0,01 mg/ml) en TBS-Tween 20 e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados en TBS-Tween 20 durante 5 minutos cada uno y después fueron incubadas en gotas (20 µl) del conjugado IgG cabra anti-ratón-oro coloidal. A continuación fueron lavadas tres veces en TBS durante 5 minutos cada vez y posteriormente, con un lavado abundante de TBS y agua bidestilada. Para la tinción se utilizó acetato de uranilo al 50% en etanol.

Las secciones fueron examinadas en un microscopio Phillips EM 300 a una aceleración de voltaje de 80 kV.

La especificidad del marcaje fue demostrada mediante controles tales como la incubación directa del conjugado con las células, así como la incubación sucesiva de células H9 no infectadas y células de *E. coli* no transformadas con el anticuerpo monoclonal y el conjugado.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El anticuerpo monoclonal anti P24 del VIH-1 mostró un marcaje intenso con oro sobre las partículas virales localizadas en la superficie de las células H9 infectadas (figura 1). No se observó marcaje en el espacio intracelular, lo cual indica la ausencia de inclusiones citoplasmáticas o precursores de nucleocápsidas acorde a lo planteado por otros investigadores (Palmer, 1985; Nakai, 1989).

Algunas partículas virales no fueron marcadas, probablemente a causa de que en el método de marcaje inmunocitoquímico post-inclusión, solo los antígenos expuestos a la superficie de la sección pueden reaccionar con el anticuerpo.

Se observó que la mayor cantidad de partículas de oro se localizan en el interior de las estructuras virales recién formadas, y partículas nacientes o en proceso de formación, a partir de la membrana



FIG. 1. Sección ultrafina de célula H9 infectada con el VIH-1, incubada previamente con el anticuerpo monoclonal anti-P24 y *a posteriori* con el conjugado IgG cabra anti-ratón-oro coloidal (8 nm). Se observan estructuras virales extracelulares específicamente marcadas con partículas de oro coloidal. (Magnificación: 60 000 X).

plasmática, así como la ausencia de marcaje sobre la membrana celular (figura 2 y figura 2a). Esto tiene su explicación en el hecho de que el transporte del antígeno viral que se produce por debajo de la membrana plasmática y el "brote" de las partículas virales parece ocurrir inmediatamente posterior a la síntesis del antígeno viral (Pekovic, 1986b).

Las células de *E. coli* clonadas para la expresión de la proteína P24 mostraron un marcaje muy intenso (figura 3), observándose la ausencia de partículas de oro en las células transformadas para la expresión de las proteínas GP41 (figura 4), GP36 (figura 5) y GP160.

Todos los controles realizados demostraron la especificidad del conjugado.

Teniendo en cuenta las características del marcaje observado, tanto en las células H9 infectadas como en las células de *E. coli* genéticamente transformadas para la expresión de la proteína P24, queda demostrada a nivel ultraestructural la capacidad de reconocimiento específico del anticuerpo monoclonal empleado, lo que se corresponde con los resultados obtenidos al evaluar dicho anticuerpo mediante los métodos de ELISA, IFI y Western blot (Duarte *et al.*, 1990).

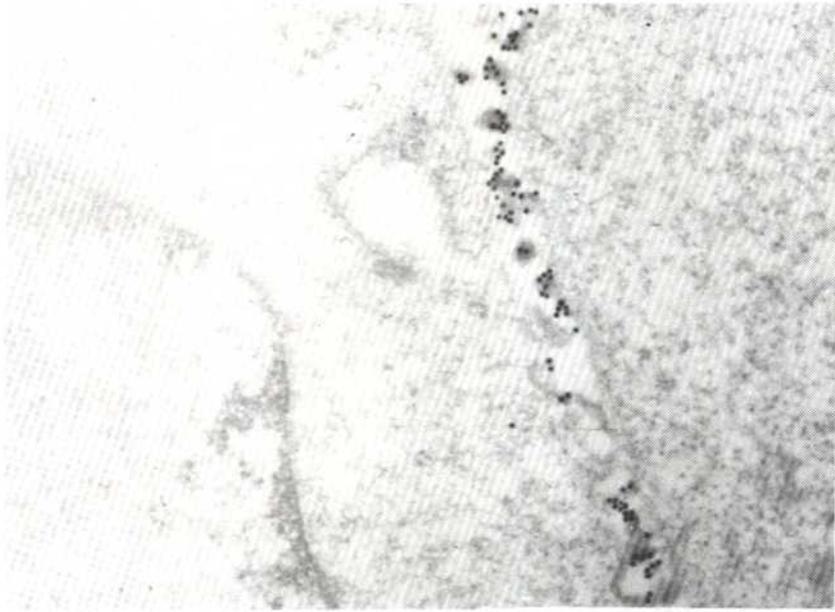


FIG. 2. Microfotografía detallada de sección ultrafina de célula H9 infectada con el VIH-1, que destaca un intenso marcaje específico de partículas de oro coloidal en el interior de las estructuras virales y completa ausencia del marcador en el interior celular o en la membrana de estas. (Magnificación: 70 000 X.)

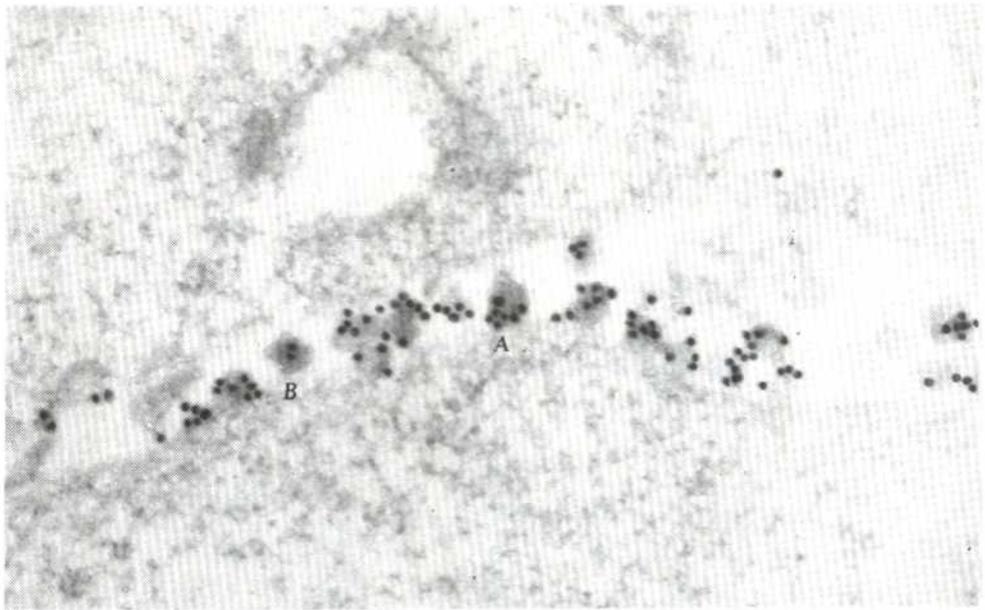


FIG. 2a. Microfotografía electrónica de la misma sección ultrafina de célula H9 infectada donde se aprecian diferentes estadios del brote de estructuras virales, a partir de la membrana celular A): acumulación del antígeno viral en la etapa temprana del brote; B): partícula viral típica brotando de la membrana plasmática. (Magnificación: 70 000 X.)



FIG. 3. Microfotografía electrónica de células de *E. coli* transformadas para la expresión de proteína recombinante P-24 del VIH-1. Se observa un marcaje intenso en el interior celular posterior a las etapas de incubación de las secciones ultrafinas con el anticuerpo monoclonal anti-P24 y el conjugado IgG cabra anti-ratón-oro. (Magnificación: 30 000 X.)

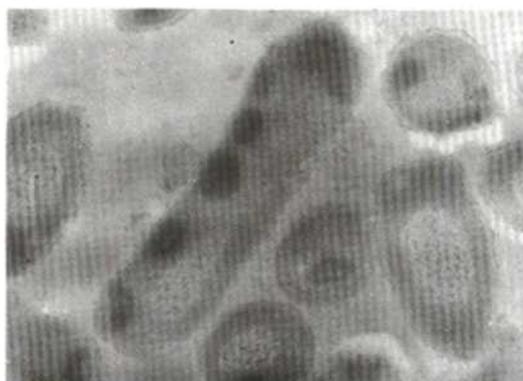


FIG. 4. Sección ultratina de células de *E. coli* transformada para la expresión de proteína recombinante GP-41 del VIH-1. Se observa la ausencia total de marcaje posterior a la incubación de las muestras con el anticuerpo monoclonal anti-P24 y el conjugado de IgG cabra anti-ratón-oro. (Magnificación: 30 000 X.)

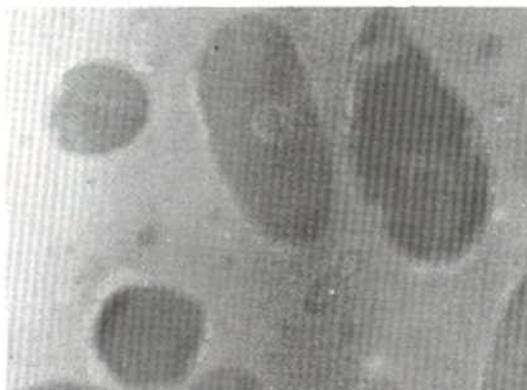


FIG. 5. Sección ultrafina de células *E. coli* transformadas para la expresión de proteína recombinante GP36 del VIH-2. En este caso también se observó la ausencia total de marcaje posterior a la incubación de las muestras con el anticuerpo monoclonal anti-P24 y el conjugado IgG cabra anti-ratón-oro. (Magnificación: 30 000 X.)

La utilización de la técnica de inmunomarcaje con oro coloidal sobre los tipos celulares estudiados, demostró ser un procedimiento adecuado, tanto para la localización del antígeno viral en ambos tipos celulares, como para la caracterización de la especificidad del anticuerpo monoclonal utilizado. Estos resultados están en correspondencia con estudios similares realizados por Pekovic *et al.*, 1986b, en células H9 infectadas con el VIH-1.

## REFERENCIAS

- BENDAYAN, M. (1984). Protein-gold electron microscopic immunocytochemistry methods, applications and limitations. *J. Electr. Microsc. Tech.* 1: 243-270.
- CARLEMALN, E.; R. M. GARAVITO y W. VILLIGER (1982). Resin development for electron microscopy and on analysis of embedding at low temperature. *J. Microsc.* 126: 123-143.
- DUARTE, C. A.; A. CAMPOS; E. CARPIO; T. DIAZ; E. DE LA GUARDIA, L. MOREJON; L. JONDAL y J. GAVILONDO (1990). Anticuerpos monoclonales de ratón contra la proteína gag 24 del Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo I (VIH-1). *Biotecnología Aplicada* 7(1): 94-100.
- FRENS, G. (1973). Controlled nucleation for the regulation of particle size in monodisperse gold suspension. *Nature Phys. Sci.* 241: 20-22.
- GARZON, S.; M. BENDAYAN y E. KURSTAK (1982). Ultrastructural localization of viral antigens using protein A-gold technique. *J. Virol. Meth.* 5: 67-73.
- GELDERBLOM, H. R.; E. H. S. HAUSMANN; M. OZEL; G. PAULI y M. A. KOCH (1987). Fine structure of Human Immunodeficiency Virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156: 171-176.
- HAUSMANN, E.; H. R. GELDERBLOM; P. R. CLAPHAM; G. PAULI y R. A. WEISS (1987) Detection of HIV envelope specific antibodies by immunoelectron microscopy correlation with antibody titer and virus neutralizing activity. *J. of Virol. Meth.* 16: 125-137.
- HERRERA, M.; I. SANTA-MARIA y R. NAJERA (1989). "Mapeo de antígenos por inmunomicroscopia electrónica SEM. STEM: Estudios sobre el virus de la inmunodeficiencia humana". *Resúmenes. III Seminario Cubano sobre Interferon y II Seminario Cubano sobre Biotecnología*, La Habana, Cuba.
- HORISBERGER, M.; J. ROSSET and H. BAUER (1975). Colloidal gold granules as markers for cell surface receptors in scanning electron microscopy. *Experientia* 31: 1147-1149.
- LAPOINTE, N.; J. MICHAUD y D. D. PEKOVIC (1985). Transplacental transmission of HTLV-III virus. *N. Engl. J. Med.* 312: 1325-1326.
- NAKAI, M.; T. GOTO y S. IMURA (1989). Ultrastructural features of the AIDS virus (HIV) and its morphogenesis. *J. of Elec. Microsc. Tech.* 12: 95-100.
- PALMER, E.; C. SPORBORG; A. HARRISON; M. L. MARTIN y P. FEORINO (1985). Morphology and immunoelectron microscopy of AIDS virus. *Arch. of Virol.* 85: 189-196.
- PEKOVIC, D. D.; J. P. CHAUSSEAU; N. LAPOINTE; J. MICHAUD; S. GARZON; H. STRYKOWSKI; T. TSOUKAS; N. GILMORE; H. GOLDMAN; M. GORNITSKY; M. POPOVIC y J. M. DUPUY (1986a). Detection of HTLV-III/LAV antigens in peripheral blood lymphocytes from patients with AIDS. *Arch. Virol.* 91: 11-19.
- PEKOVIC, D. D.; S. GARZON; H. STRYKOWSKI; D. AJDUKOVIC; M. GORNITSKY y J. M. DUPUY (1986b). Immunogold labelling of HTLV-III/LAV in H9 cells studied by transmission electron microscopy. *J. of Virol. Meth.* 13: 265-269.
- PEKOVIC, D. D.; S. GARZON; H. STRYKOWSKI; N. LAPOINTE y D. AJDUKOVIC (1989). "Identification of phenotypic ultrastructure of lymphocytes reacting with autoantibodies in AIDS". *Abstracts. V International Conference on AIDS* 1: 607. Ed. International Development Research Center, Montreal, Québec, Canada.
- POPOVIC, M.; M. G. SARANGADHARAN y E. READ (1984). Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224: 797-800.
- ROTH, J. (1983). Immunoglobulin-gold complexes. *The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry*. In: *Immunocytochemistry* 2: 230-231. Eds. Bullock and Petrusz, Academ. Press, London.
- SCHUPBACH, J.; M. POPOVIC; R. V. GILDEN; M. A. GOUDA; M. G. SARANGADHARAN y R. C. GALLO (1984). Serological analysis of a subgroup of Human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science* 224: 503-505.