

## EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DEL CANDIDATO VACUNAL GPI4 DE *BABESIA BOVIS* EN EL CILIADO *TETRAHYMENA THERMOPHILA*

Montes MG<sup>1,2</sup>, Flores D<sup>2</sup>, Rodriguez AE<sup>2</sup>, González Maglio DH<sup>3</sup>, Florin-Christensen M<sup>2</sup>, Nusblat AD<sup>1</sup>, Schnittger L<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Nanobiotecnología, FFyB-UBA, Buenos Aires, Argentina, <sup>2</sup>Instituto de Patobiología, CICVyA, INTA-Castelar, Provincia de Buenos Aires, Argentina, <sup>3</sup>CONICET - Universidad de Buenos Aires, Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), Buenos Aires, Argentina; \*autor de correspondencia: schnittger.leonhard@inta.gob.ar

Los glicosilfosfatidilinositoles (GPIs) se encuentran en abundancia en la superficie de protozoos parásitos como glicolípidos libres y como anclas de proteínas de superficie a la membrana plasmática. Se ha demostrado que las proteínas ancladas por GPIs están involucradas en el mecanismo de invasión a la célula huésped, por lo que representan blancos moleculares muy interesantes para el diseño de nuevas estrategias vacunales contra protozoos patógenos de importancia veterinaria. Además, los GPIs libres actúan como potentes moduladores de la respuesta inmunológica. *Tetrahymena thermophila* es un protozoo ciliado de vida libre que expresa en la superficie abundantes proteínas ancladas por GPI, y ha sido utilizado como plataforma biotecnológica para la expresión de antígenos recombinantes. En el presente trabajo, se ha expresado en *T. thermophila* un novedoso antígeno anclado por GPI (GPI4) del protozoo hemoparásito *Babesia bovis* para el diseño de vacunas a subunidades. GPI4 presenta epitopes B sensibles a la neutralización conservados entre aislamientos geográficos y es reconocido por anticuerpos presentes en sueros de bovinos infectados con *B. bovis*. La secuencia nucleotídica de GPI4 fue optimizada según la frecuencia de uso de codones de *T. thermophila* y clonada en el vector pICY-gtw bajo el promotor del gen de la metalotioneína 1 (*mtt1*) inducible por cadmio. Se estudió la localización del antígeno recombinante expresado en *T. thermophila* mediante inmunofluorescencia indirecta e inmunoblots de fracciones subcelulares utilizando anticuerpos murinos contra una forma recombinante de GPI4 expresada en *E. coli*. Por inmunofluorescencia indirecta se observó señal tanto en la superficie como en el retículo endoplásmico de los ciliados. En concordancia con estos resultados, los inmunoblots mostraron presencia de GPI4 en la fracción de membranas obtenida por partición con Tritón X-114 y en la fracción ciliar luego de separar los cilios del cuerpo celular. Estos resultados demuestran la habilidad de *T. thermophila* de expresar en forma heteróloga el antígeno GPI4 de *B. bovis* en su superficie celular. Se están llevando a cabo experimentos adicionales para evaluar si GPI4 expresado en *T. thermophila* tiene propiedades inmunogénicas adecuadas para ser incorporado en futuras formulaciones vacunales contra la babesiosis bovina.

Financiamiento por INTA PNBIO1131034 y PICT 2013-1708.