

2010 Diciembre, 2(2): 1-2

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE UN SISTEMA BI-VECTORIAL BIDIRECCIONAL REGULABLE TET-OFF PARA EL GEN SINTÉTICO DEL PÉPTIDO TÍMICO TIMULINA Y EL GEN REPORTERO DE LA GFP

Poch B^{*3}, Costa M^{*3}, Rimoldi O^{2,3}, Goya RG³, Reggiani PC^{1,3}

⁽¹⁾ Cátedra B de Citología, Histología y Embriología. ⁽²⁾ Cátedra de Genética. ⁽³⁾ Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP). Facultad de Ciencias Médicas – UNLP. *Igual colaboración

e-mail: paulareggiani@yahoo.com.ar; preggiani@fcm.uncu.edu.ar

Introducción

La timulina es una hormona tímica involucrada en diversos aspectos de la diferenciación intra- y extratímica de las células T. Esta hormona, que consiste en un nonapéptido (FTS) coordinado al ión Zn²⁺ (FTS-Zn) en una relación equimolecular, posee una acción inmunomoduladora, actividad hipofisotrófica y actividad antiinflamatoria y analgésica en el sistema nervioso central. Además, se ha demostrado que es clave en la acción del timo sobre el eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. En estudios previos hemos implementado terapia génica neuroendocrina para timulina utilizando nuestro vector adenoviral recombinante (RAd) que expresa constitutivamente un gen sintético para un análogo de timulina (el decapeptido metFTS). El control de la expresión de transgenes en células de mamíferos es deseable para el estudio de la función de los genes y para la terapia génica. La utilización de sistemas regulables de expresión génica permitiría la manipulación de la expresión de la timulina.

Objetivo

1- Disponer de un sistema adenovectorial más flexible y sofisticado. Para ello nos propusimos construir un sistema bi-vectorial bidireccional regulable por tetraciclina (Tet-Off) que exprese simultáneamente los genes de la green fluorescent protein (GFP, proteína reportera) y el metFTS. 2- Caracterizar *in vitro* e *in vivo* el sistema generado.

Materiales y métodos

Los vectores adenovirales bidireccionales regulables se construyeron por el método de los dos plásmidos empleando el kit plasmídico AdMax® (Microbix). Partimos de dos plásmidos comerciales, el pBI(MCS-TRE-MCS) y el pTet-Off (Clontech). En el pBI clonamos los genes para la GFP y el metFTS, obteniendo así el vector de expresión bidireccional regulable pBI-(GFP-TRE-FTS). Subsecuentemente escindimos de este plásmido el cassette bidireccional GFP-TRE-FTS y lo clonamos en el shuttle pDC516_{s/pr}. Paralelamente, escindimos del pTet-Off el cassette de expresión para la proteína regulatoria tTA y lo clonamos en el shuttle pDC515. Los shuttles, pDC516-(GFP-TRE-FTS) y pDC515-tTA, se emplearon para generar los dos vectores adenovirales recombinantes: 1) el RAd-(GFP-TRE-FTS)_{bidir}, que es la unidad de respuesta, en la cual la transcripción de los transgenes se encuentra bajo el control de un promotor inducible por DOX, y 2) el RAd-tTA que es la unidad transactivadora. Cuando una célula es co-transducida por ambos vectores la proteína regulatoria tTA, expresada por el RAd-tTA, se une al promotor bidireccional regulable (PCMV_{min}-TRE-PCMV_{min}) del segundo vector y así activa la expresión de los transgenes. Si el antibiótico doxiciclina (DOX) es agregado al sistema, este se une en un sitio alostérico de la proteína tTA y causa su disociación del promotor regulable resultando en la inhibición de la transcripción de los transgenes.

Resultados

Las células CHO incubadas con ambos RAds (10⁻⁷ pfu/ml), en ausencia de DOX (Clontech) durante 48hs, mostraron una eficiente expresión de GFP (evidenciada por la fluorescencia) y de metFTS (50.000 fg/ml), respecto del control (32 fg/ml, dosado en sobrenadantes por bioensayo). La expresión de ambos genes pudo inhibirse por el agregado de DOX (1 ug/ml) al medio de cultivo. En un estudio *in vivo*, inyectamos im. ratas machos con ambos RAds (10⁻⁹ pfu/rata c/u, N=5) y con solo el RAd-(GFP-TRE-FTS)_{bidir} (control, N=5). Se dosó timulina sérica en los días experimentales: -2, 5, 10, 15, 20 y 25. En los días 15 y 20 se les adicionó DOX (1 ug/ml) y DOX más dexametasona (15 mg/l) en al agua de bebida, respectivamente. Inicialmente, los niveles de timulina sérica subieron (384±74fg/ml), con DOX desapareció la timulina recombinante (102±16fg/ml) y con el corticoide la endógena (18±4fg/ml). En otro

2010 Diciembre, 2(2): 2-2

estudio, inyectamos icv. ratas machos con ambos RAd (10^{-10} pfu/rata c/u, N=4) o con solo el RAd-(GFPtreFTS)_{bd} (control, N=4). Después de 72hs subieron los niveles de timulina en el LCR (24 ± 4.6 fg/ml) de los animales que recibieron ambos RAd respecto de sus contrapartes (4 ± 0.3 fg/ml).

Conclusiones

El sistema bi-vectorial bidireccional regulable Tet-Off construido mostró ser activo en músculo y cerebro. La utilización del gen de la GFP en nuestro sistema bidireccional regulable servirá para comprobar en forma sencilla y rápida la transcripción del gen de la timulina. La disponibilidad de este sistema regulable de expresión de timulina permitirá determinar cuales son las ventanas críticas en las que actúa la timulina sobre la maduración del sistema neuroendócrino durante la vida postnatal en roedores. Asimismo, dicho sistema podría constituir una herramienta terapéutica efectiva para el abordaje de déficits reproductivos asociados con disfunciones endocrinas del timo y, también, en casos donde la inflamación juegue un rol importante.