



De Ganzó, Agustín Francisco

Desarrollo de una plataforma de presentación y vehiculización de antígenos basada en VLPs derivadas del virus Junín



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

De Ganzó, A. F. (2018). *Desarrollo de una plataforma de presentación y vehiculización de antígenos basada en VLPs derivadas del virus Junín. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina : Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/869>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Desarrollo de una plataforma de presentación y vehiculización de antígenos basada en VLPs derivadas del virus Junín

TESIS DOCTORAL

Agustín Francisco De Ganzó

agustindeganzo@gmail.com

Resumen

Las vacunas más exitosas utilizadas en la actualidad han sido desarrolladas utilizando métodos convencionales que siguen el paradigma establecido por Pasteur hace más de un siglo, de "aislar, inactivar e inyectar" el microorganismo causante de la enfermedad y, de esta forma, imitar una infección natural. Con la llegada de la metagenómica, la selección de antígenos basada en la información genómica ha desempeñado un papel importante en el descubrimiento de nuevos inmunógenos para el diseño de vacunas. Un enfoque que ha utilizado esta estrategia ha sido denominado "vacunología inversa" y ha permitido el escrutinio del repertorio antigénico potencial de un organismo a través de su genoma, gracias a herramientas bioinformáticas predictivas. Mediante métodos *in vitro* de clonado molecular, las proteínas seleccionadas como antígenos son producidas a mediana escala y evaluadas en modelos animales para ensayar su capacidad de generar una respuesta inmune protectora. El objetivo principal es evaluar la capacidad de la respuesta inmune de eliminar o neutralizar al patógeno al momento de la infección. Cuanto más neutralizante es la respuesta inmune ante un antígeno específico, mayor potencial tendrá el mismo como vacuna. En este trabajo doctoral se aplicaron herramientas de vacunología inversa al diseño y desarrollo de una plataforma genérica (pResAg) de vehiculización de antígenos virales en forma de partículas similares a virus (VLPs, virus-like particles) utilizando los elementos genómicos mínimos del virus Junín (JUNV), el agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina. En una primera aproximación y con el fin de caracterizar el modelo a utilizar, se evaluó la respuesta inmune celular inducida por VLPs generadas por la actividad de la proteína Z de JUNV, la proteína directora de la brotación viral hacia el final del ciclo infectivo y protagonista de la plataforma diseñada en este trabajo doctoral. Además, con el fin de analizar la capacidad de pResAg de vehiculizar antígenos en las VLPs generadas por la actividad de Z, se seleccionaron proteínas de los virus del sarampión y de la encefalitis de Saint Louis a partir de sus características inmunogénicas. Finalmente, fue posible detectar la correcta expresión de estas proteínas de forma individual en pResAg, evidenciando que la plataforma posee un gran potencial como candidato vacunal una vez evaluada la respuesta inmune generada *in vivo*.

Desarrollo de una plataforma de presentación y vehiculización de antígenos basada en VLPs derivadas del virus Junín

Tesis de doctorado

Lic. Agustín Francisco De Ganzó

Director: Mario E. Lozano

Co-Directora: Sandra E. Goñi

2017



Este trabajo doctoral se realizó en el Área de Virosis Emergentes y Zoonóticas del Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes, Roque Sáenz Peña 352, Bernal, provincia de Buenos Aires, República Argentina, con el aporte de la Agencia Nacional de Promoción Científica, Tecnológica y de la Universidad Nacional de Quilmes y con becas doctorales otorgadas por el Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.



A mis padres
A mis hermanas
A Potter
A todas mis familias

*A mis amigos
Al que vive a 10 cuadras
A los que viven a 20 km
A los que viven a 250 km o a miles de km
A los que veo todos los días
Y a los que veo una vez al año
Siempre conmigo*

Además, con el fin de analizar la capacidad de pResAg de vehicular antígenos en las VLPs generadas por la actividad de Z, se seleccionaron proteínas de los virus del sarampión y de la encefalitis de *Saint Louis* a partir de sus características inmunogénicas. Finalmente, fue posible detectar la correcta expresión de estas proteínas de forma individual en pResAg, evidenciando que la plataforma posee un gran potencial como candidato vacunal una vez evaluada la respuesta inmune generada *in vivo*.

Glosario de abreviaturas

- ADN:** ácido desoxiribonucleico
- Ag:** antígeno
- APC:** células presentadoras de antígenos
- ARN L:** segmento *Large*
- ARN S:** segmento *Small*
- ARN:** ácido ribonucleico
- ARNm:** ARN mensajero
- BCG:** bacilo Calmette-Guerin
- BD:** *buffer* de dilución
- BTV:** *bluetongue virus*
- BYMV:** *bean yellow mosaic virus*
- C:** proteína de la cápside
- CALPN-1:** calpaina 1
- CD249:** glutamil aminopeptidasa
- CHO:** línea celular de ovario de hámster chino
- CHPV:** *Chapare virus*
- CMV:** citomegalovirus
- COS-7:** línea celular CV1 Origin SV40
- CPs:** *coat proteins*
- C-t:** carboxilo terminal
- Cyt:** dominio citoplasmático
- DCs:** Células dendríticas
- DENV:** *Dengue virus*
- DO:** densidad óptica
- E:** proteína de la envoltura
- EBOV:** *Ebola virus*
- eGFP:** *Enhanced Green Fluorescent Protein*

EIA: *Enzyme Immune Assay*

ELL: *East Lansing Line*

ESCRT: *Endosomal sorting complexes required for transport)*

Etd: ectodominio

F: proteína de fusión de sarampión

fHbp: proteína de unión al factor H

G': elementos mínimos de GP-C de anclaje y direccionamiento a membrana

G1: glicoproteína 1

G2: glicoproteína 2

GFP: *Green Fluorescent Protein*

GP160: glicoproteína 160

GP41: glicoproteína 41

GP-C: *Glycoprotein Complex*

GST: Glutation-S-transferasa

GTOV: *Guanarito virus*

H: Hemaglutinina de sarampión

HA: Hemaglutinina de Influenza

HAV: *Hepatitis A virus*

HBV: *Hepatitis B virus*

HBV-HBsAg: antígeno menor del virus de la hepatitis B

HCV: *Hepatitis C virus*

HEK 293T: línea celular de riñon de embrión humano

HepG2: línea celular de hepatocitos de cáncer de hígado

HEV: *Hepatitis E virus*

HIB: *Haemophilus influenzae* tipo B

HIV: *Human Immunodeficiency virus*

HPV: *Human papillomavirus*

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

INF: Interferón

IPPV: *Ippy virus*

IPV: *Inactivated Polioma virus*

IVi: interior del virión

IVLP: interior de la VLP

JEV: *Japanese Encephalitis virus*

JUNV: *Junin virus*

kDa: kilo Daltons

L: ARN polimerasa

LASV: *Lassa virus*

LCMV: *Lymphocytic Choriomeningitis virus*

LD: *Late Domains*

LPS: lipopolisacárido

LUJV: *Lujo virus*

M: monocapa

MACV: *Machupo virus*

MARV: *Marburg virus*

MCS: *Multiple Cloning Site*

MenB: vacuna contra *Neisseria meningitidis* serogrupo B

MeV: *Measles virus*

MHC-I: *Major Histocompatibility Complex class I*

MHC-II: *Major Histocompatibility Complex class II*

MMP2: metaloproteasa de matriz 2

MMP3: metaloproteasa de matriz 3

MMR: *Measles-Mumps-Rubella*

MMRV: *Measles-Mumps-Rubella-Varicella*

MOBV: *Mobala virus*

MOPV: *Mopeia virus*

MVi: membrana del virión

MVLP: membrana de la VLP

Myr: ácido mirístico

N: nucleoproteína

NA: Neuraminidasa de Influenza

NadA: adhesina A

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NDV: *Newcastle Disease virus*

NE: neutralizante

NERVE: *New Enhanced Reverse Vaccinology Environment*

NHBA: antígeno de unión a heparina de *Neisseria*

nm: nanómetros

NP o N: Nucleoproteína

NS1: *Non-Structural Protein 1*

NS1mpi: NS1 asociada a membranas internas

NS1mps: NS1 asociada a membranas superficial

NS1s: NS1 secretada

NSP: *Non-Structural Protein*

N-t: amino terminal

NWA: *New World Arenavirus*

OPV: *Oral Poliomavirus*

ORF: *Open Read Frame*

OWA: *Old World Arenavirus*

P: fosfoproteína de sarampión

PAGE: *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PCV: *Porcine Circovirus*

PML: *Promyelocytic Leukemia Protein*

pResAg: vector presentador de antígenos

PRH: *Proline-rich Homeodomain Protein*

PRN: *Plaque Reduction Neutralization*

PROSPER: *Protease Specific Prediction Server*

PRRs: *Pattern Recognition Receptors*

PVV: *Porcine Parvovirus*

PYV: *Potato Y virus*

RdRP: ARN polimerasa ARN dependiente

retroVLP: *retroviral VLP*

RING: *Really interesting new gene*

RNP: ribonucleoproteina

RV: Rotavirus

RVA: Rotavirus del grupo A

rVLP: *recombinant VLP*

SABV: *Sabia virus*

SAV: *salmonid alphavirus*

SDS: dodecyl-lauryl-sulfato

SKI-1: *Subtilisin Kexin Isozyme-1*

SLAM: *Signaling Lymphocytic Activation Molecule*

Sn: sobrenadante

SNV: *Spleen Necrosis virus*

SSP: péptido señal

SVi: superficie del virión

SVLP: superficie de la VLP

TB: Tuberculosis

TBE: *Tick-Borne Encephalitis*

TBEV: *Tick-Borne Encephalitis virus*

TCRV: *Tacaribe virus*

TEM: *Transmission Electron Microscopy*

TfR1: Receptor de Transferrina 1

TLRs: receptores tipo *Toll*

TM: dominio transmembrana

TMV: *Tobacco Mosaic virus*

TsG101: *Tumor Susceptibility Gene 101*

VBRC: *Viral Bioinformatics Resource Center*

Vero: línea celular epitelial de riñón de *Cercopithecus aethiops*

VLPs: *Virus Like Particles*

VSF: *vesicular stomatitis virus*

WB: *Western blotting*

WHO: *World Health Organization*

WNV: *West Nile virus*

WNV: *West Nile virus*

WWAV: *White water arroyo virus*

XMRV: *Xenotropic Murine Leukemia virus*

YFV: *Yellow Fever virus*

ZIKV: *Zika Virus*

α -H: anti hemaglutinina de sarampión

α -MeV: anti *Measles virus*

α -N: anti nucleoproteína de sarampión

α -NS1_{SLEV}: anti NS1 de SLEV

α -Z: anti Z de JUNV

Índice

Sección I - Introducción

Capítulo 1 - Vacunología

I.1. Vacunología	28
I.1.1. Los principios de Pasteur y el desarrollo de vacunas	29
I.1.2. Vacunología Inversa	33
I.1.2.I. Identificación de nuevos antígenos potenciales por vacunología inversa	35
I.1.2.I.A. Diseño racional de vacunas	36
I.1.2.I.B. La vacunología estructural y el uso de partículas tipo virales (VLPs) como plataformas vacunales	38

Capítulo 2 – VLPs como plataformas vacunales

I.2. VLPs: impacto en la vacunología	42
I.2.1. Estructura de las VLPs	43
I.2.2. Procesamiento de las VLPs por el sistema inmune	44
I.2.2.I. Inducción de la inmunidad innata	44
I.2.2.II. Inducción de la inmunidad adaptativa	45
I.2.3. VLPs como plataformas vacunales	47
I.2.4. Sistemas de expresión de VLPs	49
I.2.4.I. Sistemas bacterianos	49
I.2.4.II. Sistemas de levadura	51
I.2.4.III. Sistemas de células de insecto	52

I.2.4.IV. Células de mamíferos	53
I.2.4.V. Sistemas de expresión en plantas	54
I.2.4. VLPs de arenavirus	54
I.2.4.I. La familia <i>Arenaviridae</i>	54
I.2.4.II. Estructura y organización de los viriones	55
I.2.4.III. La proteína Z de arenavirus	56
I.2.4.III.A. Aspectos estructurales de las propiedades funcionales de Z	58
I.2.4.III.B. Z como reguladora de la transcripción y la replicación	60
I.2.4.III.C. Interacción entre Z y GP-C	61
I.2.4.III.D. Brotación viral mediada por Z	62
I.2.4.III.E. Z como proteína generadora de VLPs	64

Sección II - Objetivos e Hipótesis

Objetivos generales	68
Objetivos específicos	68
Hipótesis	68

Sección III - Desarrollo de herramientas y diseño de las estrategias de trabajo

Capítulo 3 - Evaluación de la respuesta inmune celular inducida por VLPs_{Z-GFP}

III.3.1. Introducción	74
III.3.1.I. Respuesta inmune	74
III.3.1.I.A. Respuesta inmune celular	75

III.3.2. Desarrollo de herramientas y estrategias de trabajo	77
III.3.2.I Producción de VLPs _{Z-GFP} a mediana escala	77
III.3.2.I.A. Análisis de la expresión de Z-GFP	78
III.3.2.I.A.I. Visualización de Z-GFP mediante microscopía de fluorescencia convencional	78
III.3.2.II Ensayos de inoculación en animales de laboratorio	78
III.3.2.III. Análisis de respuesta de linfocitos T-CD4 y/o T-CD8	79
III.3.2.III.A. Marcación y medición celular	80
III.3.2.III.B. Análisis de resultados	80
III.3.2.IV. Generación y estimulación de DC	80
III.3.2.IV.A. Marcación y medición de estimulación de DC	81
III.3.2.IV.B. Análisis de resultados	82
III.3.3. Discusión y conclusión	83

Capítulo 4 - Vehiculización del dominio CD4 de la proteína VP6 de Rotavirus en VLPs_Z

III.4.1. Introducción	88
III.4.1.1. Rotavirus	88
III.4.1.1.A. Características generales de rotavirus	88
III.4.1.1.B. Características antigénicas de rotavirus	89
III.4.1.1.B.1. Vacunología inversa: el dominio CD4 de VP6	90
III.4.2. Desarrollo de herramientas y estrategias de trabajo	92
III.4.2.1. Vehiculización de CD4 en VLPs _{Z-CD4-GFP}	92
III.4.2.2. Análisis de la expresión	93
III.4.2.II.A. pZ-CD4	93
III.4.2.II.B. pZ-CD4-GFP	94

III.4.2. Discusión y conclusión	95
---------------------------------	----

Capítulo 5 - Vehiculización de la hemaglutinina del virus del sarampión en VLPs_z

III.5.1. Introducción	100
III.5.1.I. El virus del sarampión (MeV)	100
III.5.1.I.A. Respuesta inmune generada por MeV	101
III.5.1.I.B. Estructura de MeV	102
III.5.1.I.C. La hemaglutinina de MeV	103
III.5.2. Desarrollo de herramientas y estrategias de trabajo	104
III.5.2.I.A. pZ-H	104
III.5.2.I.A.I. Amplificación por PCR con <i>primers</i> específicos	105
III.5.2.I.B. pH	107
III.5.2.I.B.II Transferencia de H	107
III.5.2.II. Análisis de la expresión	107
III.5.2.II.A. Proteína recombinante Z-H	109
III.5.2.II.B. pH	110
III.5.3. Discusión y conclusión	112

Capítulo 6 - Diseño *in silico* del vector de expresión presentador de antígenos pResAg

III.6.1. Introducción	118
III.6.1.I. Características moleculares del complejo de las glicoproteínas de los arenavirus	118
III.6.1.II. El péptido señal de los arenavirus	119
III.6.1.III. Interacción Z-GP	120
III.6.2. Desarrollo de herramientas y estrategias de trabajo	121

III.6.2.I. pResAg: un presentador de antígenos genérico de superficie	121
III.6.2.I.A. Diseño <i>in silico</i> de pResAg	122
III.6.2.II. Clonado molecular de pResAg	124
III.6.3. Modelado bioinformático de los péptidos codificados en pResAg	124
III.6.3.I. Expresión de G'	125
III.6.3.II. Construcción del sistema	126
III.6.3. Discusión y conclusión	128

Capítulo 7 - Vehiculización de la hemaglutinina del virus del Sarampión en una plataforma de presentación de antígenos en VLPs_{Z+G'}

III.7.1 Introducción	132
III.7.2. Desarrollo de herramientas y estrategias de trabajo	134
III.7.2.I. Vacunología inversa aplicada: vehiculización del ectodominio de H en pResAg	134
III.6.2.I.A. Amplificación por PCR con <i>primers</i> específicos	135
III.7.2.II. Análisis de la expresión	136
III.7.2.II.A. pRes-H(Etd)	137
III.7.2.III. Análisis bioinformático de la proteína 'ResH(Etd)': predicción de sitios de proteólisis específica	139
III.7.2.IV. Visualización de las VLPs mediante microscopía	142
III.7.3. Discusión y conclusión	143

Capítulo 8 - Vehiculización de la proteína NS1 del virus de la encefalitis de *Saint Louis*

III.8.1. Introducción	148
-----------------------	-----

III.8.1.I. La familia <i>Flaviviridae</i>	148
III.8.1.II. Epidemiología de los Flavivirus	148
III.8.1.III. Morfología de los viriones	150
III.8.1.IV. Biología molecular de los flavivirus	152
III.8.1.V. Respuesta inmune generada α -Flavivirus	152
III.8.1.VI. Virus inactivados y subunidades virales como candidatos vacunales contra Flavivirus	154
III.8.1.VII. La proteína NS1 flaviviral como blanco para el desarrollo de vacunas	156
III.8.2. Desarrollo de herramientas y estrategias de trabajo	158
III.8.2.I. Vacunología inversa aplicada: vehiculización de NS1 _{SLEV}	158
III.8.2.I.A. Amplificación por PCR con <i>primers</i> específicos	158
III.8.2.II. Análisis de la expresión	159
III.8.2.II.A. pResNS1	160
III.8.2.II.A. Visualización de VLP _{SZ+NS1} mediante microscopía	161
III.8.2.III. Producción de suero policlonal α -NS1 _{SLEV}	163
III.8.3. Discusión y conclusión	164

Capítulo 9 - Discusión y conclusiones

III.9. Discusión y conclusiones	170
---------------------------------	-----

Sección IV

Capítulo 10 – Materiales y Métodos

IV.10.1. Lugar de trabajo	186
IV. 10.2. Procedimientos de rutina	187

IV. 10.2.I. Técnicas de Biología Molecular	188
IV.10.2.I.A. Cepas bacterianas	188
IV.10.2.I.A.1. Cultivos bacterianos	188
IV.10.2.I.B. Extracciones plasmídicas	189
IV.10.2.I.C. Amplificación de ADN por PCR	189
IV.10.2.I.D. Digestiones enzimáticas	191
IV.10.2.I.E. Ligaciones	191
IV.10.2.I.F. Electroporación y plaqueo	192
IV.10.2.I.G. Análisis de recombinantes	192
IV.10.2.I.G.1. <i>Eckardt</i>	193
IV.X.10.I.G.2. PCR de colonias	193
IV.10.2.I.G.3. Digestiones enzimáticas: confirmación de clones	194
IV.10.2.I.G.4. Secuenciación	194
IV.X.2.1.H. Análisis de ácidos nucleicos	195
IV.10.2.I.H.1. Precipitación de ácidos nucleicos	195
IV.10.2.I.H.2. Electroforesis de ácidos nucleicos	195
IV.10.2.I.I. Electroforesis de proteínas	196
IV.10.2.I.J. Técnicas de inmunodetección de proteínas	196
IV.10.2.I.J.1. <i>Western Blotting</i>	197
IV.10.2.I.J.2. Enzimoimmuno ensayo indirecto (EIA)	197
IV.10.2.I.K. Técnicas <i>in vivo</i> en modelos animales	197
IV.10.2.I.K.1. Inmunización de ratones y producción de suero policlonal α -NS1	198
IV.10.2.II. Técnicas de Biología Celular	198

IV.10.2.II.A. Cultivos eucariotas - Mantenimiento de líneas celulares	199
IV.10.2.II.A.1. Células <i>HEK 293-T</i> y <i>HEK-293-T/17</i>	199
IV.10.2.II.A.2. Células <i>COS-7</i>	199
IV.10.2.II.B. Transfección de líneas celulares	200
IV.10.2.II.C. Ultracentrifugación en colchón de sacarosa	200
IV.10.2.III. Técnicas de microscopía	200
IV.10.2.III.A. Microscopía de fluorescencia	201
IV.10.2.III.B. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	201
IV.10.2.IV. Técnicas bioinformáticas	201
IV.10.2.IV.A. Diseño <i>in silico</i> de los clonados moleculares	202
IV.10.2.IV.B. Alineamiento de secuencias nucleotídicas	202
IV.10.2.IV.C. Diseño de <i>primers</i>	202
IV.10.2.IV.D. Modelado bioinformático de proteínas	203
IV.10.2.IV.D.1. Construcción del sistema	203
Bibliografía	207

Índice de figuras

Figura 1.1: Evolución de la vacunología desde 1796 hasta la actualidad.	30
Figura 1.2: Éxito relativo de las vacunas en relación a la variedad antigénica del patógeno de origen.	31
Figura 1.3: Éxito relativo de las vacunas en uso en relación al tipo de inmunidad generada	33
Figura 1.4: Interacción entre la patogénesis y el desarrollo de la vacunología clásica e inversa.	34
Figura 1.5: Diseño racional de vacunas.	37
Figura 2.1: Estructura del virión de arenavirus y organización del genoma.	57
Figura 2.2: Representación esquemática de la distribución de los diferentes dominios en la secuencia primaria de Z.	58
Figura 2.3: Modelo de ensamblaje y brotación mediados por Z	64
Figura 3.1: Visualización al microscopio de fluorescencia convencional de células expresando Z-GFP.	78
Figura 3.2: Inmunodetección de Z-GFP en el Sn de cultivo.	79
Figura 3.3: Respuesta inmune celular inducida por VLPs _{Z-GFP} .	81
Figura 3.4: Estimulación de la maduración de DCs por VLPs _{Z-GFP} .	82
Figura 4.1: Diagrama del virión de Rotavirus	89
Figura 4.2: Esquema de la estrategia utilizada para el mapeo funcional de VP6 y la caracterización del dominio CD4	91
Figura 4.3: Análisis de la expresión de pZ-CD4.	92
Figura 4.4: Análisis de la expresión de pZ-CD4-GFP.	94
Figura 5.1: Diagrama del virión de MeV.	102
Figura 5.2: Características de la hemaglutinina de MeV.	103

Figura 5.3: Clonado molecular de la secuencia de H para la obtención de pZ-H.	106
Figura 5.4: Diseño <i>in silico</i> para la generación de pH	108
Figura 5.5: Análisis de la expresión de Z-H.	109
Figura 5.6: Análisis de la expresión de H y Z. A	111
Figura 6.1: Modelo del complejo GP-C de arnavirus.	119
Figura 6.2: Representación de la secuencia del SSP de JUNV	120
Figura 6.3: Diseño del vector de expresión pResAg.	122
Figura 6.4: Clonado molecular de pResAg.	123
Figura 6.5: Modelo comparativo de proteínas	125
Figura 6.6: Modelado bioinformático de G'.	127
Figura 6.7: Modelado bioinformático de los péptidos expresados por pResAg y su inserción en la membrana de la VLP	128
Figura 7.1: Clonado molecular de pResH(Etd).	135
Figura 7.2: Análisis de la expresión de pResH(Etd).	138
Figura 7.3: Análisis bioinformático de 'ResH(Etd)'.	141
Figura 7.4: Confirmación por microscopía electrónica de transmisión de la presencia de VLPs en el Sn de cultivo	142
Figura 8.1: Morfología de los viriones de Flavivirus	151
Figura 8.2: Representación esquemática del genoma flaviviral	153
Figura 8.3: Clonado molecular de pResNS1 _{SLEV}	159
Figura 8.4: Análisis de la expresión de pResNS1	161
Figura 8.5: Visualización por microscopía electrónica de transmisión de la presencia de VLPs _Z en el Sn de cultivo	162
Figura 8.6: Evaluación de la respuesta inmune α -NS1 _{SLEV}	163
Figura 9.1: Resumen de las proteínas expresadas en las diferentes estrategias diseñadas	171

Índice de tablas

Tabla 8.1: Vacunas flavivirales en la actualidad.	156
Tabla 10.1: Perfil de ciclado estándar diseñado en el laboratorio	190
Tabla 10.2: Protocolo estándar diseñado para la ligación de fragmentos en vectores de clonado y expresión	191
Tabla 10.3: Ecuación utilizada para el cálculo de volúmenes de las soluciones a utilizar en el protocolo Eckardt para el análisis de recombinantes.	194



Sección I

Introducción



Capítulo 1

Vacunología

I.1. Vacunología

Junto a las mejoras sanitarias, el descubrimiento y uso de antibióticos, la vacunación ha constituido uno de los avances de mayor impacto en la salud humana y en el aumento de la expectativa de vida. Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, del inglés *World Health Organization*), la inmunización debería ser reconocida como el principal componente del derecho a la salud humana, y su acceso debe ser una responsabilidad individual, social y gubernamental, ya que únicamente la vacunación previene unos 2,5 millones de muertes al año en todo el mundo (World Health Organization, 2011). Sin embargo, las enfermedades infecciosas siguen siendo la principal causa de muerte en todo el mundo.

Desde el origen de la vacunología clásica o convencional en 1796, con el descubrimiento de la vacuna contra la viruela, se han producido numerosos avances tecnológicos en la lucha contra las enfermedades infecciosas. En el pasado, el desarrollo de vacunas y de agentes terapéuticos se llevó a cabo sin el conocimiento básico de la patogénesis de los agentes infecciosos. De esta forma, la vacunología clásica se ha constituido sobre el desarrollo empírico con el mínimo conocimiento de los complejos mecanismos inmunológicos por los cuales las vacunas inducen inmunidad protectora (Plotkin, 2009).

La llegada de la genómica ha cambiado radicalmente la forma en que se identifica a los candidatos vacunales. Como resultado de las revoluciones tecnológicas, se ha dado lugar a un renacimiento en el desarrollo de vacunas en el que la identificación rápida y dirigida de nuevos antígenos vacunales es posible mediante análisis genómicos, transcriptómicos y proteómicos a gran escala. Gracias al desarrollo de

la Bioinformática, se han introducido nuevos métodos para el diseño, descubrimiento de antígenos y el análisis de la respuesta inmune generada (Rinaudo *et al.*, 2009). Las tecnologías basadas en la genómica han revelado también nuevos factores de virulencia de diversos patógenos.

I.1.1. Los principios de Pasteur y el desarrollo de vacunas

El mecanismo de acción de las vacunas depende enteramente de la activación de los componentes inmunológicos protectores del propio organismo, y las vacunas vivas atenuadas o inactivadas han sido exitosas gracias a que imitan básicamente el tipo de inmunidad protectora inducida en las personas que sobreviven a una infección normal.

Las vacunas más exitosas utilizadas en la actualidad han sido desarrolladas utilizando métodos convencionales que siguen el paradigma establecido por Pasteur hace más de un siglo, de "aislar, inactivar e inyectar" el microorganismo causante de la enfermedad y, de esta forma, imitar una infección natural (Plotkin, 2009). La estrategia para el desarrollo de estas vacunas se basó en: **1)** reducir la virulencia del organismo causante de la enfermedad; **2)** inhibir su capacidad para replicarse; **3)** generar la consiguiente atenuación y/o inactivación; **4)** privar a los organismos infecciosos de su patogenicidad y **5)** preservar su inmunogenicidad. En la **Figura 1.1** puede verse un esquema de la evolución de la vacunología desde sus inicios en 1796 hasta la actualidad, haciendo especial hincapié en el aporte de Louis Pasteur.

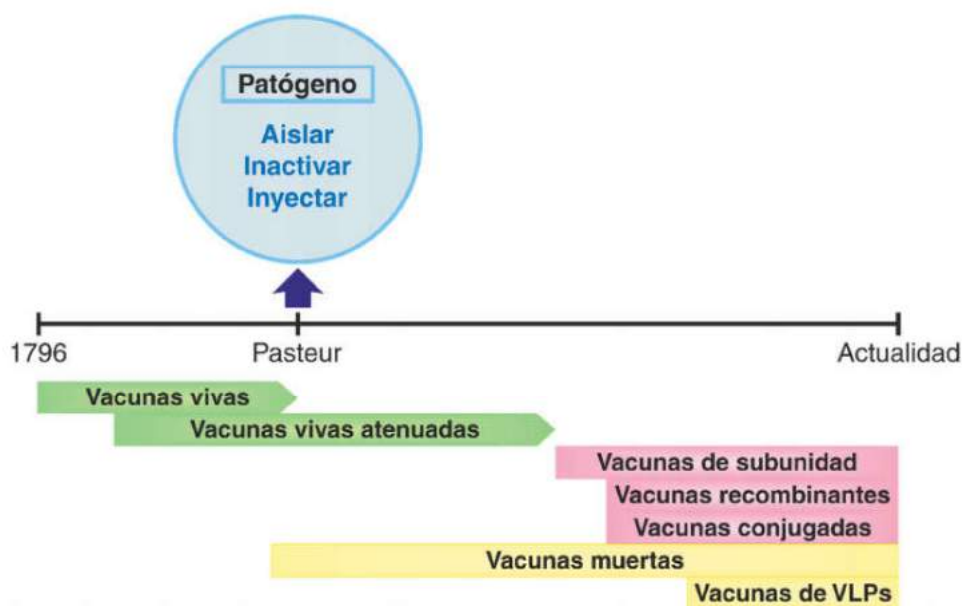


Figura 1.1: Evolución de la vacunología desde 1796 hasta la actualidad.

Las vacunas actualmente en uso han sido desarrolladas siguiendo los tres principios básicos de Pasteur de "aislar, inactivar e inyectar" el patógeno. Esto permitió el desarrollo de vacunas que pueden clasificarse en tres grandes grupos que comparten características biológicas: las vivas atenuadas; de subunidad, recombinantes y conjugadas; y las muertas y VLPs.

Pasteur aplicó los principios detallados anteriormente a finales del siglo XIX a virus (virus de la rabia aislados de conejos), y bacterias (bacilos de ántrax inactivados por calor). Estas estrategias han sido exitosas para aquellos patógenos con antígenos invariantes que, tras una única infección, generan memoria inmunitaria en el organismo capaz de evitar re-infecciones posteriores, como por ejemplo, la viruela, la fiebre amarilla, la poliomielitis, la rabia, las paperas, el sarampión, la rubéola, la varicela, el herpes zoster, la hepatitis A, y encefalitis japonesa (**Figura 1.2**, izquierda) (Rappuoli, 2007). Además, también se han desarrollado vacunas inactivadas o vivas atenuadas contra algunas enfermedades infecciosas bacterianas con diferentes grados de éxito; el Bacilo Calmette-Guerin (BCG o *Mycobacterium bovis* vivo atenuado) es posiblemente la vacuna más utilizada en todo el mundo y actualmente la única vacuna disponible contra la tuberculosis (Parida and Kaufmann, 2010).

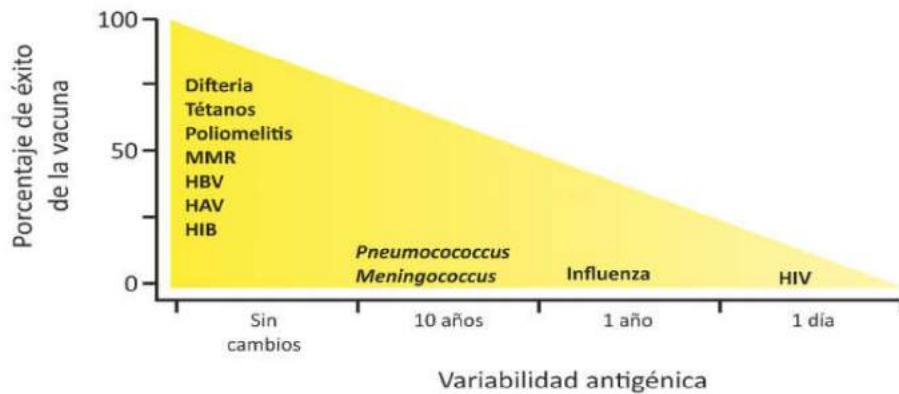


Figura 1.2: Éxito relativo de las vacunas en relación a la variedad antigénica del patógeno de origen. Se observa que el éxito de la vacuna disminuye linealmente con el incremento de la capacidad del patógeno en variar sus antígenos blanco. Se muestran solo algunas vacunas a modo de ejemplo. MMR: triple viral contra sarampión, paperas y rubéola (del inglés, *Measles, Mumps-Rubella*); HBV: virus de la hepatitis B; HAV: virus de la hepatitis A; HIB: *H. influenzae* tipo B (modificado de Rappuoli, 2007).

Sin embargo, la vacunología clásica o convencional ha demostrado ser inadecuada en el desarrollo de vacunas para aquellos patógenos que son antigénicamente diversos, que no pueden ser cultivados en el laboratorio, aquellos que carecen de modelos animales adecuados de infección, y / o respuestas inmunitarias dependientes de células T (respuesta celular) (**Figura 1.2**, derecha).

El desarrollo de las vacunas de subunidad fue otro avance importante basado en la estrategia de Pasteur: se aislaron e inactivaron componentes esenciales del patógeno, usualmente determinantes de la virulencia, para su uso como vacunas de "subunidad". Este enfoque se utilizó por primera vez para la difteria y el tétanos, en los que la patología de la enfermedad se debió en gran medida a las toxinas producidas por el patógeno bacteriano, y las vacunas toxoideas iniciales fueron toxinas químicamente inactivadas aisladas de bacterias.

En la actualidad, las vacunas de subunidad han crecido notablemente y se ha optimizado la capacidad de generar respuestas inmunes y memoria inmunológica. A su vez, son seguras y eficaces, y se han desarrollado formulaciones multivalentes, por ejemplo, para

proporcionar protección contra numerosos serotipos neumocócicos y serogrupos meningocócicos.

Por otro lado, aunque la desaparición virtual de enfermedades como la difteria, el tétanos, la tos ferina y la *H. influenzae* tipo B invasiva son puntos de referencia para el éxito de las vacunas, todavía quedan muchas enfermedades para las cuales las estrategias de vacunación hasta ahora no han tenido éxito. Esto se debe no sólo a la hipervariabilidad de sus antígenos sino también a una comprensión incompleta de los mecanismos de patogenicidad y a la necesidad de respuestas inmunes mediadas por células (Rappuoli, 2007) (**Figura 1.3**). Un ejemplo claro lo constituye el HIV (del inglés, *human immunodeficiency virus*, virus de la inmunodeficiencia humana), que al poseer epítopes hipervariables, no estimulan la inmunidad humoral adaptativa, y por lo tanto, las vacunas deben inducir inmunidad celular con bajo o nulo potencial protector en el tiempo.

Con la aplicación de nuevas técnicas recombinantes para la expresión y purificación de proteínas para vacunas de subunidad y la inactivación genética por mutagénesis dirigida, entre otras técnicas de biología molecular, se ha logrado desarrollar vacunas vivas atenuadas y vacunas de subunidad más seguras a través del diseño *in silico*. Esta tecnología también ha sentado las bases de una amplia gama de nuevas plataformas para el diseño y la administración de vacunas. Los antígenos recombinantes de una vacuna de subunidad suelen ser mejor tolerados que los patógenos vivos atenuados o inactivados o las subunidades "naturales" purificadas para vacunación. Esto se debe mayormente a que son producidos en cultivos celulares obtenidos a partir de los huéspedes que infectan naturalmente y sus proteínas presentan modificaciones postraduccionales idénticas a las presentes en los viriones infecciosos *wild type*. Sin embargo, una limitación es que generalmente son menos inmunogénicas y, a menudo, requieren la adición de un adyuvante para generar una respuesta inmune protectora (Mbow *et al.*, 2010).

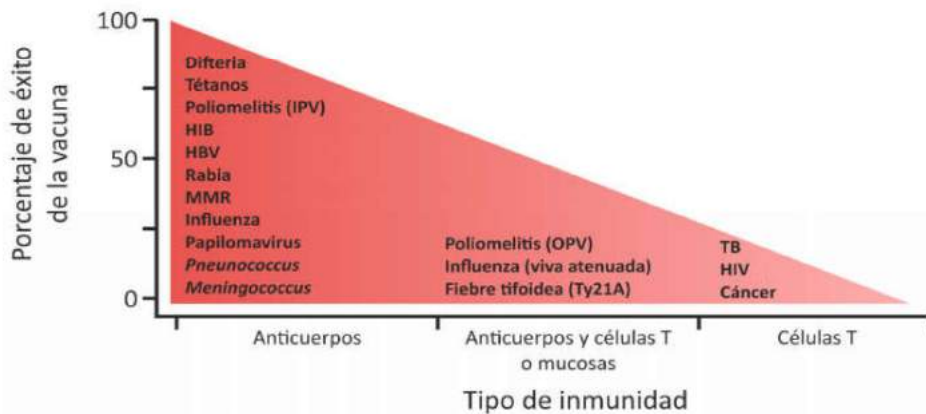


Figura 1.3: Éxito relativo de las vacunas en uso en relación al tipo de inmunidad generada. Se puede observar que el grado de protección decrece con la disminución en la capacidad de generar respuesta humoral. IPV: poliovirus inactivado (del inglés, *inactivated poliovirus*); OPV: poliovirus oral (del inglés, *oral poliovirus*); TB: tuberculosis (modificado de Rappuoli, 2007).

I.1.2. Vacunología Inversa

Con la llegada de la metagenómica, la selección de antígenos basada en el genoma ha desempeñado un papel importante en el descubrimiento de nuevos inmunógenos para el diseño de vacunas. Un enfoque que ha utilizado esta estrategia ha sido denominado "vacunología inversa" y ha permitido el escrutinio del repertorio antigénico potencial de un organismo a través de su genoma, gracias a herramientas bioinformáticas predictivas (**Figura 1.4**).

La vacunología inversa implica la clonación y expresión de todas las proteínas en la secuencia del genoma de un organismo predichas de manera *in silico*, para ser expresadas de manera recombinante, vehiculizadas como antígeno de superficie o secretadas en forma monomérica u oligomérica para ser purificadas. Mediante métodos *in vitro* de clonado molecular, las proteínas son producidas a mediana escala y evaluadas en modelos animales para ensayar su capacidad de generar una respuesta inmune protectora. El objetivo principal es evaluar la capacidad de la respuesta inmune de eliminar o neutralizar al patógeno al momento de la infección. Cuanto más neutralizante es

la respuesta inmune ante un antígeno específico, mayor potencial tendrá el mismo como vacuna.

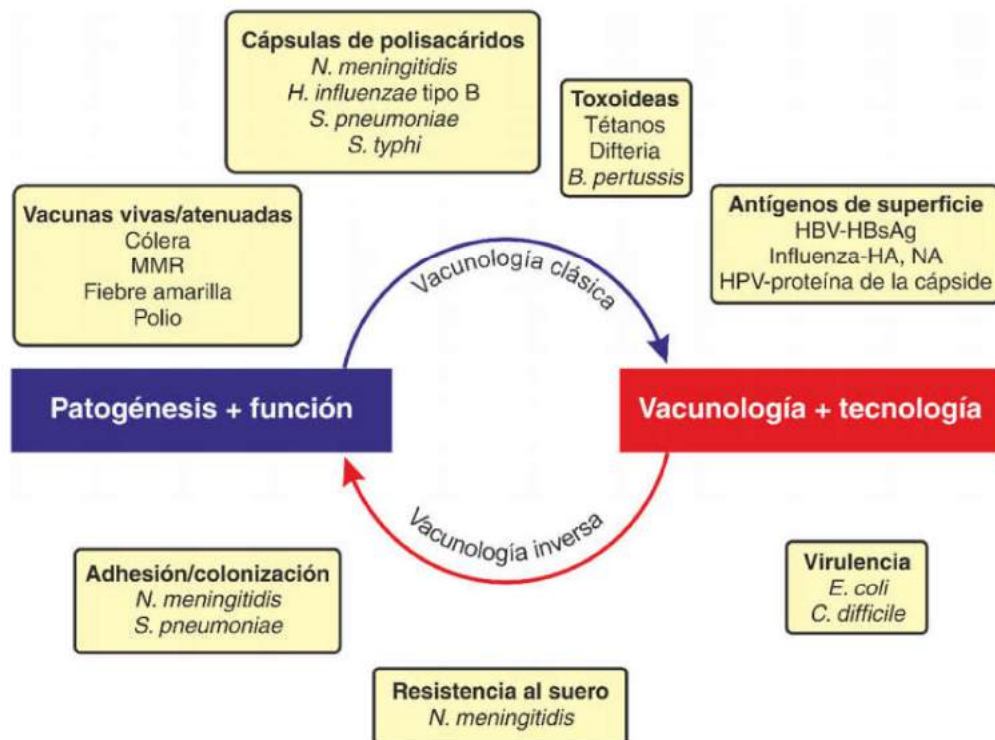


Figura 1.4: Interacción entre la patogénesis y el desarrollo de la vacunología clásica e inversa. MMR: triple viral (del inglés *Measles-Mumps-Rubella*, sarampión, paperas y rubeola) HBV-HBs-Ag: antígeno menor del virus de la hepatitis B; HA: hemaglutinina; NA: neuraminidasa; HPV: virus del papiloma humano (Ulmer, Valley and Rappuoli, 2006).

Este enfoque se ha aplicado a una amplia gama de patógenos y ha proporcionado una larga lista de antígenos cuya funcionalidad era desconocida, a partir del escrutinio de sus genomas. Los estudios posteriores sobre la función de cada antígeno permiten además una mayor comprensión de la biología de los patógenos. Un ejemplo es el uso de antígenos protectores implicados en la adhesión bacteriana, ya que puede haber implicaciones importantes para proporcionar inmunidad mediante la reducción de la colonización y circulación del patógeno. De hecho, los estudios funcionales de muchos antígenos protectores han revelado posteriormente que son nuevas adhesinas

implicadas en la colonización del patógeno (Capecchi *et al.*, 2005; Rosini *et al.*, 2006).

I.1.2.I. Identificación de nuevos antígenos potenciales por vacunología inversa

Aunque un antígeno vacunal no necesariamente tiene que ser un factor de virulencia, centrarse en proteínas con una función crucial en la patogénesis o la supervivencia es un criterio de selección útil ya que los anticuerpos inducidos por este tipo de antígenos pueden bloquear su función y resultar en la neutralización general del patógeno.

El primer patógeno en el cual se utilizó vacunología inversa fue *N. meningitidis* serogrupo B (Pizza *et al.*, 2000). Se identificaron 29 nuevos antígenos que pueden inducir una respuesta humoral bactericida contra el patógeno *in vitro*. Trabajos realizados a partir de tres de los antígenos principales que componen la vacuna MenB (el antígeno de unión a heparina de *Neisseria*, NHBA; la proteína de unión al factor H, fHbp; y la adhesina A, NadA) han sido relacionados posteriormente como importantes factores de virulencia en la infección meningocócica (Capecchi *et al.*, 2005).

Desde esta primera aplicación de la vacunología inversa se han registrado diversos avances. En 2005, Maione y colaboradores (Maione *et al.*, 2006) aplicaron un enfoque de "vacunología inversa multi-genoma o pan-genoma" al estreptococo del grupo B para identificar antígenos del *pool* génico completo de la especie en lugar de un único organismo; más recientemente se ha implementado el enfoque de "vacunología inversa substractiva" para identificar antígenos presentes en cepas patogénicas no comestibles de *Escherichia coli* (Moriel *et al.*, 2010).

I.1.2.I.A. Diseño racional de vacunas

Actualmente, la principal aplicación de la vacunología inversa es el diseño racional de vacunas candidatas o con potencial vacunal. Este nuevo enfoque ha reemplazado los principios de la vacunología clásica de ensayo y error, a pesar de haber tenido éxito en el pasado.

El diseño racional sigue un enfoque escalonado (**Figura 1.5**): **1)** se debe identificar un antígeno blanco, **2)** seleccionar una plataforma vacunal, **3)** optimizar factores para la expresión génica, **4)** producir y caracterizar la vacuna, y por último **5)** probar la bioseguridad, inmunogenicidad y eficacia en modelos animales (Osterhaus, Koraka and Martina, 2010).

En el caso de la virología, los recientes avances en biología molecular y bioinformática han contribuido significativamente a nuestra comprensión de la estructura, la replicación, la atenuación y los determinantes de la patogenicidad. Conocer estos aspectos es crucial para identificar las proteínas blanco (Osterhaus, Koraka and Martina, 2010).

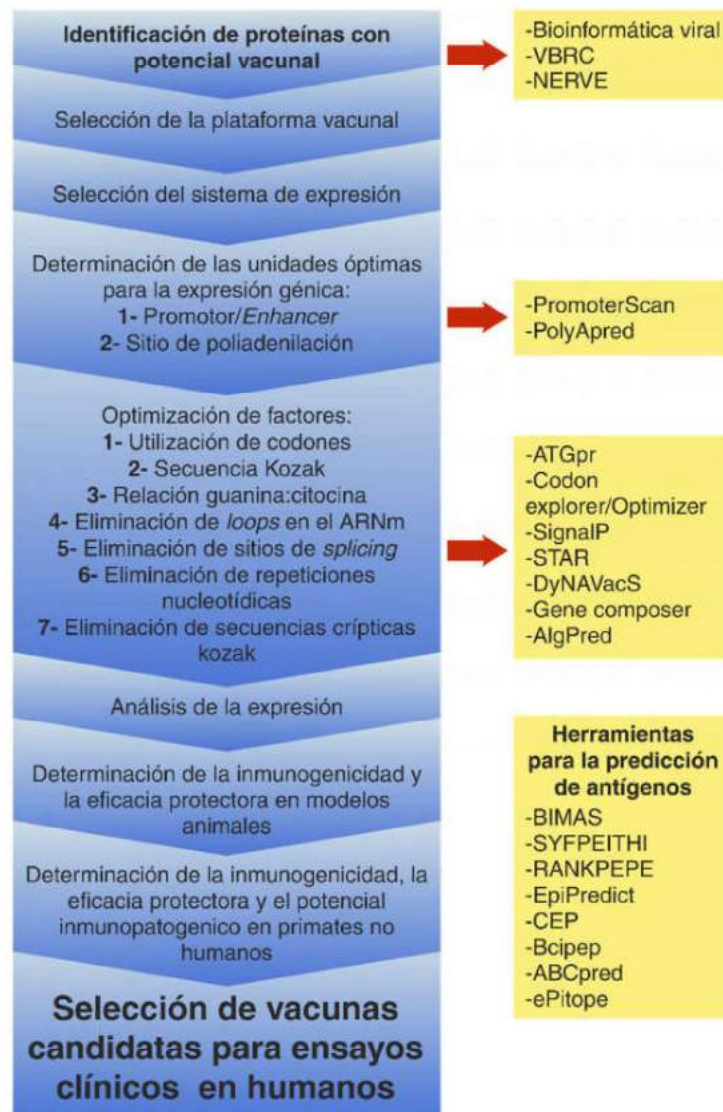


Figura 1.5: Diseño racional de vacunas. El diseño racional de vacunas se basa enteramente en la predicción bioinformática; gracias a la vacunología computacional se han desarrollado herramientas para facilitar la selección del antígeno, la maximización de la expresión, la determinación de la inmunogenicidad y finalmente, la selección de las vacunas candidatas (Osterhaus, Koraka and Martina, 2010).

En los últimos años se han desarrollado herramientas bioinformáticas, englobadas dentro de la "vacunología computacional", que facilitan el proceso de identificación antigénica de manera predictiva. La mayoría de las herramientas bioinformáticas utilizadas se centran en la presentación y el procesamiento de antígenos, con el objetivo de direccionar la respuesta hacia las células T y B. Aunque el

mapeo y la identificación de los epítopes altamente inmunogénicos en antígenos blanco es importante, varios pasos adicionales deben ser considerados al diseñar racionalmente nuevas vacunas. Los problemas comunes encontrados durante el desarrollo de vacunas incluyen el bajo rendimiento de las proteínas seleccionadas y, por consiguiente, la baja inmunogenicidad.

I.1.2.I.B. La vacunología estructural y el uso de partículas tipo virales (VLPs) como plataformas vacunales

La vacunología estructural es una disciplina emergente que tiene como objetivo identificar, diseñar y evaluar antígenos con potencial vacunal, basada en los estudios de la biología estructural, la biología computacional, la inmunología y la serología (Dormitzer, Grandi and Rappuoli, 2012). Sumado a esto, el desarrollo actual de la transcriptómica y la proteómica permiten escrutar el conjunto de antígenos expresados por un patógeno bajo condiciones específicas, examinando el ARN mensajero y las proteínas de un organismo, respectivamente. El análisis puede centrarse únicamente en el subconjunto de proteínas que están expuestas a la superficie (proteoma de superficie) o en el subconjunto de genes que son funcionalmente importantes para la infección (genómica funcional) (Rinaudo *et al.*, 2009).

Asimismo, nuevos campos de estudio se centran en dilucidar el conjunto de antígenos que interactúan con el sistema inmune del huésped y los mecanismos implicados en estas interacciones (inmunómica), así también como la forma en que el sistema inmunológico del huésped individual responde a una vacuna (*vaccinomics* o *vaccinómica*). Si bien cada uno de estos enfoques tiene limitaciones, todos ellos han surgido como poderosas herramientas en

el desarrollo de vacunas y se vinculan directamente con la vacunología estructural.

En comparación con las vacunas del siglo XIX y principios del XX a partir de patógenos muertos, inactivados o vivos atenuados, las vacunas modernas contienen subunidades proteicas antigénicas aisladas, altamente purificadas y más seguras; sin embargo, los niveles de inmunidad protectora que suelen inducir son menores.

Un enfoque que intenta superar esta desventaja es el uso de partículas tipo virales o VLPs (del inglés *Virus-like particles*), las cuales son conjuntos de polipéptidos que presentan múltiples copias de antígenos de subunidad en ordenamientos bien organizados con orientaciones definidas que pueden imitar la repetitividad, la geometría, el tamaño e incluso la forma de la superficie natural en la que interaccionan el huésped y el patógeno.

Estas VLPs, compuestas de antígenos virales únicos o múltiples, en algunos casos anclados en una bicapa lipídica, pueden ser generadas por proteínas estructurales de diferentes microorganismos y han servido como plataforma para la presentación de epítopes inmunogénicos: la proteína pIII del fago filamentoso f1 (De La Cruz, Lal and McCutchan, 1988), el componente Ty de *Saccharomyces cerevisiae* (Burns *et al.*, 1992), las proteínas de superficie o de capa del virus bluetongue (BTV, del inglés *bluetongue virus*) (Belyaev and Roy, 1992), el parvovirus humano B19 (Brown *et al.*, 1994), el virus del mosaico del tabaco o (TMV, del inglés *tobacco mosaic virus*) (Hwang, Roberts and Wilson, 1994b) y el virus del papiloma humano (HPV, del inglés *human papillomavirus*) (Paavonen *et al.*, 2017) son sólo algunos ejemplos.

El uso de estas VLPs con capacidad de autoensamblarse se ha combinado eficazmente con la disciplina emergente de la vacunología estructural para lograr el máximo impacto en el diseño racional de antígenos vacunales.



Capítulo 2

VLPs como plataformas vacunales

I.2. VLPs: impacto en la vacunología

Las VLPs son asociaciones supramoleculares que no llevan ninguna información genética, no son replicativas, pueden producirse en sistemas de expresión heteróloga a gran escala e incorporan las características inmunológicas clave del virus incluyendo patrones y estructuras de superficie repetitivos con potencial para la inducción de inmunidad innata y adaptativa. Esto último tiene lugar mediante la activación de receptores de reconocimiento de patrones y receptores de células B antígeno-específico, respectivamente (Blanco, 2013).

Muchos antígenos pueden ser expuestos en la superficie de las VLPs, pudiendo estar genética o químicamente fusionados a ellas (Kim *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2014). De esta forma, estas construcciones se presentan como potentes herramientas en el campo de la inmunología y vacunología, ya que son consideradas muy eficientes como plataformas vacunales y sistemas de *delivery* terapéutico.

El reconocimiento de la inmunogenicidad y el potencial comercial de las VLPs ha acelerado considerablemente las investigaciones y su desarrollo. Se ha reportado que las VLPs estimulan el sistema inmune de manera completa: **a)** estimulan la inmunidad innata a través de los receptores tipo *Toll* (TLRs, del inglés *Toll-like receptors*) y de los receptores reconocedores de patrones (PRRs, del inglés *Pattern recognition receptors*) debido a la expresión de estructuras multivalentes; **b)** inducción de una fuerte respuesta humoral y también de IgM en células T de manera independiente; **c)** aumento de la afinidad, el procesamiento y la presentación por las APCs (del inglés, *antigen presenting cells*) a través de la vía de presentación cruzada de los MHC I (del inglés, *major histocompatibility complex class I*) y MHC

II (del inglés, *major histocompatibility complex class II*) debido a la naturaleza particulada de las VLPs (Kündig *et al.*, 2015).

I.2.1. Estructura de las VLPs

Se han generado VLPs con potenciales aplicaciones a partir de una gran cantidad de virus que infectan animales y humanos (Kushnir, Streatfield and Yusibov, 2012). Están compuestas por una o más proteínas estructurales (o de la cápside) con propiedad de autoensamblarse en estructuras morfológicas idénticas o similares a los viriones de origen. Comparadas con los viriones completos, cuentan con la ventaja de ser bioseguras al no replicar ni infectar las células del huésped, debido a la ausencia de material genético. Además, se ha reportado que pueden ser utilizadas sin la necesidad de adyuvantes artificiales, como sí ocurre en las vacunas comerciales convencionales (Liu *et al.*, 2012; Zeltins, 2013).

Las proteínas estructurales responsables de la generación de VLPs varían dependiendo de la biología del virus de origen: a) cápsides virales simples con una o dos proteínas estructurales principales (ej: Parvovirus, HPV, Circovirus, Calcivirus, el virus de la hepatitis E (HEV, del inglés, *hepatitis E virus*) y Poliomasvirus); b) cápsides virales complejas, formadas por varias capas de proteínas virales, codificadas por diferentes ARNm o generadas a partir de un único polipéptido (ej: Picornavirus); c) cápsides virales con envoltura lipídica derivada de la célula huésped incluyendo espículas glicoproteicas de superficie (ej: Influenza, HIV, hepatitis C (HCV, del inglés *hepatitis C virus*) y arenavirus (Roy and Noad, 2009).

I.2.2. Procesamiento de las VLPs por el sistema inmune

Las VLPs pueden ser inoculadas de manera subcutánea o intramuscular. Su pequeño diámetro facilita la entrada en sistema linfático y drenan directamente a los nódulos locales. Una vez en el nódulo linfático, las VLPs son procesadas por las células dendríticas (DCs, del inglés *dendritic cells*); la captura mediada por las DCs se ve aumentada por la forma y el tamaño de las VLPs, idénticas a las de los viriones infecciosos. Una vez procesadas, estimulan las células T-CD4⁺ a través de la vía del MHC II y la vía del MHC I, induciendo primeramente a la inmunidad innata.

I.2.2.I. Inducción de la inmunidad innata

En algunos casos, las VLP no requieren el uso de adyuvantes para lograr una estimulación inmune eficiente. Los efectos autoadjuvantes son inherentes a su tamaño adecuado para la captación por las DCs, su posterior procesamiento y presentación por MHC de clase II y para promover directamente la maduración y migración de DCs, esenciales para la respuesta inmune innata (Fifis *et al.*, 2004; Gamvrellis *et al.*, 2004). Las VLPs también pueden ser captadas y procesadas a través de la vía del MHC clase I (presentación cruzada) para la activación de células T-CD8⁺, esenciales para la eliminación de patógenos intracelulares. La capacidad de las VLPs para dirigir DCs es una ventaja importante de las vacunas de VLPs, ya que ahora se entiende que la orientación de este tipo de células es esencial para activar las respuestas inmunes innatas y adaptativas.

Por otro lado, las VLPs que retienen sus regiones de unión al receptor son capaces de ingresar a las células a través de su receptor normal y son captadas por las APCs como antígenos exógenos para la presentación en MHC clase I. Se ha demostrado que la captación

mediada por receptor ocurre en los paramyxovirus y en el HIV (Zeng, Fournier and Schirmacher, 2002; Beignon *et al.*, 2005).

En el caso de la estimulación de las DCs para producir citoquinas, como el interferón- α/β , no requiere la replicación del virus, sino más bien una envoltura intacta de un virus inactivado (Frank *et al.*, 2002) o la de una VLP intacta no envuelta, como en el caso del HPV (P. Lenz *et al.*, 2001). En este contexto, las VLPs pueden tener ventajas muy importantes sobre los virus vivos afines para la activación inmune, porque se sabe que varios virus que se replican en las DCs bloquean la activación y maduración de la célula a través de la expresión de proteínas virales particulares (Ostrowski *et al.*, 2005) e incluso el virus Ebola inactivado y el virus Marburg interfieren con la activación de DCs, lo que sugiere una proteína viral presente en el virus y no la VLP es la responsable de esta interferencia.

I.2.2.II. Inducción de la inmunidad adaptativa

Con el fin de inducir inmunidad adaptativa o humoral en altos títulos de anticuerpos, los antígenos blanco deben estar expuestos en la superficie de las VLPs en altas densidades. Las VLPs son comúnmente más inmunogénicas que los inmunógenos de subunidad o las proteínas recombinantes y son capaces de estimular tanto la respuesta inmune humoral como la celular. Poseen una estructura espacial que permite la correcta visualización de los epítopes conformacionales y, al imitar la estructura del virus nativo, aumentan con ello la producción de anticuerpos neutralizantes. Esto es especialmente importante para las proteínas superficiales de parásitos y virus envueltos, donde las VLP envueltas permiten que las proteínas se presenten en su estado natural como proteínas ancladas a la membrana, más que como los ectodominios en solución (Bachmann and Jennings, 2010).

Es por esto que las VLPs pueden ofrecer un abordaje seguro y eficaz para la inducción de anticuerpos a proteínas de superficie donde las formas solubles de las proteínas no han sido eficaces. Algunas VLPs también tienen la capacidad de presentar múltiples proteínas vacunales al sistema inmune. Por ejemplo, a pesar del éxito de la vacuna contra el virus de la hepatitis B (HBV, del inglés *hepatitis B virus*), se ha buscado optimizar su eficacia mediante la inclusión de otras dos proteínas de la envoltura en la partícula HBsAg, imitando así la envoltura auténtica de virión que contiene estas tres proteínas. Las vacunas de HBV que incluyen estas proteínas de envoltura adicionales estimulan la producción de anticuerpos de manera diferente, pero más específicamente proporcionan epítopes de células T adicionales que promueven una respuesta α -HBsAg más completa y mejoran la tasa de seroprotección superando la falta de respuesta a la vacuna HBsAg (Madalinski *et al.*, 2001).

Otro ejemplo importante es el HIV para el cual se han hecho grandes esfuerzos para recrear la envoltura del virión en una forma que permita la inducción eficiente de anticuerpos neutralizantes. Se produjeron VLPs en forma de proteoliposomas sintéticos en perlas microesféricas sólidas con el fin de imitar el entorno de la membrana lipídica para la presentación de la glicoproteína HIV GP160 (Grundner *et al.*, 2002), así como VLPs imitando la partícula de HIV intacto, que contiene las proteínas de la envoltura asociada con la proteína Gag (Doan *et al.*, 2005). Esto, sumado a los avances aportados por la vacunología inversa, ha ayudado al entendimiento de que los dominios clave asociados con la entrada viral y las regiones conservadas, probablemente no experimenten variación antigénica a pesar de la presión inmunológica neutralizante. Recientemente, la investigación se ha centrado en la presentación de epítopes altamente conservados y neutralizantes de la proteína de la envoltura GP41 del HIV-1 en una conformación de pre-fusión, que sólo se expone brevemente durante la entrada viral (McGaughey *et al.*, 2004).

Es probable que estos objetivos específicos para el desarrollo de vacunas requieran experimentación con la amplia variedad de VLPs existentes y en todos los sistemas de expresión disponibles, el uso de ensayos funcionales, tales como la unión al receptor, reactividad a anticuerpos específicos de conformación y lo más importante la inducción de neutralización cruzada de anticuerpos.

I.2.3. VLPs como plataformas vacunales

Además de ser vacunas potenciales contra los virus de los que derivan, las VLPs también pueden ser utilizadas para presentar epítopes individuales de otros organismos al sistema inmune. Esto puede realizarse mediante la fusión génica y la posterior expresión de la proteína recombinante resultante o mediante la conjugación química entre el antígeno blanco y la proteína estructural generadora de VLPs, ofreciendo nuevas perspectivas en el desarrollo de vacunas.

Uno de los logros más recientes del desarrollo de VLPs como plataformas vacunales es el de la vacuna contra la malaria, compuesta por la proteína circumsporozoíto de *Plasmodium falciparum* fusionada al antígeno de superficie de la hepatitis B con capacidad de generación de VLPs, para obtener VLPs recombinantes quiméricas (rVLPs, del inglés recombinant virus-like particles). Esta vacuna candidata, denominada RTS-S, ha alcanzado la fase III de ensayos clínicos e induce una protección de aproximadamente 30-50% (Agnandji *et al.*, 2011). A pesar de esta moderada eficacia, que puede explicarse por la baja expresión del antígeno en la superficie de las VLPs, la RTS-S es la primera vacuna que muestra una protección significativa contra la malaria, donde otras estrategias como péptidos sintéticos y vectores virales han fallado hasta el momento.

De forma similar, se han utilizado otras plataformas para vehicular antígenos foráneos, usando estructuras simples

conformadas por proteínas con capacidad de autoensamblarse tales como la proteína HBcore, la proteína de la envoltura del virus del mosaico de la alfalfa, la proteína L1 del HPV o el bacteriófago Qb y se ha demostrado que estimulan eficazmente respuestas inmunes específicas contra los antígenos vehiculizados (Spohn *et al.*, 2010; Matic *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2013). En particular, la elección del patógeno del que derivan las proteínas estructurales para la formación de la VLP es crucial ya que influye en la inmunogenicidad global y estos estudios demuestran el gran potencial de las rVLPs ya que muchas de ellas ya han llegado a la fase de ensayo clínico (Kushnir, Streatfield and Yusibov, 2012).

Con el avance en el conocimiento de los virus más complejos, las rVLPs derivadas de virus envueltos ofrecen también un panorama alentador para integrar antígenos blanco presentados sobre las partículas en la envoltura, es decir anclados en su membrana.

Otra estrategia viable para la vehiculización antigénica es el pseudotipado, donde utilizando herramientas de ingeniería genética, se anclan antígenos foráneos, decorando partículas pseudovirales. Es importante destacar que los pseudovirus, a diferencia de las VLPs, son virus completos que portan proteínas ajenas a las codificadas en su genoma aportando funciones extras al momento de infectar, que no estarán presentes en la progenie viral. Este enfoque presenta dos ventajas importantes: a) un medio para la presentación ordenada en la conformación nativa de los antígenos blanco y, b) un medio para optimizar la captación del vector por las APCs. Los núcleos retrovirales han demostrado ser adaptables para este enfoque. Se han desarrollado rVLPs basados en oncoretrovirus simples (retroVLPs, del inglés retrovirus-like particles), mediante el uso del retrovirus de la leucemia murina (XMRV, del inglés Xenotropic murine leukemia virus). La expresión celular de la proteína Gag, la proteína de matriz retroviral, es suficiente para generar partículas pleomórficas envueltas de un diámetro de 80-120 nm, que pueden ser pseudotipadas con

glicoproteínas retrovirales o de otras familias virales, incluyendo el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV, del inglés lymphocytic choriomeningitis virus), el virus de la necrosis del bazo (SNV, del inglés spleen necrosis virus), el virus de la estomatitis vesicular (VSV, del inglés vesicular stomatitis virus), el HCV, el virus de la fiebre amarilla (YFV, del inglés yellow fever virus), el virus West Nile (WNV, del inglés West Nile virus), el virus Influenza, el HIV y el citomegalovirus (CMV) (Dalba *et al.*, 2007; Bellier and Klatzmann, 2013), sin perjudicar su funcionalidad.

Curiosamente, las retroVLPs pueden adaptarse mediante tecnología recombinante para incorporar alta densidad de antígenos en su superficie, lo que constituye una optimización significativa que mejora su inmunogenicidad.

I.2.4. Sistemas de expresión de VLPs

La selección del vector de expresión es uno de los factores más importantes en la generación de VLPs. Ha sido reportada la producción exitosa de 174 VLPs diferentes, un 28% en bacterias, 20% en células de levadura y 28% en células de insectos, un 15% en animales y un 9% en plantas. Estos dos últimos sistemas se aplican para el caso de VLPs con propiedades particulares (Zeltins, 2013).

I.2.4.I. Sistemas bacterianos

Los sistemas bacterianos comerciales de uso convencional incluyen los vectores de expresión y las cepas de *Escherichia coli* aptas para expresar altas cantidades de VLPs no envueltas. En comparación con otros sistemas, la producción en bacterias es altamente eficiente en cuanto a cantidad (Joshi *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de las ventajas cuantitativas, muchas veces los sistemas bacterianos no son

aptos para la producción de VLPs con potencial vacunal debido a varios factores: **a)** incapacidad de generar proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales similares a las de células de mamífero; **b)** fallo en la formación de puentes disulfuro; **c)** cambios en la solubilidad de la proteína; y **d)** adición de lipopolisacaridos (LPS, del inglés *lipopolysaccharide*) o endotoxinas a las proteínas recombinantes.

Sin embargo, las proteínas de la cubierta (CPs, del inglés *coat proteins*) de algunos virus pueden ser producidas eficientemente en cuerpos de inclusión insolubles, purificadas bajo condiciones desnaturalizantes, renaturalizadas y autoensambladas, como se ha reportado para el caso de las VLPs del parvovirus B19, y en varios virus de plantas (Hwang, Roberts and Wilson, 1994a, 1994b). Un cambio sutil en las condiciones de cultivo, como la baja temperatura, puede resolver el problema de los cuerpos de inclusión e inducir la formación de VLPs solubles, como se logró para el virus Y de la papa (PYV, del inglés *potato Y virus*) (Kalnciema *et al.*, 2012). Algunos factores, como los marcadores de resistencia de los plásmidos de expresión o la composición de los medios de cultivo también pueden alterar el ensamblaje de las VLPs. Otra estrategia aplicada para incrementar los niveles de expresión y solubilidad implica utilizar diferentes sistemas de proteínas de fusión, como por ejemplo la glutatión-S-transferasa (GST) o proteínas de fusión como L1 de HPV (Middelberg *et al.*, 2011).

También pueden utilizarse otros procariotas para generar VLPs, como *Lactobacillus* (Zeltins, 2013). El ensamblaje intracelular de VLPs de L1 del HPV subtipo 16 ha sido reportado en *Lactobacillus casei*, una cepa de expresión inducible mediante lactosa (Kushnir, Streatfield and Yusibov, 2012). Además, mediante la producción de VLPs de L1 en *Lactobacillus* se han desarrollado nuevas vacunas de profilaxis vía mucosas (Aires *et al.*, 2006).

Otro sistema de expresión alternativo a *E. coli* es *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*). Es utilizado por su comodidad en el

manejo de los cultivos, la alta producción de proteína soluble y la posibilidad de cultivar a gran escala. Sin embargo, existen diferencias entre *P. fluorescens* y *E. coli* como el tamaño del genoma y metabolismo que pueden influenciar la generación de proteínas recombinantes. La proteína de la cápside de un bromovirus de plantas, el virus del moteado clorótico de caupí (CCMV, del inglés *cowpea chlorotic mottle virus*), ha sido expresada de forma soluble en *P. fluorescens* y ha sido capaz de ensamblarse en VLPs de forma autónoma *in vivo*, siendo estas VLPs de estructura similar a la de los viriones naturales (Phelps *et al.*, 2007).

I.2.4.II.Sistemas de levadura

Los sistemas de expresión eucariota son una alternativa importante a la expresión en bacterias debido a la ausencia de endotoxinas bacterianas para el desarrollo de vacunas. De hecho, la primera vacuna basada en VLPs aprobada contra el HBV fue desarrollada en levaduras (Burns *et al.*, 1992). Lo más importante de este sistema es que las VLPs no se autoensamblan durante el cultivo celular, si no que en *Picchia pastoris* se completa el ensamblado durante el proceso de purificación posterior de las proteínas (Lünsdorf *et al.*, 2011).

El sistema de *P. pastoris* ha sido utilizado para expresar las glicoproteínas de pre-membrana y envoltura del virus del Dengue tipo 2 (DENV-2) (Liu *et al.*, 2010). Otro de los avances en el sistema de expresión en levaduras, fue el desarrollo de métodos de expresión multigénicos. Se han expresado tres genes estructurales de rotavirus a partir de un único vector de expresión que permitió la generación de VLPs trilaminadas en *Saccharomyces cerevisiae* (Rodríguez-Limas *et al.*, 2011). Sin embargo, la multimerización de las proteínas en VLPs derivadas de virus envueltos no ha sido exitosa en el caso de las Gag-

VLPs del HIV-2, lo que sugiere que este sistema de expresión carece de los factores esenciales como huésped para generar VLPs envueltas.

En resumen, si bien este sistema de expresión tiene la ventaja de poseer modificaciones postraduccionales similares a las de células de mamífero y no aportan endotoxinas características de los procariontes para el desarrollo de plataformas vacunales, la construcción de los vectores de expresión es aún dificultosa y los patrones de glicosilación son erráticos comparados con los de las células de mamíferos, siendo únicamente útil para la generación de VLPs no envueltas.

I.2.4.III. Sistemas de células de insecto

Otro sistema utilizado para producir VLPs es el de baculovirus en células de insecto debido a las ventajas de rápido crecimiento, posibilidad de cultivos a gran escala, las modificaciones postraduccionales similares a las de las células de mamíferos y posibilidad de generar VLPs envueltas y no envueltas. Existen en el mercado varias vacunas basadas en VLPs producidas en células de insecto, como Cervarix ®, la vacuna contra el HPV y otras basadas en VLPs envueltas están en la etapa de ensayos clínicos (Roy and Noad, 2009). La principal limitación de este tipo de sistema, son las eventuales contaminaciones con partículas proteicas de los propios baculovirus, lo que sugiere el desarrollo de mejores métodos de purificación. Se ha documentado la expresión exitosa de cuatro genes del virus de la influenza humana H3N2 en este sistema de expresión y que las VLPs generadas indujeron protección contra H3N2 en ratones desafiados (Galarza, Latham and Cupo, 2005). Estos resultados sugieren que se podría desarrollar una vacuna basada en VLPs contra el virus de la influenza H9N2 y otros subtipos de influenza aviar. Las VLPs no infecciosas de SAV (del inglés *salmonid alphavirus*) también fueron generadas usando baculovirus recombinantes que expresaban

la proteína de la cápsula y dos glicoproteínas inmunodominantes E1 y E2 en células de insecto (Metz *et al.*, 2011).

I.2.4.IV. Células de mamíferos

Por más de dos décadas se han desarrollado líneas celulares de mamíferos como fuente de proteínas terapéuticas comerciales para aplicaciones clínicas debido a su habilidad de plegar, ensamblar y modificar las proteínas de manera postraduccional de manera correcta (Wurm, 2004). Las desventajas de este modelo incluyen los costos de producción y mantenimiento de las líneas celulares y la bioseguridad. En un principio, se utilizaron líneas celulares de mamíferos para producir VLPs del virus de la influenza como plataformas vacunales, incluso se desarrollaron líneas estables que expresan proteínas estructurales de influenza que permitieron generar VLPs híbridas conteniendo la proteína de matriz y las glicoproteínas de superficie de los tipos H3N2 y H5N1 (Wu *et al.*, 2010).

Otros ejemplos incluyen la producción de VLPs a partir del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV, del inglés *newcastle disease virus*) en células ELL (*East Lansing Line*) y de VLPs de circovirus (PCV, del inglés *porcine circovirus*) y parvovirus (PVV, del inglés *porcine parvovirus*) porcinos, y de los virus Lassa (LASV, del inglés *Lassa virus*), Marburg (MARV, del inglés *Marburg virus*) y Ébola (EBOV, del inglés *Ebola virus*), en células HEK 293T (del inglés *human embryo kidney*) (Swenson *et al.*, 2005). También se ha documentado la producción de VLPs del bacteriófago T7 en células HepG2 (línea celular de hepatocitos de cáncer de hígado), de HIV-1-VLPs en células COS-7 (CV1-Origin-SV40) y Vero (línea celular epitelial de riñón de *Cercopithecus aethiops*) y de HBV-VLPs en células CHO (del inglés *chinese hamster ovary*) (Assateerawatt *et al.*, 1993).

I.2.4.V. Sistemas de expresión en plantas

Los sistemas de expresión en plantas se utilizan para expresar productos génicos específicos. Se han utilizado plantas recombinantes de tabaco, tubérculos de papa, entre otras, para la generación de antígenos vacunales. Los antígenos expresados en plantas tienen la particularidad de formar puentes disulfuro y oligomerizar de manera correcta para formar VLPs y son capaces de expresar VLPs envueltas y no envueltas, tanto multiméricas como quiméricas. La alta expresión de VLPs en plantas es simple y rápida si se utiliza el sistema de replicón de ARN de TMV o el sistema de replicón de ADN del virus del poroto amarillo enano (BYMV, del inglés *bean yellow mosaic virus*) (Chen and Lai, 2013).

I.2.4. VLPs de arenavirus

I.2.4.I. La familia *Arenaviridae*

La familia *Arenaviridae* comprende los géneros *Mammarenavirus* y *Reptarenavirus*, que agrupan 31 especies el primero y 3 especies el segundo. Según sus propiedades antigénicas, sus relaciones serológicas y su distribución geográfica, los arenavirus se han clasificado en dos grupos: los del Nuevo Mundo (NWA, del inglés *new world arenavirus*) y los del Viejo Mundo (OWA, del inglés *old world arenavirus*) (Romanowski *et al.*, 2017).

Los OWA forman un grupo monofilético que está ancestralmente emparentado con los tres grupos del NWA y comprenden muchos virus encontrados en el continente africano para los cuales aún no se conocen sus relaciones patogénicas con enfermedades humanas; incluyen el virus Ippy (IPPV, del inglés *Ippy virus*), Mobala (MOBV, del inglés *Mobala virus*), Mopeia (MOPV del inglés *Mopeia virus*), Morogoro

y Kodoko (Emonet *et al.*, 2006; Günther *et al.*, 2009). El grupo OWA incluye además al arenavirus prototípico distribuido a nivel mundial LCMV, LASV, agente etiológico de la fiebre hemorrágica viral aguda de Lassa de África Occidental y el virus Lujo (LUJV, del inglés *Lujo virus*) que se ha asociado con una grave fiebre hemorrágica en el sur de África (Lee and Pinschewer, 2002; Briese *et al.*, 2009).

Por otro lado, los NWA se subdividen en tres grupos filogenéticos: A, B y C. El complejo comprende el JUNV en Argentina, Chapare (CHPV, del inglés *Chapare virus*) y Machupo (MACV, del inglés *Machupo virus*) en Bolivia, el virus Sabia (SABV, del inglés *Sabia virus*) en Brasil, el virus Tacaribe (TCRV, del inglés *Tacaribe virus*) en Trinidad, el virus de Whitewater Arroyo (WWAV, del inglés *Whitewater Arroyo virus*) en los Estados Unidos, y el virus Guanarito (GTOV, del inglés *Guanarito virus*) en Venezuela (Charrel *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2008).

Cinco de los arenavirus sudamericanos (CHPV, GTOV, JUNV, MACV y SABV) están asociados con fiebres hemorrágicas en seres humanos y, junto con LASV y LUJV, conforman la mayor familia viral causante de fiebres hemorrágicas conocida.

I.2.4.II. Estructura y organización de los viriones

Los arenavirus son virus envueltos que contienen un genoma de ARN de cadena negativa bisegmentado. Cada segmento de ARN genómico codifica dos marcos de lectura abiertos (ORF, del inglés *open reading frame*) no solapados en una orientación ambisentido, separados por una región intergénica no codificante (**Figura 2.1.A**). El fragmento menor de ARN (S, del inglés *small*) codifica la nucleoproteína (N, del inglés *nucleoprotein*) y el precursor del complejo de las glicoproteínas (GP-C, del inglés *glycoprotein complex*), que madura co y postraduccionalmente para formar un complejo compuesto por tres proteínas: un péptido señal estable (SSP, del inglés

stable signal peptide) y las glicoproteínas G1 y G2 (Clegg, Wilson and Oram, 1991). El segmento mayor de ARN (L, del inglés *large*) codifica la ARN polimerasa (L, del inglés *long*) dependiente de ARN y la proteína Z, denominada así por su dominio RING *finger* de unión a Zinc (Djavani *et al.*, 1997). Los viriones de arenavirus son pleomórficos y varían en diámetro de 60 a 300 nanómetros (**Figura 2.1.C**)

La expresión solitaria de la proteína Z es suficiente para la producción de VLPs que son morfológicamente similares a las partículas virales liberadas de células infectadas (Eichler *et al.*, 2004).

I.2.4.III. La proteína Z de arenavirus

Debido a su pequeño tamaño genómico y un pequeño número de genes, los arenavirus desarrollaron una poderosa estrategia para mantener una replicación viral eficaz mediante la codificación de proteínas virales multifuncionales que median varias interacciones entre proteínas virales y entre proteínas virales y del huésped. En particular, el producto génico de arenavirus más pequeño, la proteína Z de aproximadamente 12 kDa de peso molecular, tiene múltiples funciones y actúa en diversas etapas durante la infección viral.

Las funciones esenciales de la proteína Z en el ciclo viral incluyen: **a) la regulación de la síntesis de ARN vírico:** la transcripción y replicación de arenavirus tiene lugar en el citoplasma de la célula huésped y la proteína Z regula estos procesos a través de la interacción con la polimerasa viral; **b) la dirección del ensamblaje y brotación virales:** mediante la interacción con GP-C y el complejo RNP, Z media su incorporación en los viriones nacientes; **c) la interacción con las proteínas de la célula huésped:** Z interactúa con varios factores de la célula huésped, tales como la proteína de la leucemia promielocítica (PML, del inglés *promyelocytic leukaemia*), el factor de iniciación de la traducción eucariótica 4E (eIF4E, del inglés *eukaryotic initiation factor*

4e), la proteína de homeodominio rica en prolina (PRH, del inglés *proline rich homeodomain*) y proteínas P ribosómicas; y **c) la antagonización del sistema interferón (IFN)**: la proteína Z de diversos arenavirus del NWA participan en el antagonismo del IFN. Mientras que la proteína Z inhibe la activación de la vía de señalización en sentido descendente mediada por RIG-I (Fehling, Lennartz and Strecker, 2012).

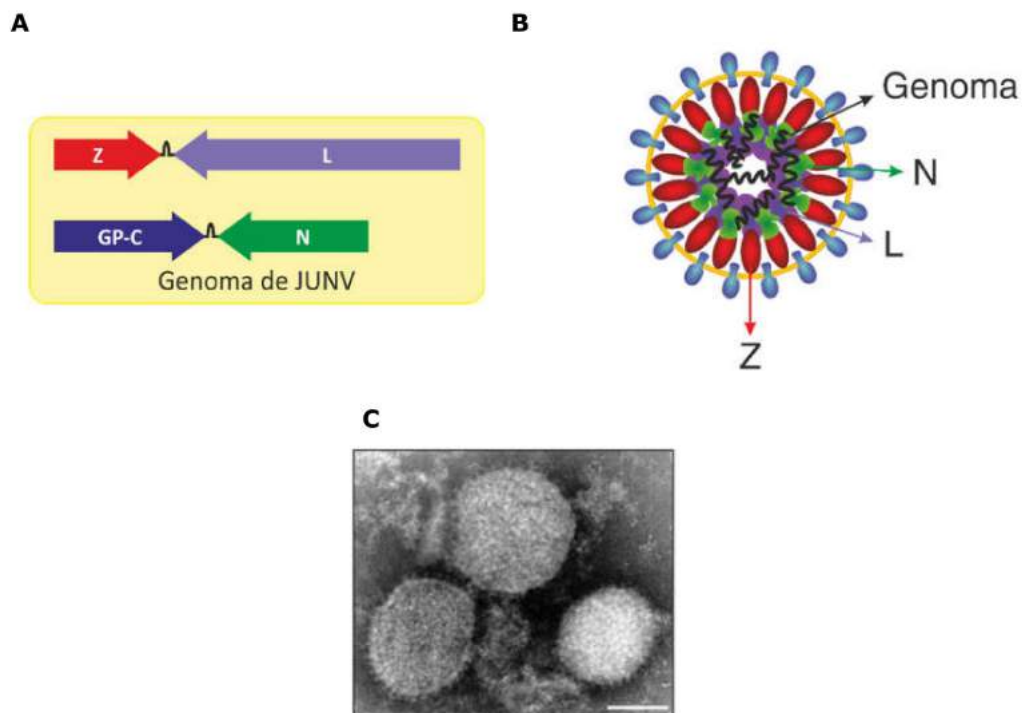


Figura 2.1: Estructura del virión de arenavirus y organización del genoma.

A- Representación esquemática de los segmentos genómicos de los arenavirus. Ambos están constituidos por ARN de cadena negativa, y son denominados ARN S (del inglés small) y ARN L (del inglés large). Cada segmento codifica dos proteínas virales en una orientación ambisentido. Los marcos de lectura abiertos están separados por regiones intergénicas altamente estructuradas, y son flanqueados por extremos no codificantes; **B-** Representación esquemática de viriones de arenavirus. La envoltura viral, una bicapa lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula huésped, contiene múltiples copias de espículas glicoproteicas en la superficie que interaccionan con el receptor y permiten la entrada del virus. La proteína Z forma una matriz debajo de la membrana viral. La proteína N se asocia con la polimerasa L para formar junto con el ARN genómico el complejo de ribonucleoproteína (RNP); **C-** Imagen de microscopía electrónica de LASV; barra blanca: 100 nm (Fehling, Lennartz and Strecker, 2012).

I.2.4.III.A. Aspectos estructurales de las propiedades funcionales de Z

Mientras que las proteínas Z de diferentes arenavirus varían en su secuencia de aminoácidos y longitud, siendo la de LCMV la más pequeña (90 residuos) y la de MOPV la más larga (103 residuos), y en algunas de sus funciones biológicas, todos comparten características estructurales y motivos que juegan un papel importante en la mediación de sus actividades multifuncionales. Las características comunes conservadas entre las proteínas Z de OWA y NWA incluyen una señal de miristoilación N-terminal, un dominio RING central y pequeños motivos de cuatro aminoácidos que funcionan como dominios tardíos virales situados en el brazo C-terminal (**Figura 2.2**).

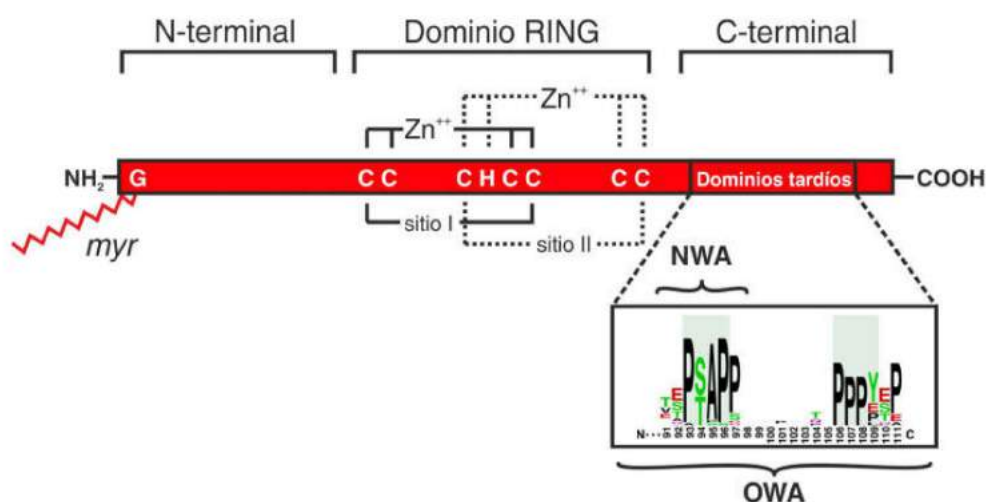


Figura 2.2: Representación esquemática de la distribución de los diferentes dominios en la secuencia primaria de Z. La proteína Z posee un ácido mirístico (en rojo) en su segundo aminoácido (Glicina), un dominio RING *finger* en la región central que une dos átomos de Zinc y una región C-terminal que posee dominios tardíos altamente conservados en varias proteínas de matriz virales; el *sequence logos* de los dominios tardíos ilustra la conservación de las secuencias aminoacídicas en los grupos OWA y NWA.

La miristoilación N-terminal es una modificación co-traducional irreversible de la proteína durante la cual un ácido mirístico (un ácido graso de 14 carbonos) se une covalentemente a la glicina 2. Esta actividad es catalizada por la enzima N-miristoil transferasa de la célula

huésped tras la eliminación de la metionina iniciadora (Farazi, Waksman and Gordon, 2001).

Generalmente, las funciones conocidas del ácido mirístico incluyen el direccionamiento a membrana y la unión de proteínas, permitiendo la interacción proteína-proteína, proporcionando tanto la base estructural como la estabilidad conformacional para el ensamblaje de complejos de proteínas en membranas. La miristoilación N-terminal es también una característica conservada de todas las proteínas Z de los arenavirus y es requerida para sus funciones biológicas (Perez *et al.*, 2004). El ácido mirístico facilita el anclaje de Z a la membrana, su orientación intracelular y la interacción de Z con otras proteínas de arenavirus (Capul *et al.*, 2007). Aunque la importancia de la N-miristoilación en la función de la proteína Z está bien documentada, el mecanismo o mecanismos moleculares por los cuales el ácido mirístico actúa dentro de las diversas funciones de Z aún no se ha dilucidado completamente.

En cuanto al dominio RING *finger* central, los estudios estructurales de la proteína Z de LASV revelaron que los sitios de unión a zinc, sitio I y II, se encuentran en lados opuestos del dominio. Esta disposición genera superficies estructuralmente diferentes a través de las cuales se piensa que este dominio actúa como una plataforma para la interacción de Z con diversas proteínas celulares y virales. Aunque la disposición de los aminoácidos alrededor del sitio I es muy similar a la estructura de los dominios RING conocidos, la conformación alrededor del sitio II es una característica actualmente exclusiva de las proteínas Z de arenavirus (Volpon *et al.*, 2010). Actualmente se desconoce si esta conformación es la base de algunas de las características únicas de Z. El dominio RING (particularmente el sitio I) también ha demostrado ser muy importante para el autoensamblado correcto de Z, como se ejemplifica por la capacidad de un dominio aislado de LCMV RING para formar estructuras esféricas *in vitro* (Kentsis, Gordon and Borden, 2002a, 2002b).

Por último, el C-terminal posee los dominios tardíos que le dan a Z su capacidad directora de la brotación viral hacia el final del ciclo infectivo. Estos dominios tardíos son pequeños motivos de cuatro residuos de longitud que se han identificado en las proteínas de matriz de varios virus de ARN envueltos y en las proteínas Gag de retrovirus. Los dominios tardíos median la interacción proteína-proteína entre las proteínas virales y la maquinaria molecular de transporte endosomal (ESCRT) (Freed, 2002). Todas las proteínas Z de arenavirus llevan los dominios tardíos del tipo P [T / S] AP y PPPY en su C-terminal. Sin embargo, varían entre las especies de virus OWA y NWA tanto en su número como en su posición relativa.

En resumen, la proteína Z de arenavirus contiene varios dominios y motivos conservados que, junto con su alta flexibilidad conformacional, permiten que Z interactúe con diferentes péptidos virales y celulares.

I.2.4.III.B. Z como reguladora de la transcripción y la replicación

Estudios realizados con un minigenoma de TCRV sugieren que la proteína Z no es esencial para la transcripción y la replicación del genoma viral. Sin embargo, la coexpresión de Z reveló un efecto inhibitorio sobre ambas (López, Jácamo and Franze-Fernández, 2001).

Se han observado resultados similares usando un sistema de genética reversa de LCMV, en el que Z no se requirió para la transcripción y replicación del minigenoma de LCMV, pero inhibió fuertemente la expresión de minigenomas de LCMV de manera dosis dependiente (Cornu and De la torre, 2001).

Las primeras pistas sobre el mecanismo molecular que Z utiliza para inhibir la transcripción y la replicación surgieron de la observación de que la proteína Z de TCRV interactuaba directamente con la proteína

L (Jácamo *et al.*, 2003), planteando la posibilidad de que esta interacción podría regular negativamente la replicación y transcripción dependiente de L. La actividad inhibitoria de LCMV y LASV Z requiere un dominio RING intacto, mientras que los residuos N y C-terminal no son esenciales para esta función (Capul, de la Torre and Buchmeier, 2011). Dado que la proteína L conserva sus propiedades de unión a ARN mientras interacciona con Z, se cree que la interacción entre ambas proteínas es importante para el proceso de reclutamiento de segmentos de ARN viral durante el ensamblaje de los viriones.

I.2.4.III.C. Interacción entre Z y GP-C

Para asegurar el reclutamiento de las proteínas y el genoma viral a áreas específicas de la membrana plasmática en las que se concentran las espículas del GP-C, la producción de partículas infecciosas requiere un proceso altamente organizado y bien coordinado de interacciones entre las proteínas virales durante el ensamblaje. Dado que el complejo de glicoproteína media tanto la unión de células diana como la posterior fusión de la membrana viral y celular durante la entrada, la incorporación del GP-C en los viriones es esencial para la continuidad de la infección.

Las glicoproteínas de arenavirus se sintetizan como un precursor inactivo preGP-C que es proteolizado co-translacionalmente por una peptidasa señal (SPasa) en el SSP y las glicoproteínas (Eichler *et al.*, 2004). La proteólisis postraducciona de las glicoproteínas por la proprotein convertasa celular del huésped SKI-1 (*subtilisin kexin isozyme-1*), finaliza la maduración del complejo GP-C, y da como resultado la generación de la subunidad de unión a receptor distal (G1) y la subunidad competente de fusión de transmisión transmembrana (G2). Dado que sólo las subunidades proteolizadas maduras del GP-C se incorporan en viriones, el procesamiento proteolítico del complejo

es absolutamente necesario para la producción de partículas infecciosas (O. Lenz *et al.*, 2001).

De esta forma, se ha determinado que el GP-C y Z son capaces de interactuar en VLPs (Schlie *et al.*, 2010), aún en ausencia de otras proteínas virales, lo cual es coincidente con la organización estructural en las partículas de arenavirus observada mediante microscopía crioelectrónica (Neuman *et al.*, 2005). El ensamblaje de partículas virales tiene lugar en la membrana plasmática, por lo que la morfogénesis del virión requiere la co-localización de las proteínas del GP-C y Z en el sitio de brotación viral. Estudios de mutagénesis dirigida en el residuo sustrato de la N-miristoil-transferasa de Z, demostraron que la interacción entre GPC/Z disminuyó debido a su localización subcelular pero no fue anulada (Capul *et al.*, 2007). Si bien la miristoilación N-terminal de Z es crítica para la interacción GP-C/Z, el mayor impacto generado a partir de su modificación se produce sobre su anclaje a la membrana.

I.2.4.III.D. Brotación viral mediada por Z

Los arenavirus son liberados de las células huésped por brotación. Los pasos finales previos a la liberación del virus implican la envoltura de la ribonucleocápside viral por la membrana plasmática de las células huésped que aloja espículas maduras de GP-C, seguido por un evento de fisión de membrana durante el cual el virión naciente se separa de la célula. La proteína Z es la proteína directora de este proceso. Por un lado, media todos los eventos esenciales de ensamblaje de viriones que aseguran el empaquetamiento de todos los componentes virales requeridos para la infectividad, mientras que por otro lado, facilita las interacciones necesarias para crear las partículas (Strecker *et al.*, 2003).

El proceso de brotación viral es un mecanismo que los virus envueltos han desarrollado a partir de la imitación de los procesos celulares naturales para la formación de vesículas. Para esto, han incorporado “dominios tardíos” en sus proteínas de matriz capaces de interactuar con la maquinaria molecular de tránsito vesicular. Estos dominios tardíos o LD (del inglés, *late domains*) son motivos secuenciales de cuatro residuos descubiertos mediante mutagénesis dirigida en el C-terminal de las proteínas de matriz virales. Cuando se inducía una mutación en alguno de sus residuos, el ensamblaje de la progenie viral no ocurría y los viriones nacientes eran incapaces de escindirse de la membrana celular (Bieniasz, 2006). El estudio de estos motivos comenzó dentro de la familia de retrovirus, donde se caracterizaron las siguientes secuencias: YPXL, PTAP y PPXY, donde X representa cualquier aminoácido. Consecuentemente estos motivos fueron descritos en otras familias virales (*Filoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Arenaviridae*), observándose su relación con el proceso de brotación viral (Garrus *et al.*, 2001). El motivo PTAP fue descrito por primera vez en la proteína p6gag del virus del HIV y se observó que interactúa con la proteína Tsg101 (del inglés *tumor susceptibility gene 101*), un componente de la maquinaria de transporte vesicular o ESCRT (del inglés *endosomal sorting complexes required for transport*). Pérez y colaboradores (Perez, Craven and de la Torre, 2003) demostraron que la inhibición de Tsg101 por ARN de interferencia (ARNi) producía una disminución significativa en la brotación de LCMV, con un fenotipo similar al observado en los mutantes defectivos en los dominios tardíos. Si bien la secuencia aminoacídica de LCMV no contiene el dominio PTAP, si posee un dominio rico en prolina (PSSP) en una ubicación similar. Estos datos junto con la co-localización de Z y Tsg101, fueron los primeros indicios de la participación de factores celulares del transporte vesicular en el mecanismo de brotación de los arenavirus. Por otro lado, el motivo PPXY, presente en la mayoría de

los OWA (**Figura 2.3**), es capaz de unirse a las proteínas ubiquitin-ligasa Nedd-4 y similares.

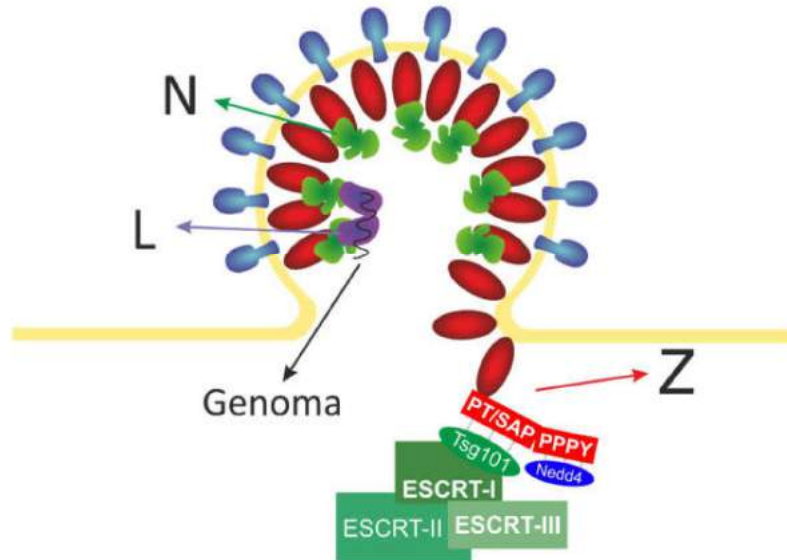


Figura 2.3: Modelo de ensamblaje y brotación mediados por Z. Los dominios tardíos de Z (en rojo) interactúan con Tsg101 (componente del ESCRT-I) y con Nedd4, y recluta los demás componentes de la maquinaria molecular de tránsito endosomal que permiten la brotación de los viriones (ESCRT-II y ESCRT-III, ambos en diferentes tonos de verde). Otro componente importante requerido para la brotación viral es la ATPasa Vps4 (no mostrada en la figura); el modelo se muestra completo, con ambos dominios tardíos interactuando con el ESCRT como ocurre en OWA; los NWA solo poseen la secuencia PT/SAP.

Un dato importante sobre los dominios tardíos es su capacidad para funcionar como unidades autónomas. Es decir, que son capaces de promover la brotación viral aun cuando son expresados en un contexto proteico diferente, y en posiciones no naturales dentro de una proteína.

I.2.4.III.E. Z como proteína generadora de VLPs

Como se detalló anteriormente, la proteína Z es la proteína de matriz arenaviral directora del ensamblaje y brotación de los viriones hacia el final del ciclo infeccioso. Se ha documentado que la expresión de Z en cultivos celulares induce la brotación de VLPs de manera

autónoma aún en ausencia de las otras proteínas virales y es capaz de retener dicha función incluso en fusiones proteicas (Capul and de la Torre, 2008). En trabajos realizados en nuestro laboratorio se demostró que la proteína Z de JUNV también es capaz de retener su función generadora de VLPs cuando se fusiona la misma a la proteína indicadora GFP e incluso dichas VLPs fueron capaces de inducir inmunidad humoral en ratones inoculados (Borio *et al.*, 2012).

Uno de los usos potenciales de las VLPs arenavirales es el de generar vacunas o plataformas vacunales. Branco y colaboradores (Branco *et al.*, 2010) desarrollaron una vacuna contra LASV basada en VLPs generadas por la proteína Z de dicho virus. Asimismo, en nuestro laboratorio se analizó la fusión de Z de JUNV a dos péptidos conservados de la proteína de la envoltura de DENV y se demostró la capacidad de las VLPs recombinantes de inducir una respuesta humoral en un modelo animal (Mareze *et al.*, 2016).



Sección II

Objetivos e

Hipótesis

La expresión de la proteína Z del virus Junín asociada a proteínas heterólogas, tanto por fusión de los marcos de lectura como por asociaciones intermoleculares, permite la generación de vesículas mediante brotación con gran potencial para la presentación de antígenos, siendo posible estudiar la respuesta inmune *in vivo*.

II.I. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es caracterizar la capacidad de dirigir la brotación de Z cuando se fusiona a proteínas de diferente naturaleza, o a través de la asociación natural con los elementos mínimos de JUNV que dan lugar a la exposición del GP-C.

II.II. Objetivos específicos

1. Diseñar y optimizar una herramienta molecular para ser utilizada como plataforma molecular generadora de VLPs con capacidad de presentar antígenos (pResAg).
2. Explorar las características y la capacidad de Z en el proceso de brotación a través de la fusión a otros ORFs o mediante la co-expresión con elementos mínimos de GP-C, a través del sistema pResAg.

II.III. Hipótesis de trabajo

La proteína Z de JUNV junto a los elementos mínimos del GP-C tiene la capacidad de impulsar la formación de VLPs que presenten en su superficie residuos proteicos heterólogos con el objeto de ser empleados para el estudio de respuestas inmunes específicas,

constituyendo así una plataforma de presentación de antígenos con potencial vacunal.



Sección III

**Desarrollo de
herramientas y
diseño de las
estrategias de
trabajo**

Esquema de la presentación de resultados

En los capítulos anteriores se mencionaron trabajos realizados en nuestro laboratorio sobre la caracterización y análisis de la función de la proteína Z de JUNV (Goñi *et al.*, 2010; Borio *et al.*, 2012; Bergier, 2016; Mareze *et al.*, 2016). Este trabajo doctoral forma parte de dicha línea de investigación donde se profundizó el estudio de sistema de vehiculización antigénica mediante la fusión al extremo C de la proteína Z. Es así que en el **Capítulo 3** se resumen los resultados preliminares de la evaluación de la respuesta inmune celular inducida por las VLPs_{Z-GFP} (Borio *et al.*, 2012). En los **Capítulos 4 y 5** se analizó la capacidad de Z para conservar la dirección de la brotación y consecuente generación de VLPs tras su fusión con diferentes antígenos. Es importante aclarar que las proteínas de Rotavirus y del virus del sarampión utilizadas en dichos capítulos fueron seleccionadas debido a una colaboración con el Laboratorio de Inmunología y Virología (LIV) de nuestra Universidad, en el marco de la ejecución de un subsidio de investigación (PICT).

Posteriormente, se diseñó y construyó un sistema de vehiculización de proteínas (pResAg) en forma de VLPs donde Z ocupa una vez más el rol central como impulsora de la brotación. Esta plataforma fue diseñada y desarrollada a partir de componentes del GP-C de JUNV capaces de anclar proteínas heterólogas en la parte externa de membranas y de interaccionar con Z de manera no covalente, esto es, sin necesidad de fusionar antígenos foráneos al extremo C de Z. Es así que en el **Capítulo 6** se describe exhaustivamente este sistema, y posteriormente se procede a trabajar con una variante de las proteínas estudiadas previamente (H, **Capítulo**

7), y NS1 del virus de la encefalitis de Saint Louis (SLEV) (**Capítulo 8**).

Para finalizar, en el **Capítulo 9** se discuten los resultados obtenidos, las perspectivas a futuro para el sistema pResAg y se enumeran las conclusiones a las cuales se llegó en este trabajo doctoral.

Capítulo 3

Evaluación de la respuesta inmune celular inducida por VLPs_{SZ-GFP}

En trabajos previos en nuestro laboratorio, fue posible caracterizar la respuesta inmune humoral α -Z y α -GFP generada por las VLPs_{SZ-GFP} (Borio *et al.*, 2012). Debido a que la respuesta humoral es inducida por la activación de linfocitos B mediada por las células T-CD4+, un componente central de la respuesta inmune celular, es importante identificar y caracterizar la calidad de ésta última.

En este capítulo se describen los resultados preliminares de la evaluación de la respuesta inmune celular inducida por las VLPs_{SZ-GFP}. Para esto, se produjeron VLPs a mediana escala en células HEK-293T y se realizaron ensayos de inoculación en animales de laboratorio y de maduración en cultivos celulares de células dendríticas.

III.3.1. Introducción

III.3.1.1. Respuesta inmune

Existen dos tipos de respuesta inmune mayormente descriptas ante la invasión por parte de patógenos extraños: **1)** la inmunidad humoral, que incluye anticuerpos pre-existentes, linfocitos B de memoria y células plasmáticas; y **2)** la inmunidad celular, que abarca los linfocitos T-CD8+ y los linfocitos T-CD4+. Ambos tipos de inmunidad han evolucionado para proporcionar distintas funciones efectoras. Los anticuerpos pre-existentes en un organismo (no específicos) pueden unirse directamente a partículas virales, bacterias extracelulares y parásitos (Gourley *et al.*, 2004). Su función es proporcionar la primera línea de defensa mediante la neutralización u opsonización de patógenos invasores. Por otra parte, las células T no pueden reconocer patógenos libres sino que reconocen células infectadas interactuando con antígenos microbianos (péptidos) unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) clase I (células T-CD8+) o clase II (células T-CD4+) (Gourley *et al.*, 2004).

En el caso de las VLPs como inmunógenos, poseen efectos autoadjuvantes que son inherentes a su tamaño adecuado para la captación por las células dendríticas (DCs, del inglés *dendritic cells*) y para promover directamente la maduración y migración de DCs, esenciales para la respuesta inmune innata (Fifis *et al.*, 2004; Gamvrellis *et al.*, 2004). Estas DCs son un tipo de células presentadoras de antígenos (APC, del inglés *antigen presenting cells*) que activan los linfocitos T-CD4+ (o linfocitos T_H, del inglés *helpers*, ayudantes o accesorias), al procesar y presentar el antígeno en forma de péptidos en su MHC de clase II. Las VLPs también pueden ser

captadas y procesadas a través de la vía del MHC clase I para la activación de células T CD8+, esenciales para la eliminación de patógenos intracelulares. La capacidad de las VLPs para dirigir DCs es una ventaja importante de las vacunas de VLP, ya que ahora se entiende que la orientación de este tipo de células es esencial para activar las respuestas inmunes innatas y adaptativas (Gourley *et al.*, 2004).

Por otro lado, las VLPs que retienen sus regiones de unión al receptor son capaces de ingresar a las células a través de su receptor normal y son captadas por las APCs como antígenos exógenos para la presentación en MHC clase I, activando linfocitos T-CD8+.

III.3.1.1.A. Respuesta inmune celular

Después de la exposición al antígeno *in vivo*, las células T-CD8+ (linfocitos T-citolíticos o CTL, del inglés *cytolytic T lymphocyte*) proceden a responder a través de una secuencia ordenada de eventos desarrollando la inmunidad. Éstos incluyen una fase de expansión inicial en la que se genera un número significativo de efectores citotóxicos (linfocitos T-CD8+) y una fase de contracción subsiguiente en la que aproximadamente el 90% de estos mueren, dejando una población estable de células de memoria capaz de montar una respuesta secundaria rápida ante una segunda exposición al antígeno (Dutton *et al.*, 1998). El propósito principal de los linfocitos T-CD8+ es detectar las células infectadas a través de los péptidos presentados en sus MHC-I y luego eliminarlas directamente y/o producir citoquinas para inhibir el crecimiento microbiano. Por otro lado, la respuesta celular de células T-CD8+ induce la activación de los linfocitos T_H para que ejerzan sus funciones efectoras de eliminación de agentes extraños, proporcionen una retroalimentación positiva ayudando a la proliferación de células T-CD8+ mediante la activación de las APC y

activen los linfocitos B. Esto último desencadena la respuesta inmune humoral, donde los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos específicos y linfocitos B de memoria (Bourgeois *et al.*, 2002; Gourley *et al.*, 2004). La activación de linfocitos T mediada por VLPs ha sido documentada por Braun y colaboradores (Braun *et al.*, 2012) utilizando una VLP obtenida a partir del bacteriófago Qb unida covalentemente a un péptido largo derivado del autoanticuerpo Melan-A de melanoma. En todos los pacientes analizados, se encontraron fuertes respuestas de células T específicas para Qb que desencadenaron en la activación de linfocitos B maduros y una fuerte respuesta humoral ulterior (Braun *et al.*, 2012).

Para dar inicio a la respuesta humoral, los linfocitos B maduros al encontrar un antígeno y con la ayuda de los linfocitos T_H, se activan y comienzan a proliferar en las vainas linfoides periarteriales (PALS, del inglés *periarteriolar lymphoid sheaths*) del bazo y los ganglios linfáticos. Las células B activadas pueden continuar por una de las dos vías: **1)** permanecer en la zona marginal y diferenciarse en células plasmáticas de vida corta secretora de anticuerpos; o **2)** migrar a los folículos de células B y con las células T_H ayudar a iniciar un centro germinal (GC, del inglés *germinal center*). Dentro de la reacción del GC, las células B pueden sufrir hipermutación somática, maduración de afinidad y selección que resulta en la generación de células B de memoria de alta afinidad (Tarlinton & Smith 2000; McHeyzer-Williams *et al.*, 2001). Éstas últimas son las encargadas de proporcionar la inmunidad protectora luego de que el organismo haya sido vacunado contra un patógeno. Las células B de memoria pueden persistir durante muchas décadas después de la infección inicial o la vacunación. La re-exposición periódica al patógeno es un mecanismo que aumenta naturalmente el número de células B de memoria.

Está bien establecido que la ayuda de células T_H es necesaria para la reacción de GC, el desarrollo de células B de memoria y las respuestas de anticuerpos dependientes de células T. Los ratones

deficientes en células T_H o componentes de diferentes rutas de señalización dependientes de T_H (Kawabe *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 2003) han alterado severamente las respuestas humorales a los antígenos dependientes de células T con la incapacidad o la capacidad reducida para generar centros germinales y células B de memoria.

Es así que es necesario caracterizar y evaluar la calidad de la respuesta inmune celular inducida por las VLPs_{Z-GFP}, con el fin último de optimizar el sistema para la correcta inducción de una respuesta inmune completa mediante la vehiculización y presentación de antígenos a los diferentes efectores del sistema inmune celular.

III.3.2. Desarrollo de herramientas y estrategias de trabajo

Este trabajo se realizó en colaboración con la Dra. Alejandra Duarte del Laboratorio de Inmunología Experimental, IMEX-CONICET de la Academia Nacional de Medicina.

III.3.2.1 Producción de VLPs_{Z-GFP} a mediana escala

La producción de VLPs_{Z-GFP} se realizó según el protocolo estándar desarrollado previamente en nuestro laboratorio (Borio *et al.*, 2012) que implicó la transfección de células HEK-293T y la recolección periódica del sobrenadante (Sn) de cultivo durante diez días consecutivos. Con el fin de purificar las VLPs_{Z-GFP} a partir del Sn, este fue sometido a ultracentrifugación en colchón de sacarosa y resuspendido en 100 µl de PBS 1X. Este volumen fue fraccionado para los diferentes tratamientos en animales de laboratorio y para los cultivos de DCs.

III.3.2.1.A. Análisis de la expresión de Z-GFP

III.3.2.1.A.I. Visualización de Z-GFP mediante microscopía de fluorescencia convencional

Con el fin de confirmar la expresión de Z-GFP en las monocapas transfectadas, se procedió a la visualización mediante microscopía de fluorescencia convencional a las 48 hs postransfección (**Figura 3.1**)

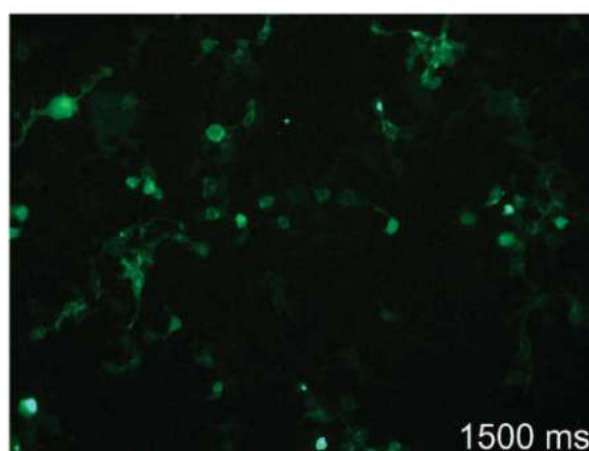


Figura 3.1: Visualización al microscopio de fluorescencia convencional de células expresando Z-GFP. Microfotografía de una monocapa luego de 48 hs de la transfección con pZ-GFP; aumento 40X; exposición: 1500 ms.

III.3.2.1.A.II. Inmunodetección con anticuerpos específicos y análisis de la estabilidad de las VLPsZ-GFP mediante ensayo de protección a proteasas.

Para corroborar la correcta expresión de Z-GFP y su presencia en el Sn, se realizó la inmunodetección mediante *Western Blot* (WB) con anticuerpos específicos α -Z (**Figura 3.2**).

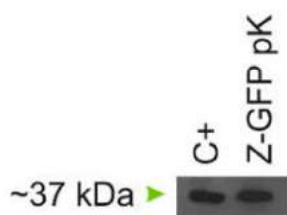


Figura 3.2: Inmunodetección de Z-GFP en el Sn de cultivo. C+ corresponde al Sn de cultivo purificado previo a la incubación con proteinasa K; Z-GFP pK: muestras incubadas con proteinasa K.

Luego de confirmar la expresión de Z-GFP mediante la visualización al microscopio óptico y la inmunodetección con anticuerpos específicos, los *pellets* de los Sn fueron tratados de manera tal que los restos proteicos presentes en esta fracción sean eliminados, teniendo en cuenta los posteriores ensayos de inoculación. Para esto, las muestras fueron sometidas a una incubación de una hora a 37°C en presencia de proteinasa K y nuevamente ultracentrifugadas. Esta segunda ronda de purificación se realizó tanto para eliminar los rastros de enzima que pudiesen quedar en las muestras, como para obtener las VLPs aisladas. Finalmente, se realizó un *WB* para confirmar que la proteína recombinante Z-GFP no haya sufrido proteólisis debido a su localización en el interior de las VLPs.

III.3.2.2 Ensayos de inoculación en animales de laboratorio

Se utilizaron ratones Balb/c machos de 6 semanas de edad. Los grupos de estudio estuvieron conformados por 5 animales, y los mismos fueron inoculados por vía intramuscular con 5 ug en 100 ul de cada uno de los tratamientos indicados a continuación: **G1:** PBS; **G2:** VLP_{Z-GFP}; **G3:** control de integridad de la inmunogenicidad de las VLP_{SZ-GFP} (tratadas con Tritón X-100 1%) y **G4:** proteína GFP purificada. El grupo **G3** es el control de inmunidad contra GFP, **G1** es el control negativo del ensayo y **G4** proteína GFP purificada (Borio *et al.*, 2012).

III.3.2.3. Análisis de respuesta de linfocitos T-CD4 y/o T-CD8

Para el análisis de la respuesta de los diferentes tratamientos en la activación de linfocitos T-CD4+ (T_H) y linfocitos T-CD8+ (CTL), 7 días post-inoculación los animales fueron sacrificados y se aislaron bazo y ganglios.

III.3.2.3.A. Marcación y medición celular

Una vez obtenidos los órganos, estos fueron disgregados mecánicamente (con tijera de cirugía) con la utilización de una malla metálica para separar las células aisladas. Para la determinación por citometría de flujo, se utilizaron un millón de células marcadas con los diferentes anticuerpos α -CD4 y α -CD8.

III.3.2.3.B. Análisis de resultados

A través del análisis de los resultados aquí mostrados, y si bien son parte de un trabajo preliminar, pudo verse la activación de los linfocitos T en diferentes tejidos, observando una tendencia positiva en la inducción de respuesta inmune por parte de las VLP_{SZ-GFP} frente a la proteína GFP purificada. En ambos casos, la activación de T_HS y CTLs fue más eficiente en los ganglios linfáticos (**Figura 3.3.B y D**).

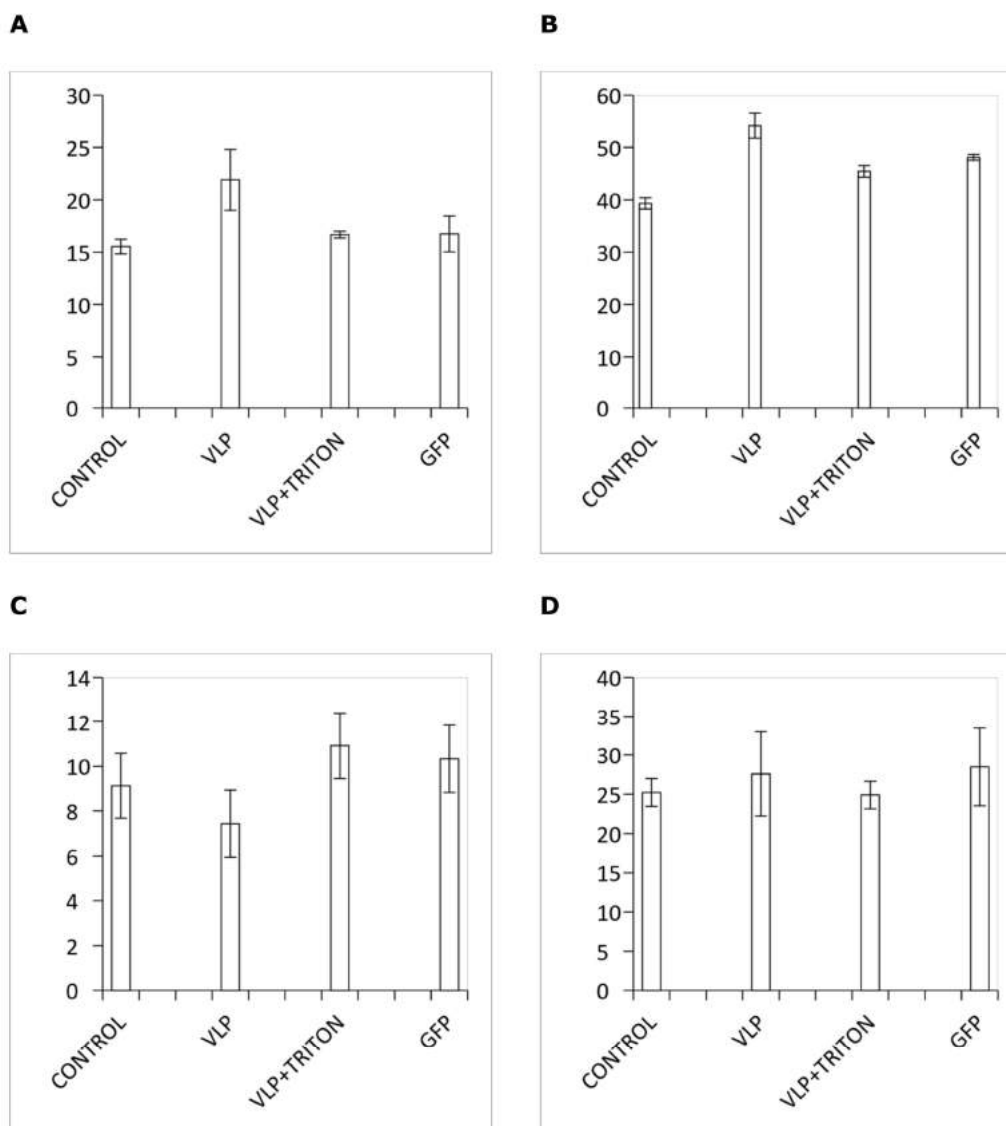


Figura 3.3: Respuesta inmune celular inducida por VLPs_{SZ-GFP}. **A-** activación de T_Hs en bazo; **B-** activación de T_Hs en ganglio; **C-** activación de CTLs en bazo; **D-** activación de CTLs en ganglio. Control: animal inoculado con PBS 1X. El eje Y representa el porcentaje de células marcadas detectadas por citometría

III.3.2.4. Generación y estimulación de DC

Los precursores de DC se obtuvieron a partir de médula ósea del fémur y tibia de ratones Balb/c de 6 semanas y se realizó la

diferenciación a DC en condiciones adecuadas de cultivo durante seis días.

Para la estimulación, se utilizaron un millón de DC incubadas con los diferentes tratamientos (**G1:** PBS; **G2:** VLP_{SZ-GFP}; **G3:** GFP purificada; **G4:** lipopolisacárido) durante 24 y 48 hs.

III.3.2.4.A. Marcación y medición de estimulación de DC

La evaluación de la estimulación de las DC se realizó evaluando los cambios de fenotipo en estas células. Asimismo, luego del marcado de las DC, el sobrenadante obtenido a partir del lavado se recolectó para realizar la medición de interleuquinas (datos no mostrados, trabajo en proceso).

Una vez más, la determinación de la estimulación de las DC marcadas con anticuerpos específicos fue realizada mediante citometría de flujo.

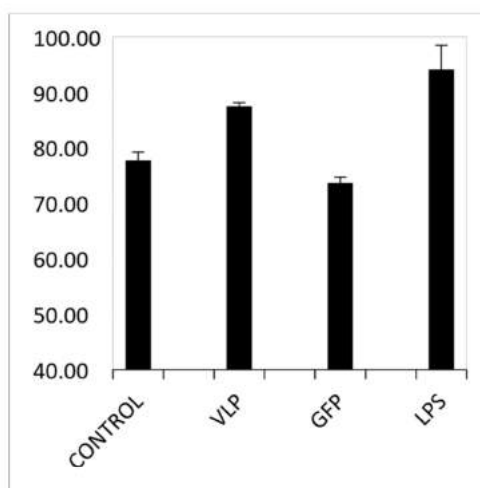


Figura 3.4: Estimulación de la maduración de DCs por VLP_{SZ-GFP}. El eje Y representa el porcentaje de células marcadas detectadas por citometría tras 24 horas de exposición a los antígenos.

III.3.2.4.B. Análisis de resultados

Como se observa en el **Figura 3.4**, fue posible detectar la estimulación de las DCs 24 hs después de la exposición a las VLPs. Se observa asimismo que la estimulación es más eficaz y veloz cuando las proteínas son vehiculizadas en partículas frente a la estimulación inducida por las proteínas solubles.

III.3.3. Discusión y conclusiones

La memoria inmunológica se caracteriza por la capacidad de responder de forma específica y más rápidamente en un encuentro posterior con un patógeno o antígeno. Esta respuesta rápida y específica es la base para la vacunación. El desarrollo de VLPs como vehículos para antígenos foráneos busca ofrecer alternativas que induzcan esta memoria inmunitaria de manera más completa, incluyendo tanto la respuesta inmune celular como la humoral.

Basándonos en la respuesta inmune humoral generada por las VLP_{SZ-GFP} en trabajos previos en nuestro laboratorio (Borio *et al.*, 2012) y teniendo en cuenta que este tipo de respuesta es activada únicamente por los linfocitos T_H (Gourley *et al.*, 2004), en este capítulo se evaluó la inducción por parte de las VLP_{SZ-GFP} de estos y otros componentes de la respuesta inmune celular.

Los resultados aquí presentados son preliminares y se planea profundizar el análisis de la activación linfocitaria utilizando diferentes anticuerpos para el seguimiento más minucioso por inmunomarcado. Asimismo, fue posible observar la activación de los CTD y de los T_H en los diferentes tejidos analizados e incluso se podría inferir una preferencia en el procesamiento de las VLPs en los ganglios linfáticos (**Figura 3.3**) ya que allí se detectó la mayor activación linfocitaria para ambos tipos celulares.

En cuanto al análisis de la maduración de las DCs inducida por las VLPs_{Z-GFP}, se observó que el procesamiento antigénico mediado por las DCs es más eficiente y rápido cuando los antígenos son vehiculizados en VLPs frente a la proteína soluble.

Es así que, si bien los análisis deben realizarse con mayor nivel de detalle sobre el tipo de respuesta inmune celular inducida, fue posible concluir que las VLPs_{Z-GFP} inducen una respuesta inmune tanto celular como humoral convirtiéndolas en una herramienta útil para el desarrollo de plataformas vacunales basadas en VLPs generadas por la actividad de la proteína Z de JUNV.

Capítulo 4

Vehiculización del dominio CD4 de la proteína VP6 de Rotavirus en VLPs_Z

En este capítulo se describe la estrategia diseñada con el fin de vehicular el dominio CD4 de la proteína VP6 de Rotavirus en VLPs generadas por la actividad de la proteína Z de JUNV. El dominio CD4 comprende una región de la proteína VP6 que presenta un alto grado de inmunogenicidad y fue identificado utilizando técnicas de vacunología inversa. Su importancia a nivel serológico radica en que la respuesta humoral generada α -VP6 es protectora en modelos animales.

El objetivo principal de su vehiculización fue, por un lado, caracterizar la estabilidad de Z al ser fusionada a este antígeno y, por otro lado, evaluar la capacidad de CD4-VP6 de generar protección en ratones.

III.4.1. Introducción

III.4.1.I. Rotavirus

Los rotavirus del grupo A (RVA, del inglés *Rotavirus A*) provocan unos 125 millones de casos y alrededor de 600.000 muertes al año en todo el mundo (Parashar *et al.*, 2006; Howley and Lowy, 2007). Virtualmente todos los niños se infectan con rotavirus en los primeros años de vida y, a pesar de que la mayoría de las infecciones causan diarrea leve, del 15 al 20% de los casos requieren tratamiento clínico, y del 1 al 3% requieren hospitalización por deshidratación severa (Yee *et al.*, 2006). Se estima que más del 80% de las muertes ocurren en regiones pobres y se asocian con una inadecuada o tardía atención médica y desnutrición (Parashar *et al.*, 2003). El alto número de muertes en países en desarrollo y los altos costos médicos y sociales que genera la enfermedad hacen de los rotavirus un blanco de preferencia para el desarrollo de vacunas (Dennehy, 2008). No obstante la existencia en el mercado de dos vacunas, los problemas de cobertura y, sobre todo la necesidad de reducir los costos a través de desarrollos originados en países periféricos indican la conveniencia de generar alternativas (Ward and McNeal, 2010).

III.4.1.I.A. Características generales de rotavirus

Los rotavirus (RV, del inglés *rotavirus*) constituyen un género dentro de la familia *Reoviridae*. Las partículas virales son pleomórficas de aproximadamente 75 nm de diámetro y poseen tres capas proteicas sin envoltura lipídica: **1)** una cubierta externa constituida por las proteínas VP4 y VP7; **2)** una capa intermedia formada por la proteína

VP6; y **3**) un *core* compuesto por la proteína VP2 y pequeñas cantidades de VP1 y VP3 asociadas al genoma (**Figura 4.1**).

El genoma viral consiste en 11 segmentos de RNA doble cadena, seis de los cuales codifican las seis proteínas estructurales mencionadas mientras que los cinco restantes codifican seis proteínas no estructurales (NSP1 a NSP6) (Parashar *et al.*, 2006; Howley and Lowy, 2007).

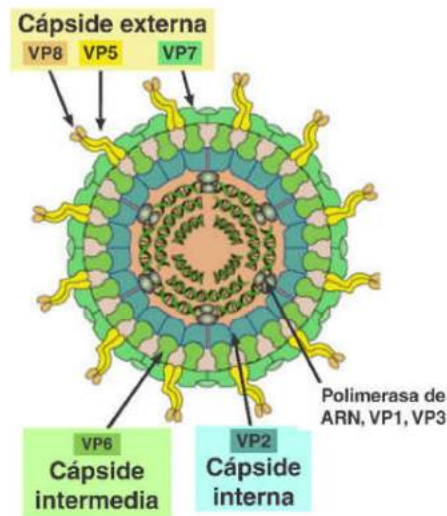


Figura 4.1: Diagrama del virión de Rotavirus. Se detallan las proteínas que conforman las tres cápsides y el genoma viral en asociación con la más interna de ellas.

III.4.1.I.B. Características antigénicas de rotavirus

Los rotavirus poseen tres especificidades antigénicas importantes que definen grupo, subgrupo y serotipo. Los epítopes que definen el grupo y subgrupo son contenidos principalmente en la proteína VP6, la proteína predominante y altamente inmunogénica. En la actualidad se conocen siete grupos diferentes (A-G): los grupos A, B y C se han detectado tanto en humanos como en animales mientras que los grupos D, E, F y G sólo se han detectado en animales. De los tres serogrupos de rotavirus que afectan al ser humano, se estima que un

95% de la morbilidad y mortalidad es ocasionada por el grupo RVA, por lo que los esfuerzos para el desarrollo de vacunas están dirigidos a la protección contra el mismo.

Los rotavirus dentro de un grupo se clasifican en serotipos definidos por las dos proteínas de la cápside externa, VP4 y VP7 ya que los anticuerpos que inducen tienen actividad neutralizante en cultivo. Debido a la posibilidad de segregación independiente de los segmentos genómicos de VP4 y VP7 durante infecciones mixtas, la clasificación en serotipos es dual y se habla entonces de serotipo P (VP4) y serotipo G (VP7). Actualmente, por razones metodológicas, se prefiere la utilización de técnicas moleculares y la identificación de genotipos en los estudios epidemiológicos. Hasta el momento se han identificado 19 genotipos G y 27 genotipos P (Matthijnsens *et al.*, 2008), de estos, once genotipos G y doce genotipos P fueron, al menos una vez detectados en humanos. De la gran diversidad sero/genotípica dentro de los RVA sólo cinco tipos G y tres tipos P representan más del 90% de las cepas tipificadas en humanos aunque las variaciones temporales y geográficas son muy importantes (Santos and Hoshino, 2005) y, en este sentido, es necesario resaltar que muchos diseños de vacunas requieren de la incorporación de varios serotipos para aumentar su efectividad.

III.4.1.I.B.1. Vacunología inversa: el dominio CD4 de VP6

El dominio CD4 fue diseñado y caracterizado por Choi y colaboradores mediante el mapeo funcional de la proteína VP6 (Choi *et al.*, 2000). Su trabajo se basó en estudios previos donde se describió que VP6 es la proteína más inmunogénica y es capaz de inducir inmunidad protectora en modelos animales.

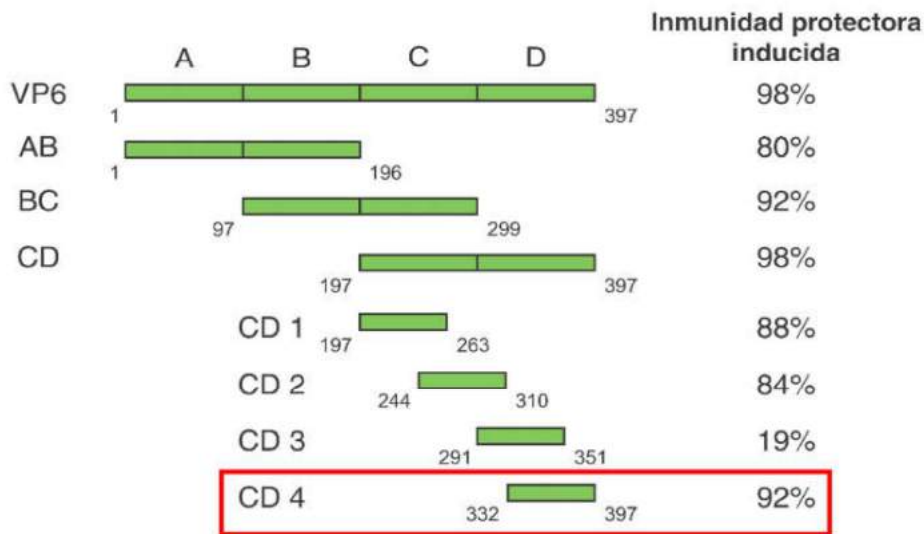


Figura 4.2: Esquema de la estrategia utilizada para el mapeo funcional de VP6 y la caracterización del dominio CD4. Se detallan los tamaños de los diferentes péptidos diseñados utilizando técnicas de vacunología inversa junto al porcentaje de protección inducida en ratones de laboratorio. Como se observa en el recuadro rojo, CD4 es la región más inmunogénica de VP6 con potencial vacunal.

La estrategia utilizada fue dividir en cuatro regiones (A, B, C y D) la secuencia completa de VP6 para posteriormente diseñar y generar tres péptidos sintéticos: AB, BC y CD. Tras la expresión y purificación de dichos péptidos, se evaluó la respuesta inmune generada por cada uno y se seleccionó el péptido CD por ser el más inmunogénico. Finalmente, CD fue dividido en cuatro regiones (1, 2, 3 y 4) para generar los péptidos sintéticos CD1, CD2, CD3 y CD4. El análisis de la respuesta inmune generada por cada uno arrojó diferentes resultados, siendo el dominio CD4 el que indujo una mayor inmunidad protectora en ratones desafiados (**Figura 4.2**).

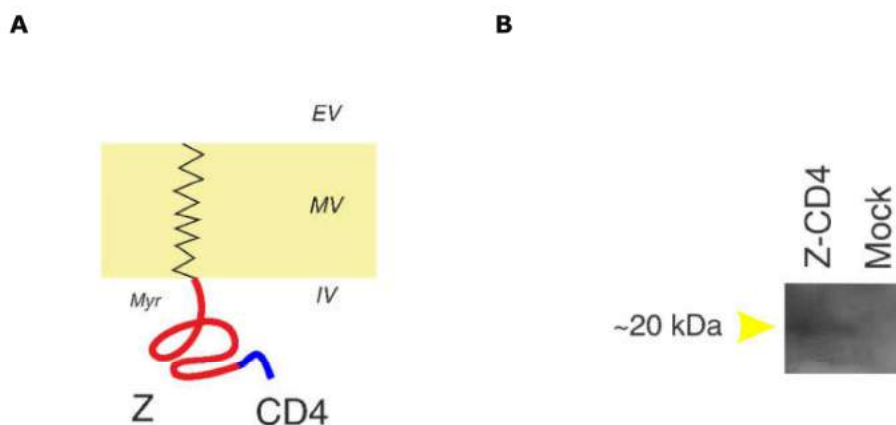


Figura 4.3: Análisis de la expresión de pZ-CD4. **A-** Representación esquemática de la sección transversal de una VLP_{Z-CD4} conteniendo la proteína recombinante Z-CD4 ancladas a su membrana. *EV*: exterior de la VLP; *MV*: membrana de la VLP; *IV*: interior de la VLP; **B-** *WB* con anticuerpos específicos α -Z del sobrenadante de cultivo purificado; la flecha amarilla señala la banda correspondiente al peso molecular de Z-CD4; solo se muestra el control *Mock* de células sin transfectar. Los anticuerpos fueron utilizados 1/2000 (α -Z).

III.4.2. Desarrollo de herramientas y estrategias de trabajo

III.4.2.I. Vehiculización de CD4 en $VLP_{S_{Z-CD4-GFP}}$

El diseño de la estrategia de vehiculización de CD4 en $VLP_{S_{Z}}$ y el trabajo descrito en este capítulo fue realizado en colaboración con la Dra. Cristina S. Borio de nuestro laboratorio.

El vector de expresión pZ-CD4 da lugar a la expresión de una proteína quimérica de aproximadamente 20 kDa, mientras que el plásmido pZ-CD4-GFP expresa una proteína de aproximadamente 44 kDa (Bergier, 2016).

III.4.2.II. Análisis de la expresión

Los plásmidos fueron transfectados en células HEK-293T y COS-7. Cada muestra fue procesada separando dos fracciones: monocapa (M) y sobrenadante (Sn) de cultivo. En esta última se espera detectar las proteínas recombinantes y la proteína Z contenidas en VLPs quiméricas. La fracción M fue analizada en todos los casos como control de expresión, ya que en las células deberían detectarse tanto las proteínas expresadas completas aún no vehiculizadas, como los intermediarios siendo traducidos al momento de la cosecha celular. El control de transfección y generación de VLPs fue pZ-GFP, un vector construido en nuestro laboratorio (Borio *et al.*, 2012). En todos los casos las muestras Sn fueron sometidas a ultracentrifugación en colchón de sacarosa con el fin de purificar las VLPs.

III.4.2.II.A. pZ-CD4

Las muestras fueron procesadas y tras una corrida electroforética, se realizó la inmunodetección con sueros policlonales α -Z (1/2000) y α -Rotavirus (1/500). Se logró detectar la presencia de la proteína Z-CD4 sólo en el Sn utilizando α -Z (**Figura 4.3.B**). Sin embargo, el tamaño es el esperado para la proteína recombinante.

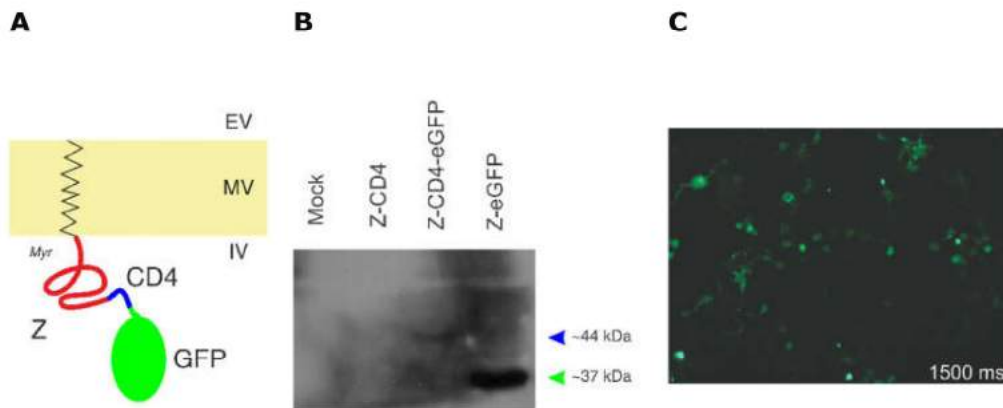


Figura 4.4: Análisis de la expresión de pZ-CD4-GFP. **A-** Sección transversal de una VLP_{Z-CD4-GFP} conteniendo la proteína recombinante Z-CD4-GFP anclada a su membrana. EV: exterior de la VLP; MV: membrana de la VLP; IV: interior de la VLP; **B-** *Western Blot* con anticuerpos específicos α -Z de la monocapa de cultivo; la flecha verde señala la banda correspondiente al peso molecular de Z-GFP utilizado como control; la flecha azul señala el tamaño de la proteína recombinante Z-CD4-GFP; Z-CD4 no fue detectada en la monocapa de cultivo en este ensayo; solo se muestra el control *Mock* de células sin transfectar. Los anticuerpos fueron utilizados 1/2000 (α -Z) en BD; **C-** Visualización mediante microscopía de fluorescencia de la expresión de Z-CD4-GFP en una monocapa de cultivo 48 hs postransfección; la captura se realizó con una exposición de 1500 milisegundos y 40X de aumento; en las monocapas de los controles sin transfectar no se observó fluorescencia y si se observó la presencia en el control Z-GFP (no mostrados en la figura).

III.4.2.II.B. pZ-CD4-GFP

Las muestras fueron procesadas y tras una corrida electroforética, se realizó la inmunodetección con sueros policlonales α -Z (1/2000), α -GFP (1/500) y α -Rotavirus (1/500). Se logró detectar la proteína Z-CD4-GFP en la monocapa de cultivo pero no así en el Sn cuando se utilizó suero policlonal α -Z (**Figura 4.4.A**). En ensayos reiterados con α -GFP se detectaron bandas únicas de tamaños que podrían corresponderse a multímeros de la proteína no resueltos por el procesamiento de las muestras previo a la corrida electroforética (no mostrados). Tanto para Z-CD4 como para Z-CD4-GFP, no se

detectaron las proteínas cuando se utilizó suero α -Rotavirus (datos no mostrados).

Finalmente, fue posible observar fluorescencia utilizando un microscopio óptico de fluorescencia convencional en aquellas monocapas transfectadas con Z-CD4-GFP (**Figura 4.4.C**).

III.4.2. Discusión y conclusión

Choi y colaboradores utilizaron la estrategia de mapeo funcional de VP6 utilizando la cepa del rotavirus murino EDIM (Choi *et al.*, 2000). En un ensayo de inmunización intranasal con VP6 expresada en *E. coli* observaron que se estimulaba una protección casi completa. La protección dependía de la inclusión de un adyuvante mucosal durante la inmunización. Basándose en la posibilidad de que los resultados obtenidos con la proteína VP6 en este modelo de ratón puedan ser útiles en el desarrollo de una vacuna de rotavirus humano, diseñaron una estrategia utilizando herramientas de vacunología inversa para determinar qué regiones de la proteína VP6 estimulan la protección. Aunque las primeras, medias y últimas partes de VP6 estimularon una excelente protección en este modelo, el último 50% (es decir, la región CD) fue significativamente más protector que el primer 50% (es decir, la región AB) de esta proteína. Cuando se delimitaron los epítopes protectores dentro de la región CD utilizando dos conjuntos de cuatro fragmentos de proteína superpuestos fue posible identificar regiones protectoras y no protectoras. Los fragmentos CD1, CD2 y CD4 eran protectores, mientras que CD3 no (**Figura 4.2**).

Para aumentar la inmunogenicidad, los péptidos que contienen epítopes de células B se suelen acoplar a proteínas portadoras que contienen epítopes de células T (Sun *et al.*, 1999). Varios estudios han encontrado que la síntesis de epítopes de células T contiguos con epítopes de células B también aumenta la inmunogenicidad de los

epítopes de células B (Volpina *et al.*, 1999). La extraordinaria magnitud de protección proporcionada por la porción CD4 de VP6 podría estar mediada por el epítope de células T CD41 y no requerir epítopes como los reconocidos por receptores de inmunoglobulina específicos en células B (Choi *et al.*, 2000).

Basándose en este contexto, en nuestro laboratorio la Dra. Cristina S. Borio diseñó una estrategia para vehicular el dominio CD4 en VLPs_Z con quien se trabajó en colaboración. Los análisis aquí descritos fueron los resultados preliminares de esta estrategia, habiéndose evaluado anteriormente la respuesta inmune inducida en un modelo animal por una vacuna de ADN basada en el vector pZ-CD4 (Bergier, 2016).

En este capítulo se detalló la detección con anticuerpos específicos de las proteínas recombinantes Z-CD4 y Z-CD4-GFP generadas en un cultivo de células eucariotas. Si bien la inmunodetección fue débil para las células transfectadas con pZ-CD4, esto podría estar relacionado con la citotoxicidad de este dominio de VP6 o bien que la fusión del mismo al extremo C-terminal de Z no modifica la función inhibitoria de la transcripción a través de su dominio RING *finger*. Sin embargo, se detectó la expresión de Z-CD4-GFP e incluso se fotografiaron monocapas fluorescentes transfectadas. La observación de fluorescencia en las células transfectadas con pZ-CD4-GFP podría sugerir que GFP confiere estabilidad a la fusión proteica Z-CD4 y disminuye la capacidad inhibitoria de la transcripción de Z, como ya fue observado y documentado previamente en la fusión Z-GFP.

Capítulo 5

Vehiculización de la hemaglutinina del virus del sarampión en VLPs_Z

En este capítulo se detallan las diferentes estrategias diseñadas con el fin de vehiculizar la proteína hemaglutinina (H) del virus del sarampión (MeV, del inglés *Measles Virus*), una glicoproteína estructural del virión, que cumple un rol central en la interacción con el receptor celular. Su importancia a nivel serológico radica en que a través de la respuesta humoral generada (α -H) se impide la entrada del virus a la célula huésped, evitando la infección.

Estas estrategias abarcan las siguientes alternativas: **a)** fusión entre el extremo C de Z y el extremo N de H en un único marco de lectura; y **b)** el clonado de ambas proteínas en vectores independientes y la co-transfección de los mismos.

El objetivo principal que se persigue a través de la generación de estas herramientas moleculares, es establecer estrategias de presentación de antígenos alternativas a las estudiadas hasta el momento para ésta proteína, así como la caracterización de este sistema. Posteriormente, se espera evaluar la capacidad de H para generar protección ante el desafío de la infección viral en ratones inoculados con las diferentes VLPs generadas.

III.5.1. Introducción

III.5.1.I. El virus del sarampión (MeV)

El sarampión es una enfermedad causada por el virus del mismo nombre que forma parte del género *Morbillivirus*, en la familia *Paramyxoviridae*. Aunque actualmente, gracias a los eficientes programas de vacunación, la enfermedad está desapareciendo en los países desarrollados, aún es común en países en vías de desarrollo (Hersh *et al.*, 2000). A nivel global, es un factor importante de morbilidad y mortalidad infantil, principalmente por la inmunosupresión transitoria que se produce durante el curso de la enfermedad y a las severas complicaciones generalmente asociadas a ella.

La sintomatología del sarampión se manifiesta inicialmente por un cuadro febril de 2 a 4 días de duración, junto con decaimiento, tos y coriza, y en ciertos casos puede presentarse conjuntivitis y bronquitis. Finalizada esta etapa prodromal, las manifestaciones clínicas típicas del sarampión comienzan a detectarse en la mucosa bucal, llamadas manchas de Koplik (Howley and Lowy, 2007) y luego aparece una erupción maculopapular que comienza por cubrir la cara y se esparce más tarde por el tronco y las extremidades. Generalmente, la recuperación clínica comienza luego de las erupciones. En algunos pacientes, pueden producirse complicaciones respiratorias (primarias y/o secundarias), gastrointestinales y neurológicas (Bonthius *et al.*, 2000; Anis-ur-Rehman *et al.*, 2008).

El plan de inmunización en vigencia en los países desarrollados está basado en el uso de formulaciones trivalentes para sarampión, paperas y rubéola, en diferentes combinaciones de cepas y/o dosis virales (Davidkin and Valle, 1998).

III.5.1.I.A. Respuesta inmune generada por MeV

El virus del sarampión induce tanto la respuesta inmune humoral como la mediada por células. El estudio de la respuesta de células T a antígenos de MeV durante la infección y luego de la vacunación ha contribuido al conocimiento de la inmunopatología producida por esta infección. El análisis *ex-vivo* de CTL en respuesta a antígenos de MeV (Jaye *et al.*, 1998), demostró que se producía una vigorosa respuesta de células T citotóxicas contra las proteínas estudiadas (H, F y N). Esta respuesta está mediada por ambos tipos de linfocitos T (CD4 y CD8) y son de curso transitorio, decayendo luego de las seis semanas posteriores a la infección, cuando se establece la memoria inmunológica.

Por otro lado, los anticuerpos α -MeV, juegan un rol importante al prevenir la infección neutralizando las partículas virales antes de su entrada a la célula, protegiendo al organismo (Chen *et al.*, 1990). En el laboratorio se utilizan métodos de rutina para el monitoreo de inmunidad basados en la detección de anticuerpos IgG específicos, sin embargo, altos títulos de anticuerpos no siempre se correlacionan con la protección mediada por células. Los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra las proteínas de superficie H y F, pueden ser medidos *in vitro* mediante ensayos de neutralización estándar o neutralización por reducción de placas (Giraudon and Wild, 1985). Los enzimoimmunoensayos (EIAs, del inglés *enzyme immunoassays*) utilizando el virus entero o proteínas recombinantes como antígenos, han sido ampliamente usados en la determinación de los niveles de anticuerpos IgG específicos de MeV. Experiencia previa con EIAs basados en el virus completo indican que los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de la partícula viral constituyen una herramienta de diagnóstico para determinar el grado de protección de individuos vacunados e infectados con este virus (Howley and Lowy, 2007). Ha sido demostrado que la nucleoproteína (N) es la proteína viral

inmunodominante, encontrándose altos títulos de anticuerpos α -N en sueros de individuos convalecientes y en sueros de individuos vacunados (Howley and Lowy, 2007). Asimismo, los anticuerpos α -N son los primeros en aparecer y por su abundancia relativa, la ausencia de ellos es un indicador de seronegatividad (Graves *et al.*, 1984; Laine *et al.*, 2003).

III.5.1.I.B. Estructura de MeV

El virión es pleomórfico, de entre 100 y 300 nm, está compuesto por una envoltura que contiene dos glicoproteínas ancladas a su membrana: la hemaglutinina (H) y la proteína de fusión (F). Asociada con la cara interna de la envoltura se encuentra la proteína de matriz (M). En el interior del virión, se encuentra la nucleocápside integrada por el genoma de ARN de simple cadena y polaridad negativa asociado a la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P) y la polimerasa (L) (Howley and Lowy, 2007) (**Figura 5.1**).

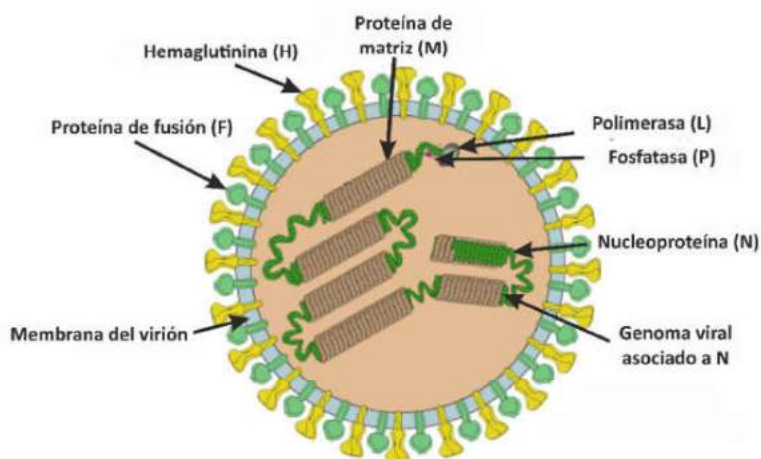


Figura 5.1: Diagrama del virión de MeV. Detalle de las proteínas que lo conforman y sus asociaciones entre sí y con el genoma viral.

III.5.1.I.C. La hemaglutinina de MeV

La hemaglutinina (H) es una glicoproteína de transmembrana de tipo II, de 617 aminoácidos, responsable de la interacción con el receptor celular. Se han identificado dos receptores celulares que interaccionan con H, CD46, una proteína regulatoria del complemento expresada en todas las células nucleadas (Naniche *et al.*, 1993), y SLAM (o CD150), una glicoproteína de 70 kDa expresada en las células del sistema inmune (**Figura 5.2.A**) (Tatsuo *et al.*, 2000).

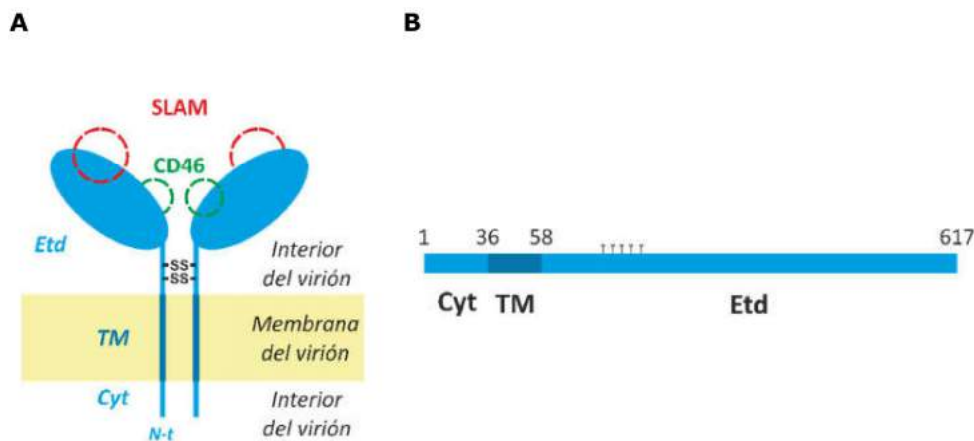


Figura 5.2: Características de la hemaglutinina de MeV. **A-** Dímero de hemaglutinina en la membrana del virión de MeV, se señalan los puentes disulfuro responsables de la dimerización; en rojo: sitio de unión a SLAM (CD150); en verde: sitio de unión a CD46. En la membrana del virión, estos dímeros interactúan entre sí de manera no covalente para formar tetrámeros. Modificado de (Colf, Juo and García, 2007; Brindley, Chaudhury and Plemper, 2014). **B-** Diagrama de la secuencia de la hemaglutinina, las Y señalan los sitios de N-glicosilación de la proteína. Modificado de (Moeller *et al.*, 2001). Cyt: dominio citoplasmático; TM: dominio transmembrana; Etd: Ectodominio.

La proteína H se encuentra anclada a la membrana de los viriones maduros así como en la membrana de las células infectadas, mediante una única región de transmembrana de naturaleza hidrofóbica, flanqueada por una cola citoplasmática de treinta y cuatro aminoácidos, y un dominio externo que contiene cisteínas altamente conservadas (**Figura 5.2.B**) (Moll *et al.*, 2002). En conjunto con la

proteína F, median la fusión y la entrada de la partícula viral a la célula huésped.

III.5.2. Desarrollo de herramientas y estrategias de trabajo

Se diseñaron dos estrategias con el fin de vehicular la hemaglutinina de MeV en VLPs. La diferencia entre ellas radica en la interacción de las proteínas con la maquinaria molecular del huésped, con el fin de abarcar todas las alternativas posibles de generación eficiente de VLPs.

En la primera de ellas, se espera que la expresión de la proteína de fusión Z-H genere VLPs por la acción autónoma de Z de interaccionar con la maquinaria molecular de tránsito vesicular de la célula huésped y que H sea incorporada en las VLPs debido a la fusión entre ambas proteínas. Estas VLPs serán denominadas VLPs_{Z-H}.

En la segunda estrategia, la expresión de la secuencia completa de H permitiría su inserción en la membrana plasmática de las células transfectadas y la co-transfección de la secuencia de Z en un vector independiente, generaría VLPs con H expuesta en sus membranas. En este caso, las VLPs serán denominadas VLPs_{Z+H}.

III.5.2.I.A. pZ-H

El vector de expresión pZ-H se construyó a partir del plásmido pZ-eGFP, reemplazando la secuencia de eGFP por la de H. La secuencia de H fue obtenida a partir de un plásmido cedido por la Dra. Alejandra Belizan (Laboratorio de Inmunología y Virología de la UNQ) (**Figura 5.3**).

III.5.2.I.A.I. Amplificación por PCR con *primers* específicos

Se diseñaron *primers* que abarcaran desde el codón de inicio (ATG) de la secuencia de H hasta el codón de finalización (TAG). El diseño incluyó el agregado corriente arriba de la secuencia de reconocimiento y corte de las endonucleasas de restricción *BamHI* y *NotI*. Además, se tuvo en cuenta la continuidad del marco de lectura, de forma tal que se forme la fusión entre las proteínas Z y H en el constructo final.

La secuencia de los *primers* empleados se detalla en una tabla en el Capítulo Materiales y Métodos. En cuanto al diseño del perfil de ciclado, dado que los *primers* diseñados incorporan secuencias de reconocimiento y corte para endonucleasas de restricción que no están presentes en la secuencia original, se utilizó un protocolo estándar de ciclado doble, donde en los primeros cinco ciclos la temperatura de hibridación fue de 60°C durante 15" y en los siguientes treinta y cinco ciclos se utilizó la temperatura de hibridación calculada para el largo total de los *primers* de 68°C durante 15". Debido al largo de la secuencia a amplificar y la procesividad de la polimerasa de ADN empleada, la extensión estándar de cada ciclo calculada fue de 2' y la extensión final fue de 8'.

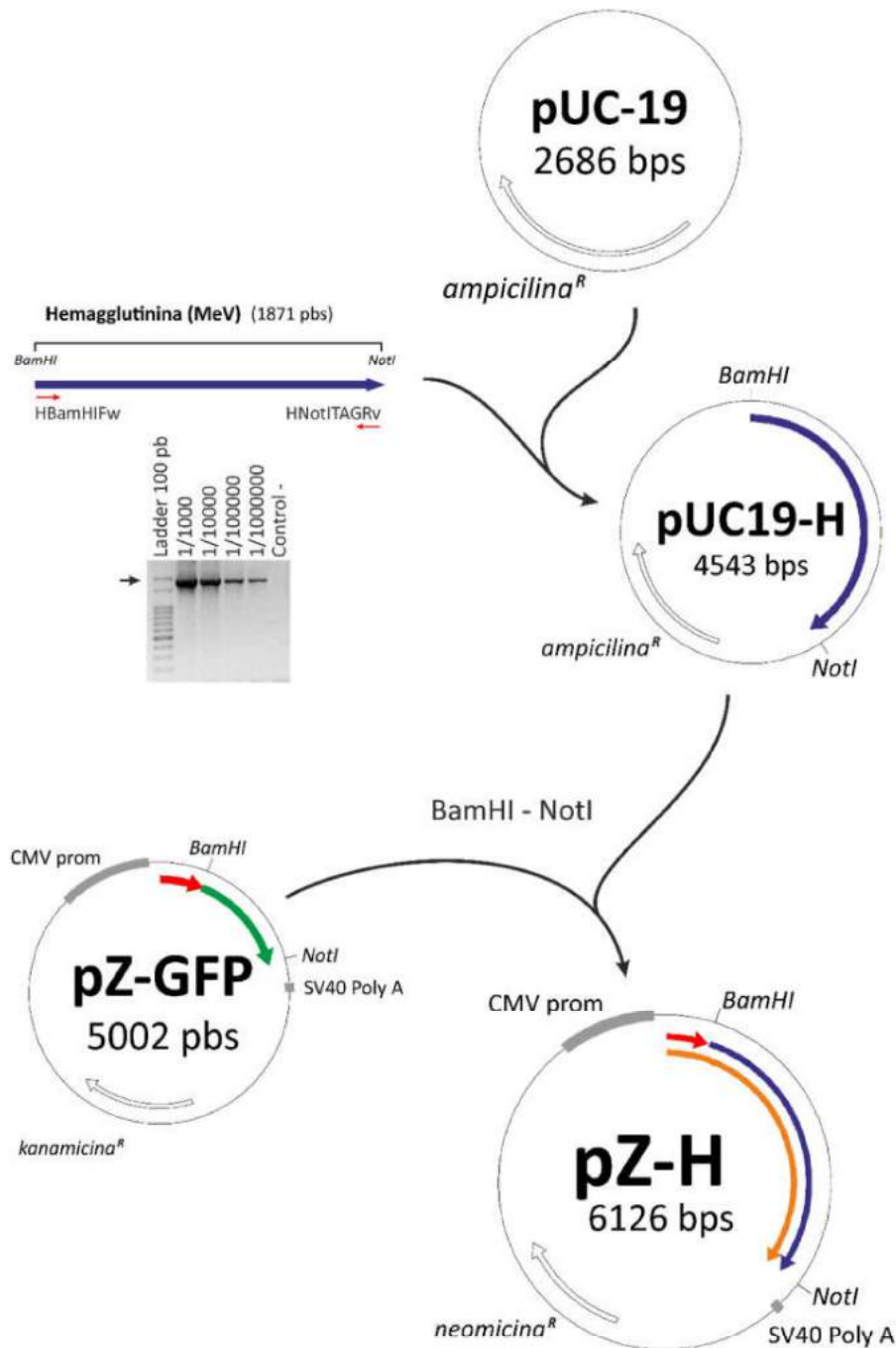


Figura 5.3: Clonado molecular de la secuencia de H para la obtención de pZ-H. En la parte inferior del esquema del ORF se visualizan en un gel de agarosa los productos de amplificación de la secuencia de H con los *primers* indicados; en las calles se indica la concentración de molde utilizado. CMV prom: promotor de *Citomegalovirus*; SV 40 poly A: terminador del *Simian virus 40*. Se indican los sitios de restricción de importancia para los diferentes pasos del clonado.

III.5.2.I.B. pH

La estrategia se diseñó como alternativa al plásmido pZ-H de manera tal que pueda observarse el comportamiento de las proteínas por separado. De esta forma, es necesaria la cotransfección de dos plásmidos, uno conteniendo la secuencia de Z que aporte la capacidad de dirigir el proceso de brotación de la VLP y otro conteniendo la secuencia completa de H. Esta alternativa se planteó debido a que una fusión entre ambas proteínas (como se propone en la estrategia anterior) podría no ser ventajosa a la hora de interactuar con la maquinaria molecular del huésped, tanto durante la traducción de la proteína recombinante como en el transporte a la membrana plasmática.

III.5.2.I.B.II Transferencia de H

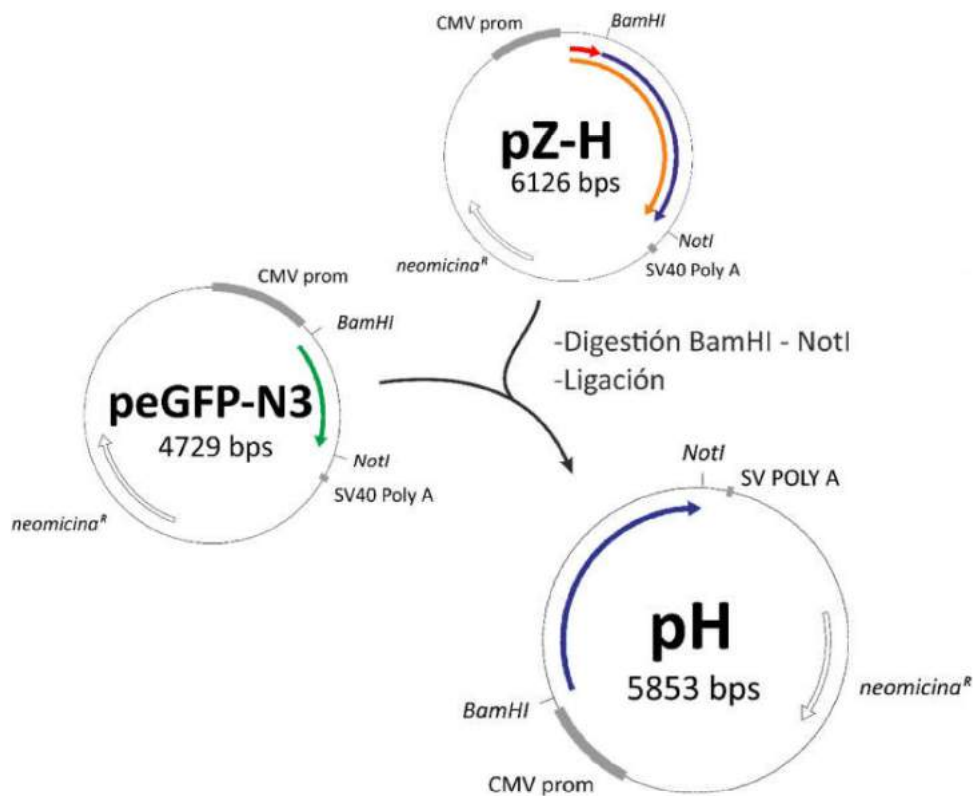
Se utilizaron las enzimas seleccionadas en el clonado anterior de pZ-H para transferir la secuencia completa de H desde pZ-H al vector peGFP y reemplazar GFP (**Figura 5.4**).

III.5.2.II. Análisis de la expresión

En todas las estrategias, los plásmidos fueron transfectados en células HEK-293T y COS-7 para evaluar si existían diferencias cuantitativas en la expresión entre ambas líneas celulares. Cada muestra fue procesada separando dos fracciones: monocapa (M) y sobrenadante (Sn) de cultivo. En esta última se espera detectar las proteínas recombinantes, así como la proteína Z contenidas en VLPs. La fracción M fue analizada en todos los casos como control de expresión, ya que en la misma deberían detectarse tanto las proteínas

expresadas completas aún no vehiculizadas, como los intermediarios siendo traducidos al momento de la cosecha celular.

El método de purificación utilizado fue el de ultracentrifugación en colchón de sacarosa durante 2 hs a 4°C, para luego resuspender en *pellet* en 40 µl de *buffer* PBS 1X. Los *pellets* obtenidos fueron procesados y analizados mediante una electroforesis en SDS-PAGE, realizando luego la técnica de *Western Blotting* (WB). El análisis de la identidad de las distintas proteínas fue realizado mediante inmunodetección con anticuerpos específicos α-Z, α-H y α-MeV, según el caso.



Figuran 5.4: Diseño *in silico* para la generación de pH. La construcción del plásmido pH se basó en el vector comercial peGFP-N3, donde la secuencia de GFP fue reemplazadas por la secuencia de H digerida con las endonucleasas de restricción seleccionadas.

III.5.2.II.A. Proteína recombinante Z-H

Para la fusión proteica entre Z y H se esperaría obtener una proteína recombinante de aproximadamente 80 kDa. Luego de la expresión de esta proteína y del anclaje a membrana tanto del miristoilo presente en el segundo residuo de Z como del dominio transmembrana de H, se espera que la porción del ectodominio de H dimerice al formar dos puentes disulfuro, por debajo de la porción globular que contiene los sitios de unión a los receptores celulares y los epítopes conformacionales hacia los cuales están dirigidos los anticuerpos neutralizantes (**Figura 5.5.A**).

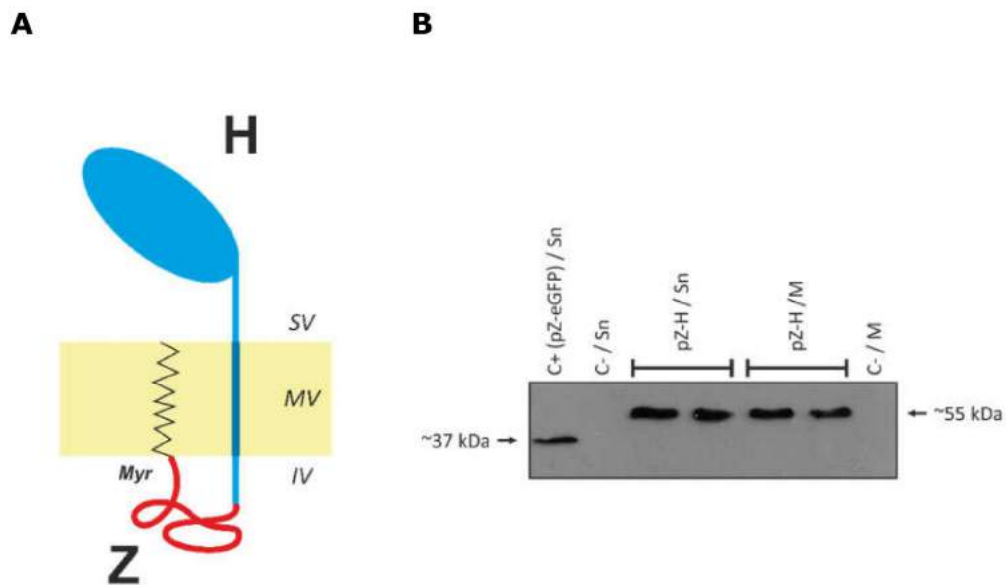


Figura 5.5: Análisis de la expresión de Z-H. **A-** Representación esquemática de la sección transversal de una VLP conteniendo la proteína recombinante Z-H anclada a su membrana. SV: superficie de la VLP; MV: membrana de la VLP; IV: interior de la VLP; **B-** WB con un suero policlonal α -Z específico diluido 1/1000 en BD. **C+ (pZ-eGFP)/Sn:** Sn obtenido de la transfección con pZ-eGFP, que da lugar a la proteína Z-eGFP (37 kDa); **C-/Sn:** Mock; **pZ-H/Sn:** Sn obtenido luego de la transfección con 12 y 8 μ g de plásmido transfectado respectivamente; **pZ-H/M:** fracción M de las muestras anteriormente indicadas. El producto identificado para la proteína Z-H presenta un tamaño aproximado 55 kDa.

En el caso de que la fusión no se vea influenciada impedimentos estéricos, se espera incluso que el dímero tome la conformación necesaria para formar el tetrámero característico presente en los viriones. De todas formas, dadas las condiciones desnaturalizantes de la corrida electroforética y la ruptura de los enlaces disulfuro tras el procesamiento de las muestras, se espera detectar las proteínas individuales como una única banda.

Como se observa en la **Figura 5.5.B**, fue posible detectar la expresión de una proteína recombinante de aproximadamente 55 kDa, utilizando un suero policlonal de conejo α -Z.

Si bien el tamaño no fue el esperado, la detección de la proteína con anticuerpos policlonales α -Z tanto en la monocapa como en el sobrenadante, indicaría la correcta fusión y traducción de las proteínas, así como la correcta incorporación de Z-H en la membrana de las VLPs.

III.5.2.II.B. pH

En esta estrategia se diseñó un ensayo de co-transfección utilizando dos plásmidos diferentes, uno conteniendo la secuencia de Z y otro conteniendo la secuencia completa de H. Se espera que los elementos de direccionamiento y anclaje a membrana de H permitan la correcta inserción de la misma en la membrana plasmática de las células transfectadas y que la fuerza impulsora de la brotación característica de Z genere las VLPs quiméricas.

Se ensayaron diferentes cantidades combinadas de plásmido para la transfección, teniendo en cuenta la relación cuantitativa en la expresión de ambas proteínas para la correcta generación de VLPs, identificándose una relación óptima 1:1 (pZ:pH) (datos no mostrados).

Al utilizar la secuencia completa de H en un vector individual, se esperaba que la misma dimerice y tetramerice una vez anclada en la membrana, adoptando la conformación nativa que presenta en el

virión. En los ensayos de inmunodetección se utilizaron sueros policlonales de ratón α -H y sueros policlonales humanos α -MeV en diferentes diluciones (**Figura 5.6.B**). En la figura pueden observarse múltiples productos detectados donde la banda inferior se condice con el tamaño esperado de H. La banda superior podía ser originada por la disolución incompleta de los dímeros (puentes disulfuro). Un tratamiento más agresivo de las muestras para ser utilizadas en SDS-PAGE solo dio como resultado la proteólisis de H y la desaparición de la señal en los *WB* (datos no mostrados).

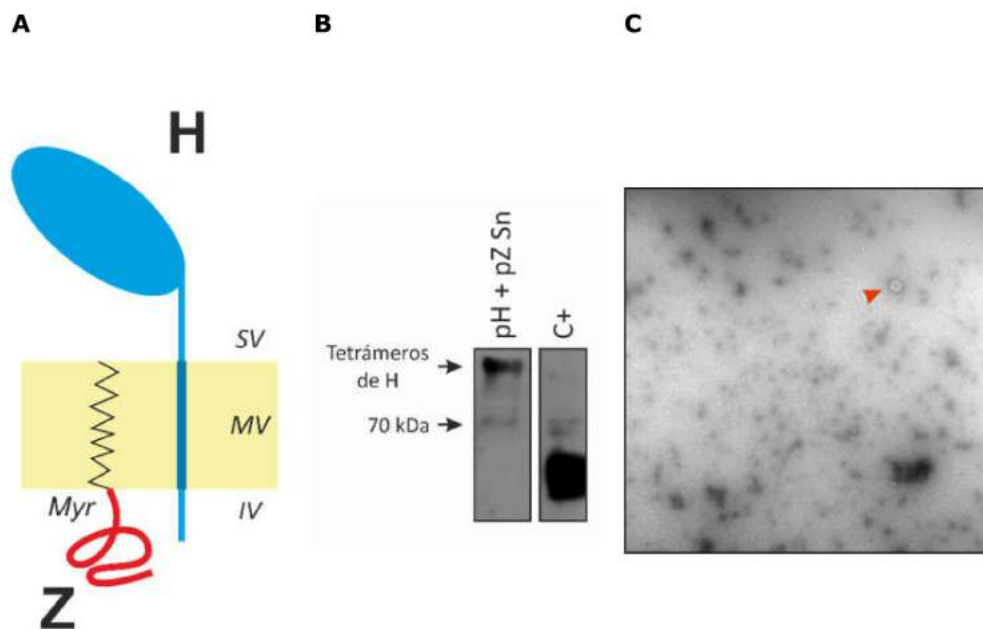


Figura 5.6: Análisis de la expresión de H y Z. **A-** Representación esquemática de la sección transversal de una VLP conteniendo las proteínas Z y H ancladas a su membrana, sin interactuar entre sí; SV: superficie de la VLP; MV: membrana de la VLP; IV: interior de la VLP; **B-** *WB* con suero policlonal específico α -H, 1/500 en BD (LIV, DCyT, UNQ). **C+**: proteína H recombinante obtenida en un sistema bacteriano. Se observa una banda correspondiente a la proteína completa (flecha inferior), de 70 kDa; **C-** Micrografía electrónica de transmisión del Sn de cultivo de la co-transfección pZ+pH; puede observarse una VLP (señalada en rojo) de aproximadamente 80 nm de diámetro. En el *Mock* no se observa la presencia de VLPs (no mostrado).

Finalmente, con el fin de confirmar la presencia de VLPs en el sobrenadante de cultivo, se tomaron micrografías electrónicas de

transmisión a partir de la purificación de los sobrenadantes de cultivo, donde se observaron VLPs de unos 80 nm de diámetro (**Figura 5.6.C**). Al haber detectado H y Z con anticuerpos específicos en el sobrenadante de cultivo, establecimos la hipótesis de que ambas proteínas se hallan en un entorno particulado, en las VLPs. Sin embargo, al no existir una interacción comprobada entre H y Z, y habiendo utilizado microscopía electrónica convencional no acoplada a técnicas de inmunodetección con anticuerpos específicos (*immunogold*), podría ocurrir que las VLPs observadas contengan sólo Z y que H se encuentre en algunas de partículas que se presentan en el Sn.

III.5.3. Discusión y conclusión

La erradicación de MeV sigue siendo un objetivo teóricamente factible, pero difícil de alcanzar. Se ha propuesto el uso de vacunas de ADN (Polack *et al.*, 2000), vectores que expresan H, F y / o N (Bergen *et al.*, 2010), complejos inmunoestimulantes que incorporan las proteínas H y F, o una combinación de estas estrategias (Pasetti *et al.*, 2003). Algunas de estas vacunas han demostrado propiedades protectoras en modelos animales de primates no humanos. En su mayor parte, la resistencia, durabilidad y seguridad de la inmunidad inducida por las vacunas contra el sarampión actuales han sido difíciles de superar por estas vacunas experimentales.

Sin embargo, la alternativa de generar vacunas α -MeV basadas en VLPs de JUNV conteniendo H es alentadora debido a las ventajas de los sistemas basados en VLPs. En trabajos previos en nuestro laboratorio, se evaluó la respuesta inmune inducida por VLPs generadas por la actividad de la proteína Z de JUNV conteniendo la proteína GFP y un péptido de DENV, respectivamente, con resultados favorables (Borio *et al.*, 2012; Mareze *et al.*, 2016). Siguiendo estos lineamientos, se

diseñaron estrategias originales para vehiculizar la proteína H del virus del sarampión en VLPs_Z.

En la primera de ellas, se fusionó el extremo N de H al extremo C de Z para generar una proteína de fusión Z-H con capacidad de dirigir el proceso de brotación de VLPs y contener los epítopes H contra los que se genera respuesta humoral neutralizante. Se ha documentado en otras proteínas de matriz virales, como Gag de HIV o la proteína M1 del virus influenza, retienen la capacidad de gemación cuando son fusionadas a otras proteínas de pequeño tamaño (Chackerian, 2007). Sin embargo, no se ha documentado la fusión de proteínas del tamaño de H. En el caso de la proteína Z arenaviral, la fusión de Z del virus Tacaribe a la proteína indicadora luciferasa (~24 kDa), documentada por Capul y colaboradores (Capul and de la Torre 2008), y la fusión a GFP (~25 kDa) documentada en nuestro laboratorio son el mejor ejemplo de proteínas completas fusionadas a Z que le permiten retener su capacidad de brotación, aunque ambas proteínas son de un tamaño menor al de H (~70 kDa) y una estructura terciaria mucho menos compleja. Por otro lado, no se ha documentado sobre la existencia de un sistema similar que implicase la proteína H, por lo que los resultados aquí mostrados serían los primeros sobre la expresión de una proteína recombinante de estas características.

Se pudo observar que la fusión del extremo carboxilo de Z al extremo amino de H da como resultado una proteína truncada de un tamaño menor al esperado cuando se analizaron las muestras utilizando anticuerpos específicos α -Z (**Figura 5.5**). El bajo rendimiento en la expresión de Z-H y la baja reproducibilidad impidió asimismo la producción a mediana escala para confirmar la presencia de VLPs mediante microscopía electrónica. Esto podría deberse a un efecto, potenciado por la fusión, de la citotoxicidad de Z para la célula hospedadora, que dificulta su expresión en cantidades detectables a través de los métodos empleados. Este tipo de efecto citotóxico fue observado anteriormente para la expresión de la proteína Z del virus

Lassa (Branco *et al.*, 2010) una marcada elongación celular luego de 24 hs, y una separación del sustrato plástico a las 48 hs post-transfección. Si bien en nuestro estudio no se midió cuantitativamente este efecto para la proteína de fusión Z-H, se observó un efecto similar en células transfectadas con pZ-N3 en trabajos anteriores (Goñi *et al.*, 2010). Es así que puede inferirse que la estrategia de fusión no responde según lo esperado, debido no sólo al tamaño y las características de H sino también a que la proteína recombinante resultante posee dos dominios que anclan la proteína a la membrana y que podrían interferir entre sí en su correcto procesamiento: el primero es el residuo miristoilado de Z en la posición dos y el segundo es el dominio transmembrana propio de H (**Figura 5.5**).

En la segunda estrategia diseñada se ensayó la expresión de la proteína H completa, sin fusionar ninguno de sus extremos a la proteína Z, y la capacidad de ser reclutada en VLPs. En esta estrategia se espera que el péptido señal propio contenido en la secuencia de H dirija la proteína a la membrana de las células transfectadas. El correcto procesamiento y plegado de la proteína le permitiría dimerizar y tetramerizar aún en ausencia de otras proteínas virales, como han documentado Logan y colaboradores en trabajos realizados con morbilivirus animales donde generaron partículas virales pseudotipadas con las proteínas H y F y constataron la correcta expresión de ambas proteínas (Logan *et al.*, 2016). En esta estrategia, Z debe ser aportada en *trans*, esto es, co-transfectando un vector que permita la expresión de Z y la generación autónoma de VLPs. Se espera que, a pesar de no interactuar entre sí, H y Z se hallen en las VLPs de forma independiente. Los resultados arrojados en esta estrategia fueron alentadores, incluso fue posible fotografiar las VLPs mediante microscopía electrónica de transmisión convencional (**Figura 5.6.C**), pero la expresión de la proteína H fue muy baja independientemente de la cantidad de plásmido transfectado.

Es así que fue posible detectar la presencia de H y Z en los sobrenadantes de cultivo en ambas estrategias utilizando anticuerpos específicos para ambas proteínas, lo que se correlaciona con la existencia de VLPs confirmadas mediante microscopía electrónica de transmisión convencional en una de ellas. Sin embargo, las características intrínsecas de las proteínas utilizadas impidieron el escalado en la producción de VLPs que permita la confirmación de su identidad proteica, dando lugar luego a los ensayos de inoculación en animales de laboratorio.

Capítulo 6

Diseño *in silico* del vector de expresión presentador de antígenos pResAg

En este capítulo se detalla el diseño de una plataforma genérica de vehiculización y presentación de antígenos para el desarrollo de VLPs con propiedades vacunales.

Este diseño incluye elementos genómicos del virus Junín capaces de direccionar y anclar un antígeno de interés en la parte externa de la membrana de una vesícula derivada de la célula huésped, generada por la actividad autónoma de otra proteína del mismo virus.

III.6.1. Introducción

III.6.1.I. Características moleculares del complejo de las glicoproteínas de los arenavirus

Como se indicó anteriormente, el genoma de los arenavirus está compuesto por dos segmentos de ARN ambisentido, cada uno de los cuales codifica para dos proteínas separadas por una región intergénica. La ARN polimerasa dependiente de ARN (L) y la proteína de matriz (Z) se encuentran codificadas en el segmento L, mientras que la nucleoproteína (N) y el precursor del complejo de las glicoproteínas (GP-C) se hallan codificados en el segmento S (De La Torre, 2009). Las glicoproteínas (GP) de la envoltura forman un complejo en la superficie del virión que media la interacción con la célula huésped, la entrada y la fusión de ambas membranas luego del ingreso.

El complejo de las glicoproteínas (GP-C, por *Glycoprotein Complex*) se traduce como un único polipéptido que es proteolizado por proteasas celulares para dar lugar a tres proteínas estructurales: el denominado péptido señal (SSP), la glicoproteína distal 1 (G1) y la glicoproteína 2 (G2) (**Figura 6.1**). La proteína convertasa celular (PC, del inglés *protein convertase*) SKI-1/S1P es la responsable de generar las dos glicoproteínas G1 y G2, mientras que la peptidasa señal celular (SPasa) escinde el SSP al inicio de la síntesis co-traducciona del polipéptido. Luego de la proteólisis, G1 queda adherida por interacciones no covalentes con el ectodominio de G2 y el complejo SSP-G2-G1 homotrimeriza para formar las espículas glicoproteicas que decoran la superficie de los viriones (Eschli *et al.*, 2006). La proteína G1 constituye la parte distal del complejo e interacciona con el receptor celular. Luego de la interacción, la partícula viral es internalizada y

transportada a endosomas tardíos. La acidificación de estos endosomas desencadena la disociación del complejo G1/G2 y G2 sufre un cambio conformacional exponiendo el dominio fusogénico responsable de la fusión de las membranas del virión y el endosoma. El correcto procesamiento de GP-C por SKI-1/S1P es indispensable tanto para la correcta diseminación de la infección célula-célula, como para la liberación de viriones infecciosos hacia el final del ciclo infectivo y el correcto funcionamiento de la maquinaria glicoproteica de entrada a la célula huésped (Beyer *et al.*, 2003).

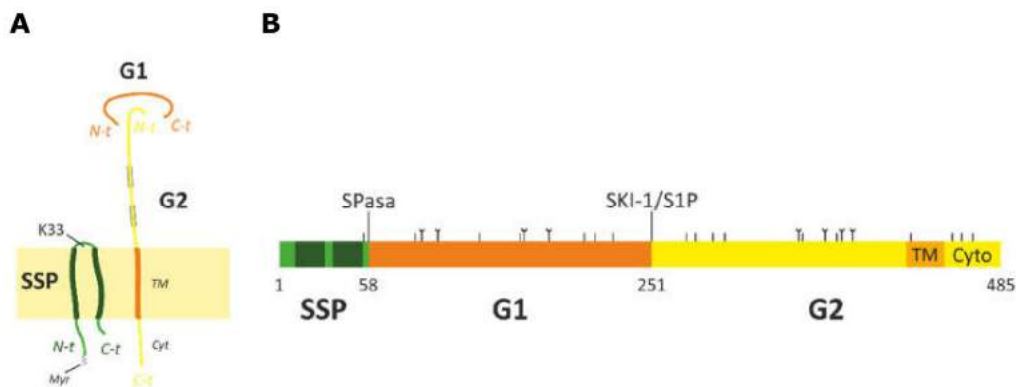


Figura 6.1: Modelo del complejo GP-C de arnavirus. **A-** Se muestran las tres proteínas del complejo insertas en la membrana del virión, con la topología bitópica de SSP, y G1 en interacción con el ectodominio de G2. Se detalla el aminoácido K33 del ectodominio de SSP el cual resulta fundamental para su correcto plegado así como los dominios $h\phi 1$ y $h\phi 2$ en verde oscuro que atraviesan la membrana y permiten que ambos extremos del SSP se presenten en la cara interna de la membrana del virión. *Myr*: miristoilo; *N-t*: amino terminal; *C-t*: carboxilo terminal; **B-** Representación esquemática de la secuencia del GP-C de JUNV. Se detallan los sitios de proteólisis cotraduccionales para la proteasa celular SPasa y postraduccionales para la SKI-1/S1P, los sitios de glicosilación (Y), las cisteínas (I), las heptarrepeticiones del SSP en verde oscuro y los dominios fusogénicos (gris oscuro), transmembrana (TM) y citoplasmático (Cyt) de G2. Modificado de Agnihothram *et al.* 2009; Agnihothram *et al.* 2007; York & Nunberg 2007.

III.6.1.II. El péptido señal de los arnavirus

A diferencia de lo que ocurre con la inmensa mayoría de las proteínas procesadas en el retículo endoplásmico, el péptido

proteolizado cotraduccionalmente por la SPasa en el precursor de las glicoproteínas arenavirales no se separa de las otras fracciones de la proteína. Por el contrario, permanece formando una parte integrante esencial del complejo resultante del procesamiento de GP-C. De ahí, su denominación como péptido señal estable (SSP). El SSP de arenavirus es además particularmente largo, de unos 58 aminoácidos, con una topología bitópica que indica que ambos extremos se insertan hacia la cara interna de la membrana del virión (**Figura 6.2**). Además, presenta el agregado de un ácido mirístico, e interacciona con los dominios citoplasmático y de fusión de G2 (Agnihothram *et al.*, 2007).

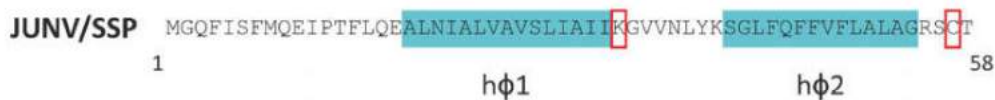


Figura 6.2: Representación de la secuencia del SSP de JUNV. En celeste se detallan los dominios transmembrana hφ1 y hφ2; los recuadros corresponden a residuos críticos para el funcionamiento del SSP. Modificado de Agnihothram *et al.*, 2007.

III.6.1.III. Interacción Z-GP

Se ha documentado que el SSP no solo direcciona el polipéptido naciente a la membrana y lidera el procesamiento cotraduccional de las glicoproteínas, sino que también es responsable de la interacción con Z (Capul *et al.*, 2007).

Hacia el final del ciclo infeccioso, la proteína de matriz Z de los arenavirus interacciona con el resto de las proteínas virales e inicia el proceso de ensamblado de los viriones maduros.

La proteína Z posee tres regiones características que le permiten llevar a cabo su función de proteína de matriz viral: **1)** la adición de un ácido mirístico en el segundo residuo que permite el anclaje de la proteína a la membrana plasmática; **2)** un dominio central RING-*finger*

de interacción e inhibición de la polimerasa viral L y **3)** un LD de interacción con la maquinaria molecular de transporte vesicular. Este último dominio se halla conservado en todos los arenavirus e incluso existen dominios homólogos en otras proteínas virales (Bieniasz, 2006) y es el responsable de la capacidad autónoma de Z de dirigir el proceso de brotación.

III.6.2. Desarrollo de herramientas y estrategias de trabajo

En este capítulo se detalla el diseño y desarrollo de un vector plasmídico para células de mamífero capaz de presentar antígenos (pResAg) en la superficie de VLPs generadas por la actividad de la proteína Z de JUNV. Dicho vector incluye, bajo un promotor de CMV, los elementos genómicos mínimos del GP-C de JUNV potencialmente capaces de dirigir y anclar una secuencia proteica heteróloga con capacidad antigénica en la membrana de las VLPs y de interaccionar con Z para optimizar el agregado de dicho antígeno en la superficie de las VLPs.

III.6.2.I. pResAg: un presentador de antígenos genérico de superficie

El diseño de pResAg se basó en los elementos genómicos mínimos de JUNV capaces de direccionar y anclar la proteína a membrana. Estos elementos están incluidos en el GP-C y comprenden: **1)** el SSP, **2)** 12 aminoácidos del ectodominio de G2 para dar plasticidad al antígeno fusionado a su N-terminal y expuesto en la superficie, **3)** el dominio transmembrana de G2 y **4)** el dominio citoplasmático de G2; estos últimos son los responsables del anclaje a membrana y de la interacción con el SSP, respectivamente (**Figura 6.3**). En conjunto, todos elementos serán denominados como G'.

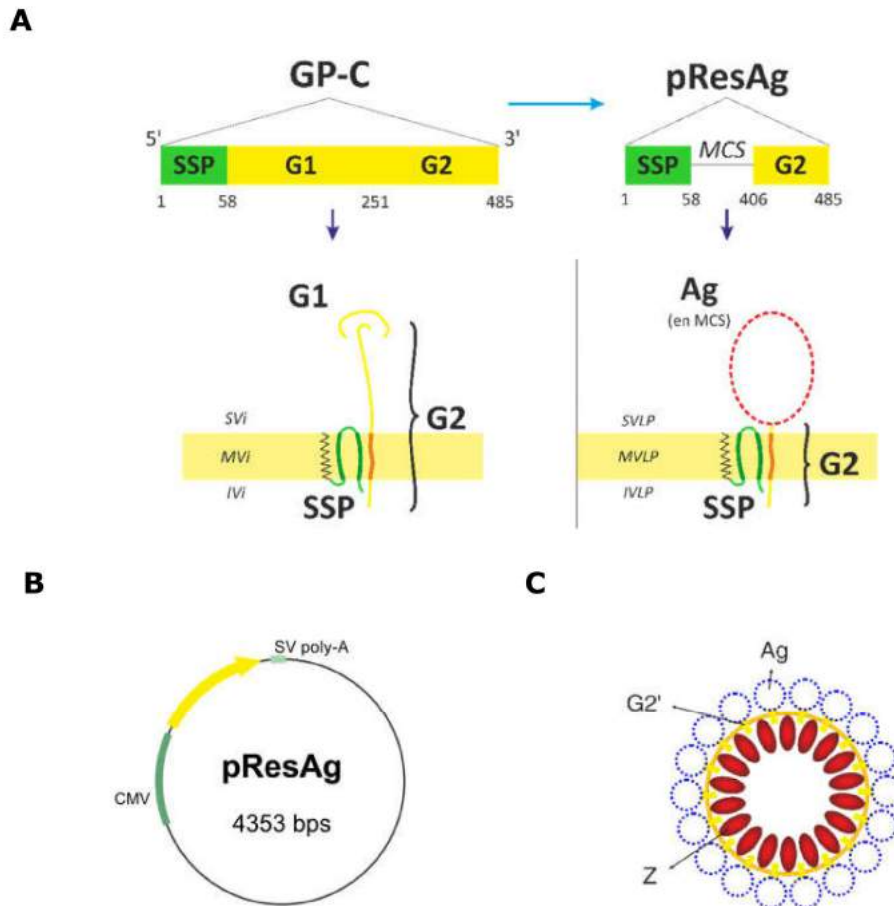
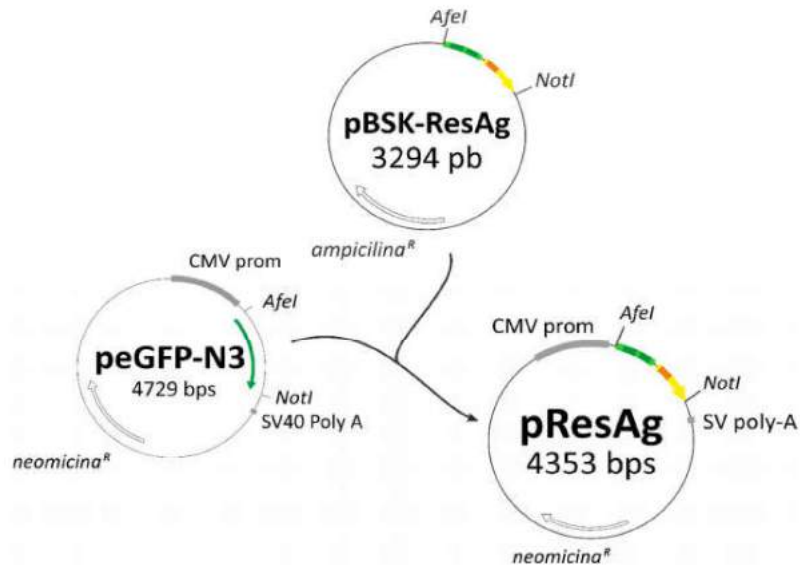


Figura 6.3: Diseño del vector de expresión pResAg. **A-** Representación esquemática de la secuencia del GP-C y los elementos mínimos seleccionados. En la parte inferior se muestra el esquema de la membrana del virión así como la membrana de una $VLP_{Z+G'}$. MCS: sitio de clonado múltiple (del inglés *multiple cloning site*); Ag: antígeno; **B-** Vector pResAg; se detalla el promotor CMV, el terminador SV poly-A y su tamaño en pares de base; **C-** $VLP_{Z+G'}$ hipotética expresada en células de mamífero cotransfectadas con pResAg (en amarillo) y pZ (en rojo) (vector no incluido en la figura); se señala la posición de cada proteína en la membrana de la $VLP_{Z+G'}$; a fines prácticos, se denomina G' a la proteína codificada en el ORF de pResAg.

III.6.2.I.A. Diseño *in silico* de pResAg

El diseño *in silico* de pResAg se realizó en el programa *Clone Manager* y se basó en el vector comercial peGFP-N3. La secuencia de interés fue transferida al vector peGFP-N3 reemplazando el ORF de eGFP por el de "ResAg" (**Figura 6.4**).

A



B

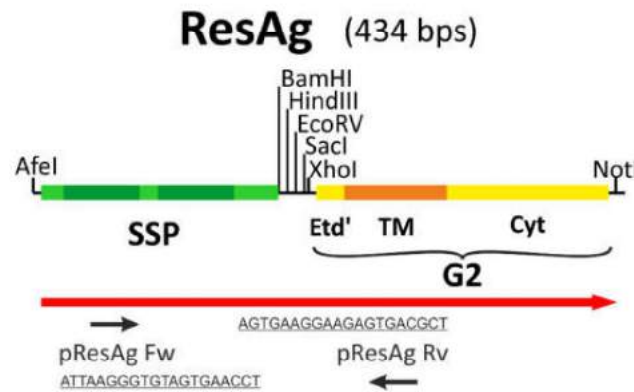


Figura 6.4: Clonado molecular de pResAg. **A-** Diseño de la estrategia de clonado de la secuencia ResAg en reemplazo de GFP en peGFP-N3; **B-** Detalle de la secuencia "ResAg"; en la parte superior se señalan los elementos que componen la secuencia con las endonucleasas de restricción seleccionadas en el MCS. Las endonucleasas en ambos extremos fueron incorporadas para el clonado molecular de "ResAg" en el plásmido definitivo peGFP-N3. La flecha roja representa el marco de lectura completo y se indica sobre la misma el lugar en que hibridan los *primers* para el análisis por PCR de las secuencias insertas en el MCS.

El diseño de la secuencia incluyó los elementos genómicos de JUNV descritos anteriormente y un MCS donde se seleccionaron endonucleasas de restricción de uso frecuente en laboratorios de biología molecular. En los extremos, se incorporaron los sitios de corte

para las endonucleasas *AfeI* y *NotI* para facilitar la inserción de la secuencia en reemplazo de GFP en peGFP-N3 (**Figura 6.4.A**).

Finalmente, se diseñó un par de *primers* que hibridan en la secuencia "ResAg" flanqueando el MCS para facilitar el análisis por PCR de la secuencia a ser vehiculizada, más precisamente en la región genómica que codifica para el primer dominio transmembrana de SSP y en el dominio transmembrana de G2 (**Figura 6.4**)

III.6.2.II. Clonado molecular de pResAg

La secuencia "ResAg" fue diseñada y posteriormente se solicitó su síntesis química a la empresa *Epoch Life Science Inc.*, Texas, USA. Dicha empresa comercializa los oligonucleótidos sintéticos de forma liofilizada en diferentes vectores comerciales. En el caso de "ResAg", la secuencia se hallaba inserta en un vector pBSK con resistencia a ampicilina (**Figura 6.4.B**).

III.6.3. Modelado bioinformático de los péptidos codificados en pResAg

El modelado bioinformático se realizó en colaboración con el estudiante Agustín Ormazabal (SCI-Prot: Simulación Computacional e Investigación de Proteínas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes).

El modelado comparativo de proteínas es una técnica predictiva que permite obtener una aproximación de la estructura atómica de una cadena polipeptídica en base a estructuras conocidas de proteínas relacionadas homólogas, denominadas *templates* (**Figura 6.5**). Entre sus aplicaciones en función de la calidad de los modelos, se incluyen desde el análisis del efecto de mutaciones hasta la predicción de ligandos y actividades catalíticas. Cuando no existen *templates*

disponibles se recurre al modelado *de novo* o *ab initio*. Esta estructura puede diferir de la estructura nativa de la proteína ya que se realiza en un contexto artificial de modelado computarizado. Sin embargo, en la actualidad las herramientas predictivas son altamente confiables para proteínas de hasta doscientos residuos (Ormazabal, comunicación personal).



Figura 6.5: Modelo comparativo de proteínas. Algoritmo empleado para el modelado comparativo de proteínas (Ormazabal A., comunicación personal).

III.6.3.I. Expresión de G'

La estructura cristalográfica del GP-C de JUNV no fue resuelta ni se encuentra en la base de datos de RCSB. Por este motivo fue necesario realizar una predicción de estructura a partir de su secuencia primaria, la cual sí se encuentra en NCBI (Código de acceso: P26313.2). Para predecir la estructura secundaria de una proteína a partir de los aminoácidos que la conforman existen diversos algoritmos, los cuales en general arrojan resultados divergentes unos

con respecto a otros. En este caso, la estructura del dominio SSP había sido previamente descrita en forma figurativa (Nunberg and York, 2012; Zapata and Salvato, 2013). En primer lugar, se utilizó el servidor JPred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>), el cual predice estructuras secundarias utilizando el algoritmo Jnet. Dicho algoritmo realiza la predicción por alineamiento de la secuencia *blanco* con secuencias de estructura conocida, y asume que la estructura de la secuencia blanco se corresponde con la estructura de la secuencia de mayor identidad en el alineamiento. No obstante, no se observaron resultados satisfactorios debido a que, al no contar con estructuras determinadas para proteínas homólogas, los alineamientos resultaron de muy baja calidad.

Como segunda alternativa se utilizó el servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), cuyo algoritmo de predicción se basa en alineamientos múltiples y segmentación de secuencia para su posterior análisis por modelos ocultos de Markov. No obstante, la única estructura predicha mostró un bajo porcentaje de confiabilidad.

La tercera alternativa fue utilizar el servidor I-Tasser (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/phyre2_output/29e99c93e9d00b5f/summary.html), cuyo algoritmo utiliza estructuras de árbol de datos sobre los cuáles se realizan comparaciones dinámicas en forma iterativa. En este caso se predijeron 5 modelos, donde el de mayor fidelidad es coincidente con la estructura esperada (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/output/S306525/>).

III.6.3.II. Construcción del sistema

Una vez que se dispuso de la predicción de las estructuras tridimensionales de las dos proteínas derivadas del genoma arenaviral expresadas en pResAg, se dispusieron a una distancia y posición

óptimas modificando las coordenadas tridimensionales de sus átomos mediante un programa realizado *de novo* en lenguaje *Fortran* (**Figura 6.6**). A continuación, se utilizó la subrutina "Membrane Builder" del servidor Charm-Gui (<http://www.charmm-gui.org/?doc=input/membrane>) para la construcción de la membrana. En este caso se seleccionó una composición de membrana rica en esteroides emulando la membrana plasmática de una célula de mamífero para hacerla coincidir con el sistema en el cual estas proteínas serán expresadas, y se adicionaron iones de Cloruro de Potasio para emular condiciones fisiológicas (**Figura 6.7**). La celda periódica utilizada fue hexahédrica.

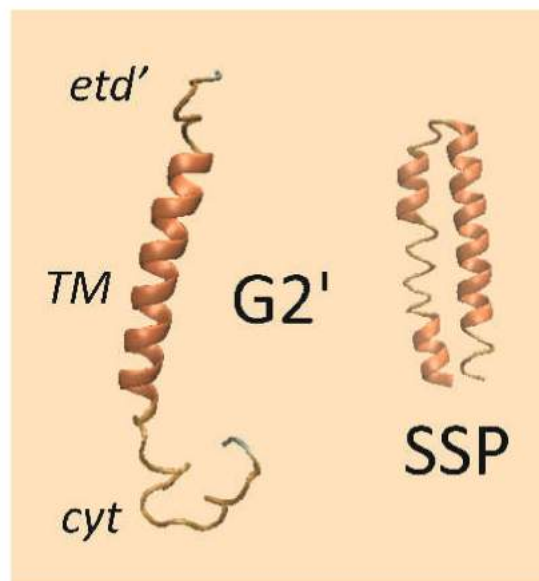


Figura 6.6: Modelado bioinformático de G'. Representación de los péptidos resultantes de la expresión de pResAg; se aprecian las heptarrepeticiones de SSP y su conformación bitópica sin el miristoilo en su extremo amino; G2' hace referencia a la porción de G2 seleccionada para diseñar pResAg que incluye los dominios citoplasmático (*cyt* en la figura), transmembrana (*TM*) y doce aminoácidos del ectodominio (*etd'*) que le dan plasticidad a la fusión con el antígeno clonado en su MCS.

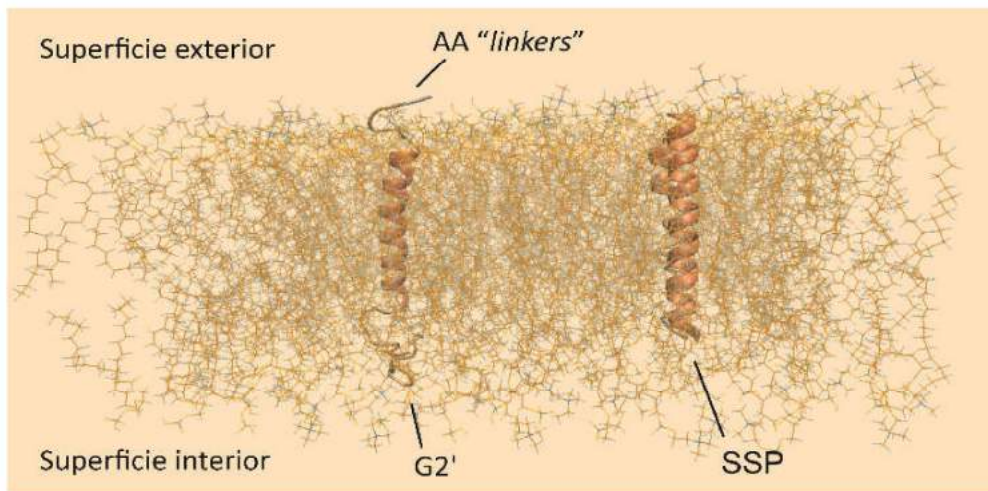


Figura 6.7: Modelado bioinformático de los péptidos expresados por pResAg y su inserción en la membrana de la VLP. Representación de los péptidos expresados en pResAg en la membrana plasmática derivada de una célula de mamífero; AA linker: 12 aminoácidos del ectodominio de G2

III.6.3. Discusión y conclusión

En los últimos años, la ingeniería genética asociada a la bioinformática permitió el desarrollo de herramientas de predicción y una extensa gama de tecnologías que están permitiendo un novedoso enfoque en la producción de vacunas (Delany *et al.*, 2013). Hace más de un siglo, Louis Pasteur (Plotkin, 2009) estableció una serie de lineamientos básicos para la generación de vacunas como se describió en el **Capítulo 1**. En cambio, en la actualidad las modernas tecnologías nos permiten evaluar las propiedades antigénicas y las características moleculares de una proteína mediante herramientas predictivas para luego desarrollar la fase *in vitro* de clonado, expresión y, por último, la evaluación *in vivo* de la respuesta inmune generada en modelos animales.

En este capítulo se describe el diseño de una herramienta molecular de *delivery* de antígenos en un entorno particulado, más específicamente en forma de VLPs envueltas. Este tipo de plataformas

están siendo utilizadas cada vez más no sólo como vehículo antigénico, sino también como *delivery* de proteínas u oligonucleótidos con fines terapéuticos (Noad and Roy, 2003; Ludwig and Wagner, 2007).

Generalmente, se utilizan proteínas no inmunogénicas para dirigir e impulsar el proceso de brotación de las VLPs envueltas que contengan el antígeno de interés anclado en su membrana. De esta manera, se evita que la proteína responsable de la generación de VLPs interfiera con la respuesta inmune celular o humoral esperada para el antígeno viral (Powilleit *et al.*, 2007; Warfield *et al.*, 2007).

Si bien el diseño de nuestro sistema pResAg busca pura y exclusivamente el direccionamiento y anclaje de antígenos a la membrana para ser exportados en VLPs, también se tuvo en cuenta la inmunogenicidad de las proteínas involucradas en el sistema, ya que se eliminaron las secuencias más inmunogénicas del GP-C (G1 y el ectodominio de G2) (Branco *et al.*, 2010; Illick *et al.* 2008). La inmunogenicidad de Z de JUNV fue ensayada en trabajos previos en nuestro laboratorio donde se evaluó la capacidad de las VLPs generadas por la proteína de fusión Z-GFP de inducir una respuesta inmune en animales de laboratorio en presencia o ausencia de detergente. Cuando la proteína no se encontraba en un entorno particulado en forma de VLPs debido a la desorganización de las membranas por acción del detergente, la respuesta inmune α -Z fue prácticamente nula frente a los controles y a las VLPs completas (Borio *et al.*, 2012).

Por otro lado, el modelado comparativo de proteínas llevado a cabo para predecir la conformación de pResAg en la membrana plasmática de las VLPs, resultó similar al obtenido previamente para las proteínas G2 y SSP utilizando otros modelos predictivos (York *et al.*, 2004; Zapata and Salvato, 2013), por lo que el diseño del sistema parecería ser acorde con el objetivo de anclar y dar lugar a la vehiculización de antígenos virales (**Figura 6.5 y 6.6**).

Capítulo 7

Vehiculización de la hemaglutinina del virus del Sarampión en una plataforma de presentación de antígenos en VLPs_{Z+G'}

En este capítulo se describe la vehiculización del ectodominio de H en el vector presentador de antígenos pResAg. Como se detalló en el Capítulo 4, H es una glicoproteína estructural de MeV, que cumple un rol central en la interacción con el receptor celular. La importancia de la respuesta serológica (α -H) se debe a que los anticuerpos se unen a la proteína e impide la entrada a la célula huésped, evitando así la infección.

El objetivo principal del empleo de esta herramienta molecular que presenta elementos mínimos accesorios de JUNV, reside en el análisis de su capacidad para generar protección humoral en ratones inoculados y posteriormente desafiados con el agente infeccioso. En este capítulo se pretende caracterizar la estabilidad de Z al ser aportada en *trans* y, por otro lado, evaluar la capacidad del ectodominio de H de generar protección en ratones en un entorno particulado en forma de VLPs.

III.7.1 Introducción

A pesar de la existencia de una vacuna efectiva contra el sarampión, en 2014 se registraron 266.701 nuevos casos en todo el mundo y más de 146000 muertes relacionadas con la infección en 2013 (la mayoría en África y Asia). Incluso en países con alto porcentaje de la población inmunizada como en Estados Unidos y países de Europa ha habido re-emergencias virales en los últimos años. Entre 2010 y 2014, se reportaron 135600 casos de sarampión en la región europea; los brotes epidemiológicos se registraron entre individuos no vacunados e individuos sin *status* comprobado de vacunación en Francia, España, Italia, Alemania y Rumania. En 2014, en EE UU se reportaron casi 700 casos en 27 estados, el número más alto desde la declaración de la erradicación de la enfermedad en el año 2000 (Whitaker and Poland, 2014).

En gran parte, los casos se produjeron por una falla en la administración de la vacuna, sin embargo, en países con una alta cobertura de la población vacunada, los brotes epidemiológicos han demostrado una falla en el programa de vacunación incluso en individuos que han recibido doble dosis (De Serres *et al.*, 2012; Defay *et al.*, 2013; Rosen *et al.*, 2014). Debido a la amenaza que representa el sarampión para la salud pública, es crítico entender el desarrollo y los determinantes de la inmunogenicidad de la vacuna, tanto los que generan la protección como los responsables de su desaparición en el largo plazo.

La protección contra el sarampión se basa principalmente en la inmunidad serológica específica, esto es, los anticuerpos específicos. La importancia de la inmunidad celular en la inducción de protección por vacunación aún no ha sido estudiada completamente, sin embargo, se han documentado individuos seronegativos protegidos contra

sarampión que inducen a pensar en que la inmunidad celular juega también un rol importante en la protección.

En la actualidad, la técnica "gold standard" para la cuantificación de anticuerpos neutralizantes contra las proteínas de superficie H y F (proteína de fusión) se basa en la prueba de neutralización por reducción de placa (PRN, del inglés *Plaque Reduction Neutralization*) (Haralambieva *et al.*, 2008; Strebel *et al.*, 2011).

La falla vacunal primaria aparece cuando los individuos vacunados no desarrollan una respuesta inmune protectora luego de la inmunización. La falla secundaria (inmunidad decreciente) ocurre cuando un individuo desarrolla una respuesta inmune protectora luego de la vacunación, pero no logra proteger al organismo de una infección subsecuente en caso de exposición.

La vacuna vigente actualmente contiene una combinación de cepas Edmonston-Enders-Moraten junto a otros virus. Existe una vacuna triple viral que aporta protección contra Sarampión-Paperas-Rubéola (MMR, del inglés *Measles-Mumps-Rubella*) y una cuádruple viral que aporta protección, además, contra el virus de la varicela (MMRV, del inglés *Measles-Mumps-Rubella-Varicella*). Otras vacunas utilizadas en el mundo basadas en la cepa Edmonston con perfiles de seguridad e inmunogenicidad similares, son la vacuna Schwarz (Brasil), la Edmonston-Zagreb (India, Croacia, Suiza) y la AIK-C (Japón). Existen vacunas que no se basan en la cepa Edmonston como ser la CAM-70 (Japón e Indonesia), la Leningrado-16 (Rusia) la Changchun-47 y la Shanghai-191 (China); la nomenclatura de cada una se basa en la cepa utilizada (Strebel *et al.*, 2011).

Los programas de vacunación pronosticaron que una doble dosis de MMR conllevaría a una reducción sustancial de la morbilidad del sarampión y su gradual eliminación. Sin embargo, varios estudios demostraron que entre 2 y 10% de los individuos inoculados no desarrollaron una inmunidad humoral protectora, permitiendo una acumulación gradual de individuos susceptibles a la infección y

subsecuentemente, a la ocurrencia de brotes virales (Poland and Jacobson, 1994; Haralambieva *et al.*, 2008).

Ante la perspectiva actual de una re-emergencia del virus del sarampión, es fundamental el diseño de vacunas en diferentes plataformas que aporten variabilidad a la respuesta inmune generada, especialmente contra las glicoproteínas de superficie, tanto humoral como celular.

III.7.2. Desarrollo de herramientas y estrategias de trabajo

En este contexto, y como se detalla en el **Capítulo 6**, se diseñó una plataforma capaz de presentar antígenos de superficie en VLPs generadas por la actividad de la proteína de matriz Z de JUNV junto a otros elementos de este mismo virus y se evaluó su capacidad para vehiculizar el ectodominio de H (H_{Etd}) con el fin de ensayar la respuesta inmune generada en modelos animales.

III.7.2.I. Vacunología inversa aplicada: vehiculización del ectodominio de H en pResAg

Con el fin de obtener VLPs quiméricas generadas por la actividad de Z de JUNV conteniendo el H_{Etd} en su superficie ($VLP_{SZ+H(Etd)}$), se diseñó y construyó el plásmido pResH(Etd) (**Figura 7.1**) a partir del vector presentador de antígenos pResAg.

El vector de expresión pResH(Etd) expresa una proteína quimérica de aproximadamente 65 kDa, compuesta por el ectodominio de H (55 kDa) fusionado a una porción de la glicoproteína de G2 de JUNV (10 kDa) capaz de anclar el antígeno a la membrana e interactuar con la proteína Z.

La construcción de este vector siguió una estrategia clásica donde se amplificó la secuencia del ectodominio de H por PCR con *primers*

específicos que contienen secuencias de reconocimiento para endonucleasas de restricción presentes en el MCS de pResAg.

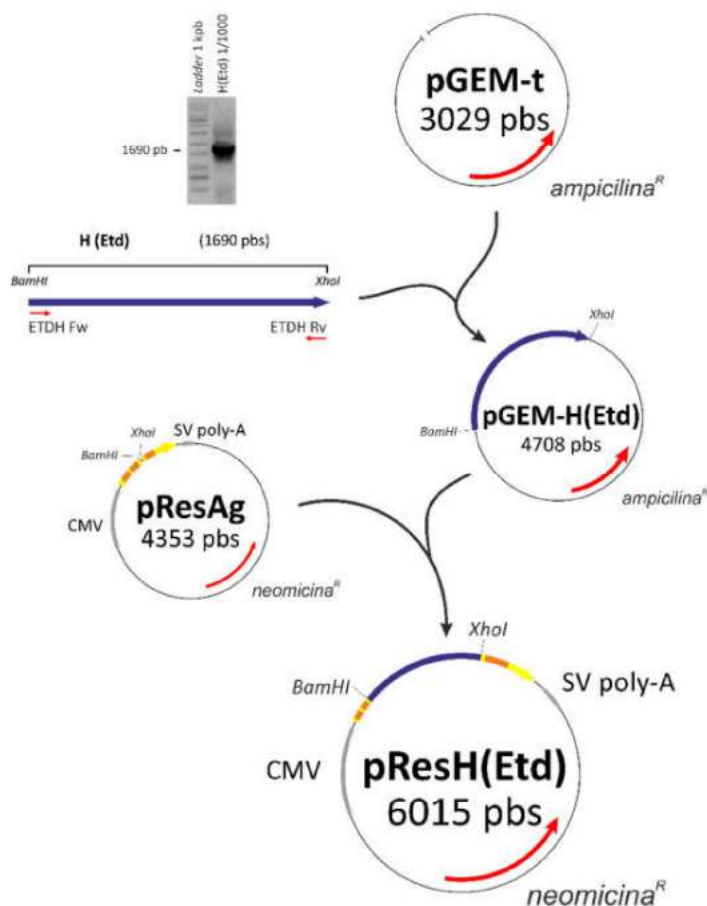


Figura 7.1: Clonado molecular de pResH(Etd). Esquema del diseño *in silico* de la estrategia de clonado molecular del plásmido de expresión pResH(Etd). CMV prom: promotor de *Citomegalovirus*; SV 40 poly A: terminador del *Simian virus 40*

III.6.2.I.A. Amplificación por PCR con *primers* específicos

Se diseñaron *primers* que hibridan dentro de la secuencia de H, evitando sus dominios transmembrana y citoplasmático (**Figura 7.2**). El diseño incluyó el agregado corriente arriba de la secuencia de

reconocimiento y corte de las endonucleasas de restricción *BamHI* y *XhoI*.

La secuencia de los *primers* empleados se detalla en una tabla en el Capítulo Materiales y Métodos. En cuanto al diseño del perfil de ciclado, dado que los *primers* diseñados incorporan secuencias de reconocimiento y corte para endonucleasas de restricción que no están presentes en la secuencia original, se utilizó un protocolo estándar de ciclado doble, donde en los primeros cinco ciclos la temperatura de hibridación fue de 60°C durante 15" y en los siguientes treinta y cinco ciclos se utilizó la temperatura de hibridación calculada para el largo total de los *primers* de 68°C durante 15". Debido al largo de la secuencia a amplificar y la procesividad de la polimerasa de ADN empleada, la extensión estándar de cada ciclo calculada fue de 2' y la extensión final fue de 8'.

III.7.2.II. Análisis de la expresión

Los plásmidos fueron transfectados en células HEK-293T y COS-7. Cada muestra fue procesada separando dos fracciones: M y Sn de cultivo. En esta última se espera detectar las proteínas recombinantes y la proteína Z contenidas en VLPs quiméricas. La fracción M fue analizada en todos los casos como control de expresión, ya que en las células deberían detectarse tanto las proteínas expresadas completas aún no vehiculizadas, como los intermediarios siendo traducidos al momento de la cosecha celular. El control de transfección y generación de VLPs fue pZ-GFP, un vector construido en nuestro laboratorio (Borio *et al.*, 2012). En todos los casos las muestras Sn fueron sometidas a ultracentrifugación en colchón de sacarosa con el fin de purificar las VLPs.

El método de purificación utilizado para las VLPs fue el de ultracentrifugación en colchón de sacarosa durante 2 hs a 4°C, para

luego resuspender en *pellet* en 40 μ l de *buffer* PBS 1X. Los *pellets* obtenidos fueron procesados y analizados mediante una electroforesis en SDS-PAGE, realizando luego la técnica de WB. El análisis de la identidad de las distintas proteínas fue realizado mediante inmunodetección con anticuerpos específicos α -Z, α -H y α -MeV, según el caso, utilizando sendos controles de la técnica y de las proteínas a detectar.

III.7.2.II.A. pRes-H(Etd)

La última de las estrategias diseñadas con el objetivo de vehiculizar H en VLPs generadas por la actividad de Z, se basó en la co-transfección del vector de expresión presentador de antígenos pResH(Etd) junto a pZ en células HEK-293T y COS-7.

Se ensayaron diferentes cantidades relativas de los plásmidos involucrados en la co-transfección (pZ y pResH(Etd)) hasta que se lograron visualizar resultados de expresión. Como controles negativos se emplearon células sin transfectar (*Mock*), células sin transfectar expuestas al reactivo de transfección y el vector presentador de antígenos pResAg sin inserto. El control positivo para la transfección y generación de VLPs fue pZ-GFP. Otros controles implicaron la transfección individual de cada uno de los plásmidos: por un lado pZ y por el otro pResH(Etd). En el primer caso se espera que se generen VLPs_Z y que no sean detectadas con anticuerpos α -H ni α -MeV, y en el segundo caso, se espera que la presencia del ectodominio de H sea detectada en la monocapa, pero no en el sobrenadante, ya que no cuenta con la proteína impulsora de la brotación.

Tras una corrida electroforética, se realizó la inmunodetección con sueros policlonales α -Z (1/2000) y α -H (1/500) y se logró detectar en ambos casos la presencia de las proteínas respectivas (**Figura 7.2.B**).

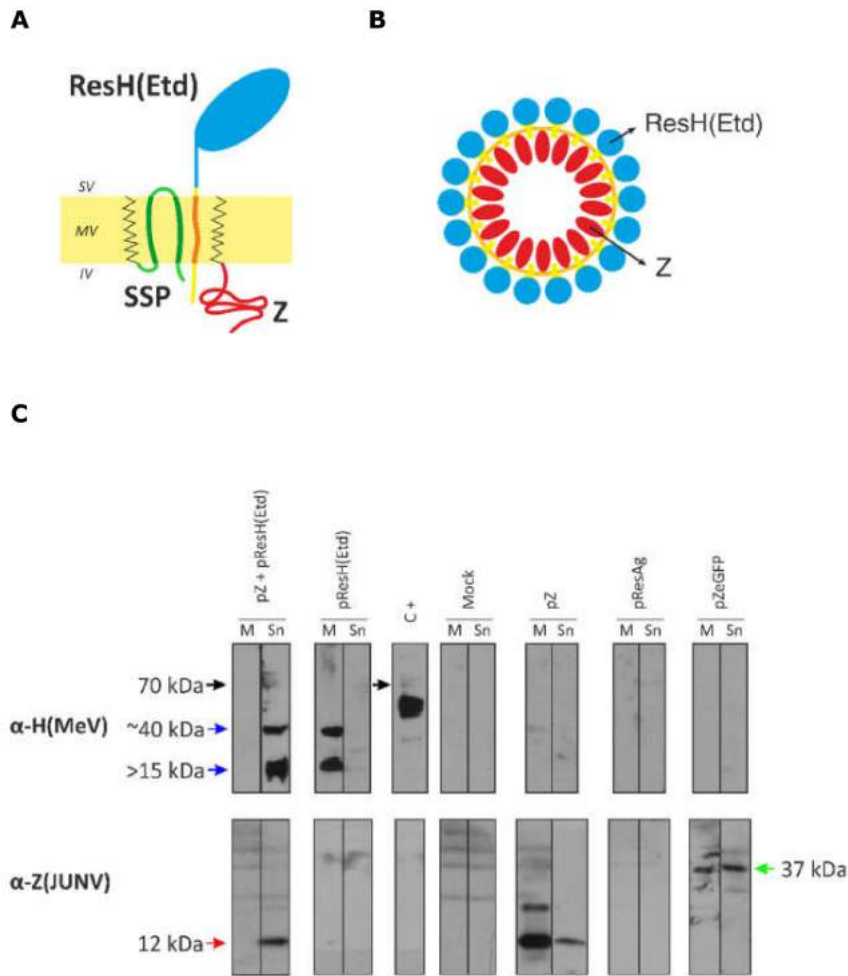


Figura 7.2: Análisis de la expresión de pResH(Etd). **A-** Esquema de la sección transversal de una VLP_{Z+H(Etd)} conteniendo las proteínas Z y H(Etd) ancladas a su membrana; SV: superficie de la VLP; MV: membrana de la VLP; IV: interior de la VLP; **B-** Diagrama de una VLP_{Z+H(Etd)} esperada. **C-** WB con anticuerpos específicos α H y α Z. En el panel superior se muestran los resultados de WB obtenidos para α -H: las flechas negras señalan las bandas correspondientes al tamaño completo de H, mientras que las azules indican subfragmentos generados a partir de una proteólisis en cultivo de esta proteína, con lo cual en el C+ se observan múltiples bandas. En el panel inferior pueden observarse los resultados para el análisis con α -Z: la flecha roja señala las bandas correspondientes al peso molecular de Z; la flecha verde corresponde a la proteína recombinante Z-eGFP. M: monocapa; S: sobrenadante; *Mock*: células sin transfectar. Los anticuerpos fueron utilizados 1/2000 (α -Z) y 1/500 (α -H) en BD;

No hubo inmunodetección cruzada entre los controles de Z y H, así como tampoco se obtuvo señal en las células sin transfectar y en las células transfectadas con pResAg. Sin embargo, como puede observarse en la **Figura 7.2.A**, el ectodominio de H parece sufrir una

proteólisis controlada que da lugar a un fragmento proteico de 40 kDa aproximadamente y fragmentos menores comprendidos en un rango de tamaño de entre 5 kDa y 20 kDa (flechas azules), tanto en la monocapa como en el sobrenadante. Esta proteólisis parece no interferir con la incorporación de los fragmentos en la membrana de las VLPs.

III.7.2.III. Análisis bioinformático de la proteína 'ResH(Etd)': predicción de sitios de proteólisis específica

En función de los tamaños detectados para la expresión de la proteína H en pResAg, se realizó una predicción bioinformática de potenciales sitios de reconocimiento para proteasas celulares utilizando la herramienta de predicción de proteólisis PROSPER (*Protease Specific Prediction Server*) de la Universidad de Monash, Australia (<https://prosper.erc.monash.edu.au>).

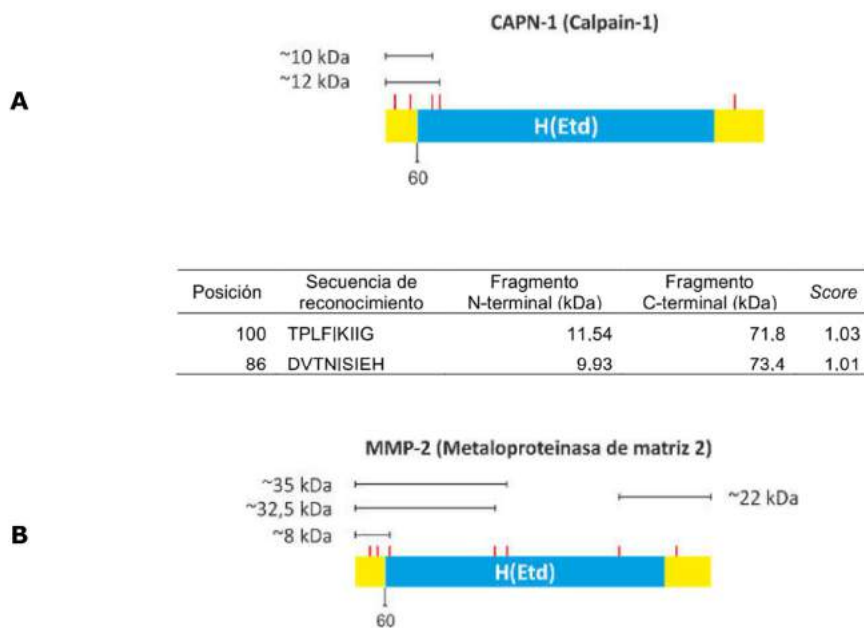
Para la predicción bioinformática de los sitios de proteólisis se utilizó la secuencia completa de la proteína expresada por pResH(Etd) bajo el promotor CMV. Este plásmido da lugar a la expresión un polipéptido de 693 residuos aminoacídicos que es proteolizado en la posición 60 por una SPasa celular de manera cotraduccional, liberando un péptido señal que direcciona el polipéptido naciente a la membrana plasmática (**Figura 7.2.B**).

Se encontraron cuatro proteasas presentes en células humanas que podrían estar involucradas en el procesamiento de H, impidiendo la incorporación de la proteína completa en la membrana plasmática y resultando en un patrón de bandas como el observado en los WB de la fracción del sobrenadante (**Figura 7.3**),

Con el fin de indagar el origen del patrón de bandas observado mediante WB del Sn, se propuso la hipótesis de que la SPasa celular no proteolizaría debidamente el péptido señal del polipéptido naciente

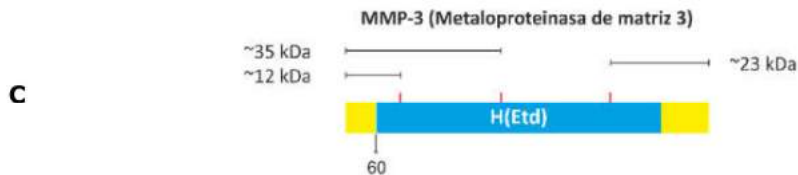
y, por lo tanto un fragmento de H quedara fusionado y anclado a membrana. Esta hipótesis establece además que los fragmentos de H detectados en el Sn deben estar insertos en la membrana, ya que de otro modo serían degradados por la célula, y además la ausencia de procesamiento del péptido señal no interfiere con su función de direccionamiento.

Según la predicción bioinformática, tanto CALPN-1 como la MMP 2 generan cuatro fragmentos que podrían estar anclados a la membrana de las VLPs con tamaños aproximados esperados que concuerdan con los detectados con los anticuerpos específicos αH (**Figura 7.3.A** y **7.3.B**). La MMP-3 genera tres fragmentos donde una porción media del ectodominio de H no es incorporada a la membrana por no conservar ningún dominio transmembrana (**Figura 7.3.C**). Finalmente, la CD249 genera una serie de fragmentos que van desde los 16 kDa a los 27 kDa que conservan dominios transmembrana (**Figura 7.3.D**). Esta proteasa es la que genera la mayor pérdida de la parte media de H, pero es a su vez la que genera la mayor cantidad de fragmentos que concuerdan con lo observado en los WB.

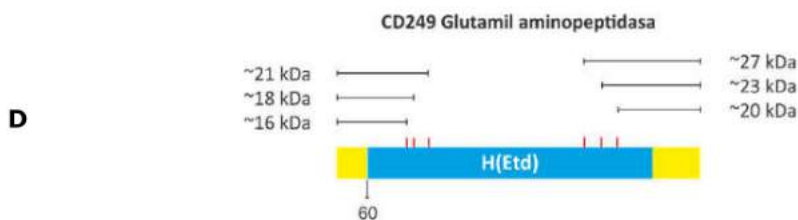


Capítulo 7 –Vehiculización de la hemaglutinina del virus del sarampión en una plataforma de presentación de antígenos en VLPs_{Sz-G'}

Posición	Secuencia de reconocimiento	Fragmento N-terminal (kDa)	Fragmento C-terminal (kDa)	Score
274	APVF HMTN	32,57	50,76	1,1
68	HRAA IYTA	7,93	75,4	1,01
517	LSSN LVIL	61,26	22,07	0,96
297	ALGE LKLA	35,23	48,1	0,96



Posición	Secuencia de reconocimiento	Fragmento N-terminal (kDa)	Fragmento C-terminal (kDa)	Score
105	IIGD EVGL	12,18	71,15	1,08
297	ALGE LKLA	35,23	48,1	1,04
507	LPAE VDGD	60,13	23,2	0,95



Posición	Secuencia de reconocimiento	Fragmento N-terminal (kDa)	Fragmento C-terminal (kDa)	Score
19	FLQE ALNI	2,3	81,04	1,01
134	PDRE YDFR	15,74	67,6	0,98
475	NTLE WIPR	56,36	26,97	0,97
148	NPPE RIKL	17,49	65,85	0,96
507	LPAE VDGD	60,13	23,2	0,95
539	SRVE HAVV	63,85	19,48	0,95
12	FMQE IPTF	1,47	81,87	0,95
177	TLLE TRTT	20,77	62,56	0,94

Figura 7.3: Análisis bioinformático de 'ResH(Etd)'. En rojo se indican los sitios de proteólisis predichos por el software PROPER de las cuatro proteasas celulares de primates encontradas. Se indican únicamente aquellos sitios que no interfieren en la incorporación en la membrana de las VLPs de los fragmentos generados y el tamaño aproximado de los mismos desde los extremos amino y carboxilo, donde se hallan los dominios transmembrana. Se señala el sitio en el residuo 60 donde la SPasa celular proteolisa el péptido señal de direccionamiento a membrana. En las tablas, la columna "score" corresponde a un análisis probabilístico interno del software.

Cabe destacar que las cuatro proteasas se expresan en ambas líneas celulares, por lo que el patrón de bandas observado debería ser producto del procesamiento de todas ellas en conjunto.

III.7.2.IV. Visualización de las VLPs mediante microscopía

Las VLPs purificadas a partir de la fracción sobrenadante de los cultivos cotransfectados con pResH(Etd) y pZ fueron observadas utilizando un microscopio electrónico de transmisión convencional, con un tamaño aproximado de 60-100 nm de diámetro (**Figura 7.4**).

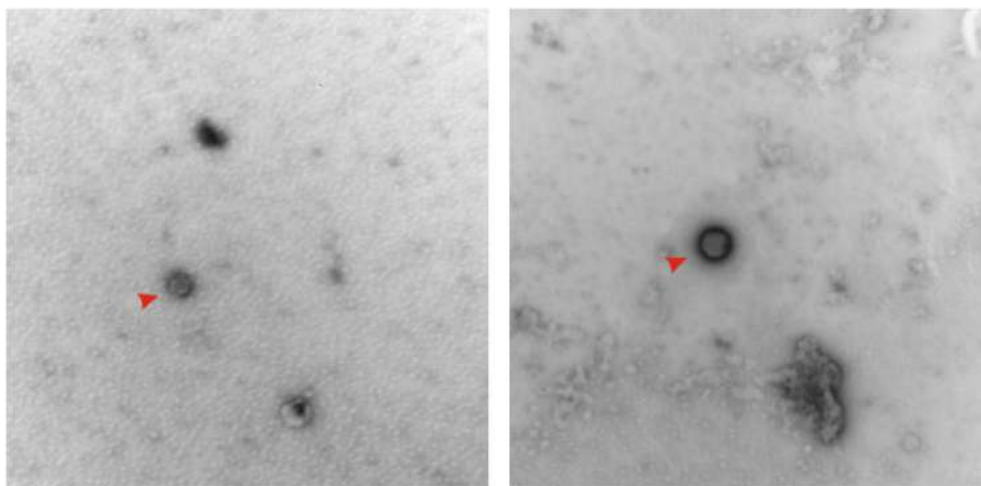


Figura 7.4: Confirmación por microscopía electrónica de transmisión de la presencia de VLPs en el Sn de cultivo. VLPs purificadas a partir del sobrenadante de cultivo de células co-transfectadas con pResH(Etd) y pZ, señaladas en rojo de un tamaño estimado de 90-130 nm.

Si bien fue posible visualizar VLPs del tamaño esperado y detectar la proteína H y/o fragmentos de la misma en Sn de cultivo, es necesario confirmar la incorporación de H en la membrana de las VLPs mediante el marcaje con partículas de oro coloidal acoplada a microscopía electrónica de transmisión. Una vez confirmada la identidad de las

proteínas insertas en las VLPs será necesario realizar el escalado de la producción y los subsiguientes ensayos de inmunización en animales para evaluar la respuesta inmune generada α -H.

Por otro lado, debido a los patrones de proteólisis controlada predichos por el software PROSPER, sería conveniente incorporar un nuevo sistema de expresión eucariota con el fin de eliminar dicho factor.

III.7.3. Discusión y conclusión

La protección vacunal contra el sarampión se basa en la inmunidad humoral específica. El *gold standard* actual para establecer el nivel de protección de un individuo, se basa en la cuantificación de anticuerpos neutralizantes contra la H y F mediante la PRNA. La evidencia experimental sugiere que los anticuerpos específicos contra H, en mayor medida y contra F, contribuyen a la neutralización del virus y la protección (Swart *et al.*, 2005; de Swart *et al.*, 2009). En base a esto y a las fallas vacunales documentadas en los últimos años que han resultado en brotes epidémicos en diferentes partes de mundo (Whitaker and Poland, 2014), nosotros aplicamos herramientas de la vacunología reversa para la vehiculización del ectodominio de H en VLPs recombinantes como plataforma vacunal.

Los epítopes principales de la proteína H se clasifican en cinco tipos: epítope hemaglutinante *noose*, epítope de unión al receptor, epítope *sugar shielded*, epítope neutralizante (NE) y epítope *loop*, (Tahara *et al.*, 2016). En nuestro diseño, se tuvieron en cuenta todos ellos y se los incluyó precisamente por ser los responsables de la estabilidad antigénica característica del sarampión.

Los resultados obtenidos en esta estrategia no fueron concluyentes. Por un lado, se logró detectar la presencia de H en el sobrenadante de cultivo en presencia de Z y fue posible fotografiar las

VLPs mediante microscopía electrónica de transmisión convencional. Por otro lado, se encontró la proteína completa en baja concentración y altas concentraciones de fragmentos de tamaños menores a los esperados. No se ha documentado la expresión recombinante de H fuera del entorno viral; se han producido viriones más inmunogénicos al aumentar las cantidades relativas de H en sus membranas, pero no la proteína completa por sí sola (Julik and Reyes-Del Valle, 2016).

Tras un análisis bioinformático de la secuencia, se identificaron varias proteasas que podrían ser responsables del procesamiento indeseado del ectodominio de H. Esto impidió que la estrategia sea escalada para producir VLPs e inocular animales de ratones para evaluar la respuesta inmune generada α -H.

Si bien H contiene epítopes conformacionales y oligomeriza de forma tal que incrementan su inmunogenicidad, una estrategia alternativa sería la de predecir mediante herramientas bioinformáticas de vacunología inversa la secuencia mínima de H capaz de ser transportada e inducir una respuesta inmune detectable y protectora. Esta alternativa es atractiva debido a que los sistemas de vehiculización antigénica como pResAg funcionan mejor cuando las secuencias transportadas son pequeñas. En el caso de la proteína Z arenaviral, la fusión de Z de TCRV a la proteína indicadora luciferasa (~ 24 kDa) (Capul & de la Torre, 2008), y la fusión a GFP (~ 25 kDa) (Borio et al., 2012) son el mejor ejemplo de proteínas completas fusionadas a Z que le permiten retener su capacidad de brotación, aunque ambas proteínas son de un tamaño menor al de H y una estructura terciaria mucho menos compleja.

Capítulo 8

Vehiculización de la proteína NS1 del virus de la encefalitis de *Saint Louis*

En este capítulo se describe la vehiculización en VLPs_z de la proteína NS1 (del inglés *Non Structural 1*) del virus de la encefalitis de *Saint Louis* (SLEV, del inglés *Saint Louis Encephalitis Virus*), un flavivirus americano que es endémico en el centro de nuestro país.

La proteína NS1 es inmunológicamente importante y altamente conservada en la familia *Flaviviridae*. La estrategia de vehiculización de NS1 como antígeno viral de superficie se diseñó en virtud de la carencia de dominios transmembrana en su secuencia que interfiriesen con los péptidos expresados en pResAg de direccionamiento y anclaje a membrana. Estas características, sumado a que no es una proteína estructural ni de matriz y que no forma VLPs, la convierten en una candidata ideal para evaluar la respuesta inmune generada *in vivo* en un entorno particulado.

El objetivo principal de su vehiculización a través de este sistema, fue el contar con una herramienta molecular que permita evaluar la capacidad de NS1_{SLEV} de generar protección ante un desafío en ratones inoculados. Por otro lado, este diseño está relacionado con una línea de investigación en nuestro laboratorio que pretende utilizar la proteína NS1 como herramienta de diagnóstico serológico,

siendo las VLPs expresadas en cultivos eucariotas, una excelente alternativa de plataforma de expresión en condiciones muy similares a las *wild type*, que puede emplearse tanto como antígenos de manera directa, o para llevar a cabo la producción de sueros policlonales específicos y sensibles.

III.8.1. Introducción

III.8.1.I. La familia *Flaviviridae*

Flaviviridae es una numerosa familia viral cuyo hospedador final es un mamífero, conformada por tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*. Su denominación se basó en la nomenclatura del virus de la Fiebre Amarilla (YFV, *Yellow Fever Virus*; del latín *flavus*, amarillo) descubierto a principios del siglo XX y considerado el prototipo de esta familia.

Esta familia ocupa el tercer lugar en cantidad de virus que infectan humanos, detrás de *Bunyaviridae* y *Papilomaviridae* (Woolhouse *et al.*, 2012). Los integrantes del género *Flavivirus* pertenecen al grupo de los arbovirus (del inglés *arthropod-borne-viruses*), denominación otorgada a los virus transmitidos por artrópodos, siendo su principal característica un ciclo de replicación obligada en un artrópodo hematófago y su transmisión mecánica.

El género *Flavivirus* contiene al menos 73 especies virales. De estos virus, 34 son transmitidos por mosquitos, 17 son transmitidos por garrapatas, y 22 son agentes zoonóticos sin un vector conocido. El 65% de los flavivirus transmitidos por mosquitos causan alguna patología en humanos (Lindenbach and Rice, 2007).

III.8.1.II. Epidemiología de los Flavivirus

Las infecciones flavivirales son consideradas dentro de los patógenos virales más importantes entre humanos y animales, con altas tasas de morbilidad y mortalidad. Se dividen en dos grupos, dependiendo del artrópodo que utilizan como vector: los transmitidos por mosquitos y los transmitidos por garrapatas. Estos grupos no solo

son diferentes en su forma de transmisión y su ciclo mamífero-artrópodo sino también en su filogenia y sus manifestaciones clínicas.

Los *Flavivirus* transmitidos por garrapatas se asocian principalmente a encefalitis y comprenden un grupo de especies cercanamente emparentadas, que colectivamente pertenecen al complejo de encefalitis transmitidas por garrapatas (TBE, del inglés *tick-borne encephalitis*). El complejo TBE comprende los virus Powasan, el virus de la enfermedad de Louping, el virus de la enfermedad de la jungla Kyasanur, el virus de la fiebre hemorrágica de Omsk, el virus Langat y los virus de las encefalitis transmitidas por garrapatas (TBEV, *tick-borne encephalitis viruses*). Las especies de TBEV incluye tres serotipos conocidos causales de encefalitis en humanos: el serotipo de Europa Occidental, el serotipo de Europa Oriental y el serotipo Siberiano (Osterhaus, Koraka and Martina, 2010).

Los *Flavivirus* transmitidos por mosquitos se dividen principalmente por su filogenia y sus diferencias antigénicas. El serocoplejo de la encefalitis japonesa incluye los virus de la encefalitis japonesa (JEV, *Japanese Encephalitis Virus*), el virus de *West Nile* (WNV, *West Nile virus*) y SLEV. DENV se encuentra dentro de un serocomplejo independiente, identificándose cuatro serotipos cercanamente emparentados, pero antigénicamente distintos. Finalmente, el YFV constituye a su vez otro serocomplejo independiente (Kuno *et al.*, 1998).

La sintomatología de las infecciones flavivirales se caracteriza principalmente por un cuadro febril agudo. Se ha documentado un bajo porcentaje de individuos infectados que pueden desarrollar una enfermedad neurológica, hepática y/o hemorrágica severa con altas tasas de mortalidad (Kuno *et al.*, 1998). Frecuentemente se registran brotes en Asia de meningoencefalitis causados por JEV, que afectan niños principalmente (Oya and Kurane, 2007). En el caso de las infecciones de WNV, también se registran brotes de meningoencefalitis en África Occidental, Medio Oriente y América del Norte y actualmente

se ha establecido como una virosis emergente por todo América (Blitvich, 2008). Por otra parte, DENV es endémico de áreas tropicales y subtropicales donde se hallan en riesgo de infección más de 2500 millones de personas en todo el mundo. Este virus presenta riesgos si no se trata a tiempo ya que su sintomatología incluye manifestaciones hemorrágicas y/o *shock* en pacientes no tratados (Halstead, 2007). En el caso de YFV, se presentan infecciones que pueden culminar en hepatitis fulminante o una enfermedad hemorrágica aguda y, a pesar de existir una vacuna, aún es un factor importante de mortalidad en todo el mundo (Gould and Solomon, 2008). Por último, SLEV es el mayor representante del serocomplejo de la encefalitis japonesa en América. Desde su primera descripción en *Saint Louis, Missouri*, en 1933, se han documentado más de cincuenta brotes y numerosas epidemias en Estados Unidos y Canadá. La tasa de mortalidad de pacientes sintomáticos es del 5-20%, correlacionado con la edad de los pacientes. A partir de 1960 comienzan a registrarse casos aislados en Argentina y Brasil. El primer brote documentado fuera de América del Norte fue en Argentina en 2005, seguido por un brote similar en Brasil en 2006. Más recientemente, infecciones asociadas con cuadros febriles y encefalitis en América del Sur han sido atribuidas a SLEV basándose en pruebas serológicas y aislamiento viral (Kopp *et al.*, 2013).

III.8.1.III. Morfología de los viriones

Los viriones de Flavivirus son envueltos, esféricos, de aproximadamente 50 nm de diámetro y con un ARN contenido dentro de una cápside icosaédrica compuesta por tres proteínas estructurales: una proteína del *core* o cápside (C), una proteína de la membrana no glicosilada (M) y una proteína de la envoltura (E) glicosilada. Pueden distinguirse dos formas: una forma madura que contiene dos proteínas

virales asociadas a la membrana plasmática E y M y una forma inmadura intracelular que contiene el precursor prM en lugar de M, la cual es proteolizada durante la maduración viral (Stadler *et al.*, 1997).

La proteína E es el componente mayoritario de la superficie del virión y contiene determinantes antigénicos que inducen la respuesta de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación y neutralizantes, es la responsable de la unión al receptor celular y de la fusión de las membranas dependiente de pH luego de la endocitosis mediada por receptor (Roehrig *et al.*, 1998; Crill and Chang, 2004). Se encuentra en forma dimérica formando barras paralelas a la superficie de la membrana plasmática a pH fisiológico en vez de proyecciones espiculares como otras proteínas homólogas (Martin *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2008).

Las reconstrucciones de imágenes a partir de micrografías crioeléctricas han demostrado que la envoltura del virión tiene una simetría icosaédrica, en la que los dímeros de la proteína E se organizan en forma de escamas sobre la superficie de los viriones (**Figura 8.1**).

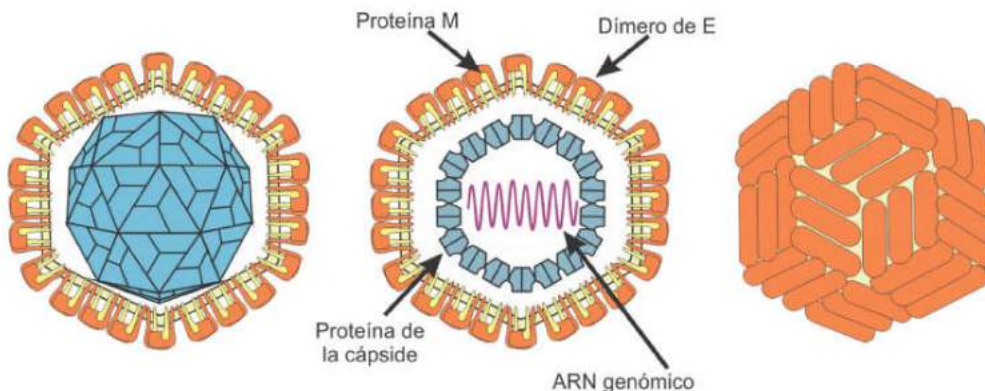


Figura 8.1: Morfología de los viriones de Flavivirus. En el diagrama de la izquierda se detallan los componentes proteicos y sus interacciones en un corte transversal, la figura del medio ilustra la cápside proteica y a la derecha se observa la disposición de la proteína E en la superficie externa de los viriones.

III.8.1.IV. Biología molecular de los flavivirus

Los flavivirus son virus envueltos de ARN simple cadena y genoma con sentido positivo. El genoma de ARN flaviviral contiene un 5' cap conservado que dirige la traducción de un polipéptido largo en el citoplasma de las células infectadas. El polipéptido es proteolizado de manera cotraduccional y procesado postraduccionalmente por proteasas celulares y virales en tres proteínas estructurales, la proteína de envoltura E, la proteína de la cápside C, el precursor de proteína de membrana prM y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NSB, NS5, del inglés *non structural*) (**Figura 8.2**). Entre las proteínas no estructurales, NS1 está altamente conservada, con un peso aproximado de 46-55 kDa dependiendo del patrón de glicosilación.

III.8.1.V. Respuesta inmune generada α -Flavivirus

La infección flaviviral desencadena tanto la respuesta inmune celular como la humoral en individuos nunca antes expuestos. En modelos animales, se ha documentado que la respuesta inmune adaptativa juega un rol importante en el control de la infección primaria de WNV, ejemplificada por el alto título viral y la alta mortalidad observada en ratones IgM-deficientes. Esto ha demostrado que el título de IgM cuatro días post-infección posee un alto valor en la prognosis de la enfermedad (Diamond *et al.*, 2003). En otros Flavivirus, el rol de la IgM aún no se ha dilucidado. A pesar de que se ha demostrado que las células T-*helper* (CD4+) y las T-citotóxicas (CD8+) intervienen en el control de la infección con WNV (Shrestha and Diamond, 2004) y DENV (Yauch *et al.*, 2010) en ratones, la presencia de anticuerpos es considerada más importante en términos de protección vacunal.

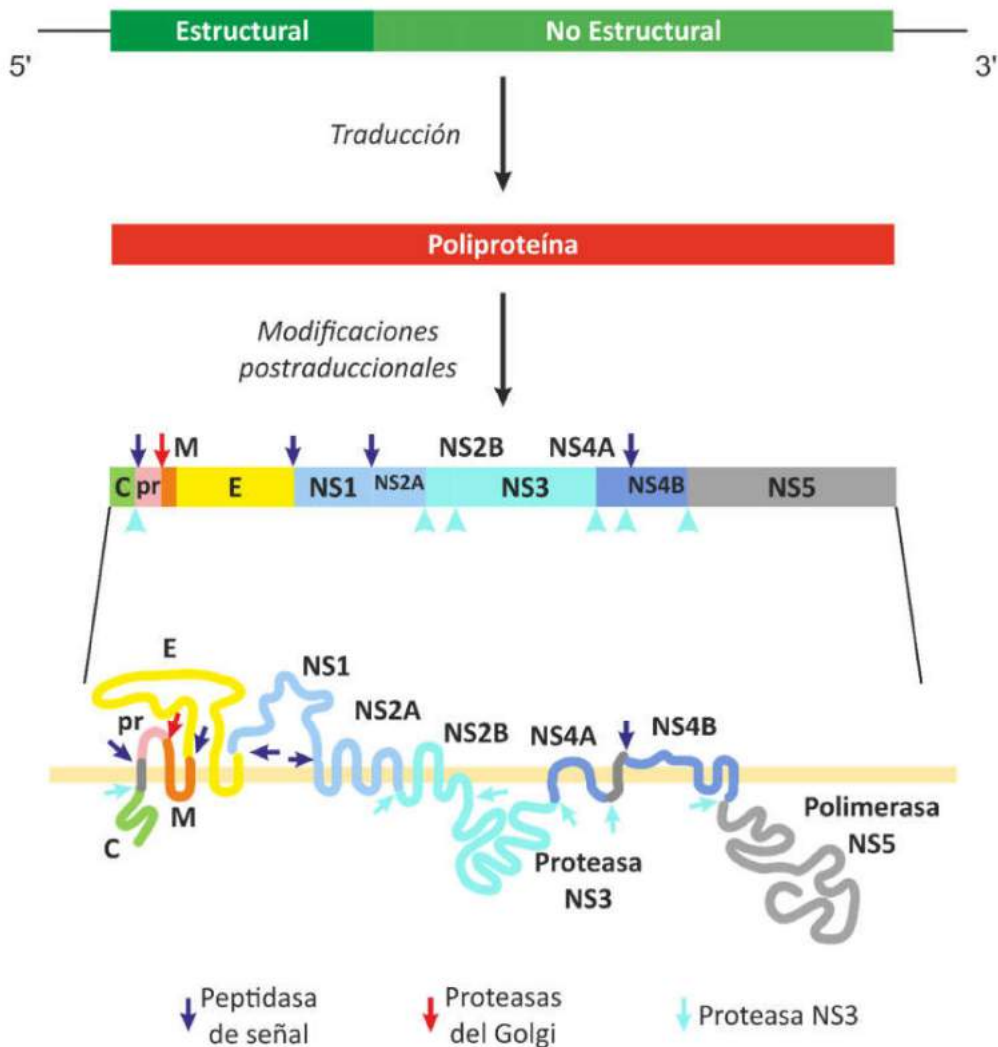


Figura 8.2: Representación esquemática del genoma flaviviral. El diagrama señala el genoma de ARN en verde, la poliproteína resultante en rojo y sus modificaciones postraduccionales en diferentes colores a modo ilustrativo; la imagen inferior ilustra la asociación de la poliproteína con la membrana (en naranja pálido). C: proteína de la cápside; pr: precursor de la proteína de matriz; M: proteína de matriz; E: proteína de la envoltura; NS1: proteína no estructural 1; NS2A: proteína no estructural 2 A; NS2B: proteína no estructural 2 B; NS3: proteína no estructural 3 con actividad proteasa; NS4A: proteína no estructural 4 A; NS4B: proteína no estructural 4 B; NS5: proteína no estructural 5 con actividad polimerasa de ARN. pr es escindida de prM en el Golgi (flecha roja). Las peptidasas señal escinden la poliproteína de manera cotraduccional una vez que cada péptido señal ha cumplido su función de anclar a membrana los diferentes fragmentos proteicos.

Las principales proteínas inductoras de la respuesta inmune y principales candidatas como blancos vacunales, son: **1)** la proteína de la envoltura E, el componente mayor de los viriones que alberga los

sitios de unión al receptor celular y fusión de las membranas luego de la endocitosis mediada por receptor donde se han encontrado varios epítopes para células B y T; y **2)** la proteína NS1 expresada en múltiples formas oligoméricas presentes en diferentes localizaciones celulares, incluyendo las membranas intracelulares, la superficie celular y como lipopartícula secretada soluble en el medio extracelular (Muller and Young, 2013; Akey *et al.*, 2015).

En el caso de E, cada monómero está compuesto por tres dominios: DI, DII y DIII. Estudios sugieren que la respuesta humoral predominante contra E va dirigida contra epítopes del DII (Oliphant *et al.*, 2006). Sin embargo, estos anticuerpos son débilmente neutralizantes, presentan reactividad cruzada con otros Flavivirus y no generan protección en modelos animales. Por otro lado, se han encontrado epítopes tipo-específicos, potentes y neutralizantes en la superficie lateral del DIII. Esta región ha sido asociada con la atenuación de la virulencia y la habilidad de los virus a escapar de la neutralización específica, sugiriendo que DIII cumple un rol en el reconocimiento del receptor celular (Beasley and Barrett, 2002).

Por otro lado, en el caso de NS1, tanto la forma secretada (NS1s) como la asociada a la superficie celular son altamente inmunogénicas y pueden contribuir a la patogénesis de la infección por flavivirus en el huésped. Durante la infección aguda por DENV, se encontraron altos títulos de NS1s en sueros de pacientes (Gubler and Kuno, 1998) e incluso en animales, podría aumentar la infección por interferir con el sistema inmunológico (Avirutnan *et al.*, 2010).

Como componente extracelular, estas características hacen de NS1 un candidato vacunal ideal contra la infección, de hecho, la inmunización de ratones de laboratorio con NS1_{DENV} los protege contra el desafío (Schlesinger *et al.*, 1987). Sin embargo, se ha informado que los anticuerpos contra NS1_{DENV} reaccionan de forma cruzada con componentes de superficie en plaquetas humanas y células endoteliales, lo que da como resultado la inhibición de la agregación

plaquetaria y la apoptosis de las células endoteliales (Lin *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2009).

III.8.1.VI. Virus inactivados y subunidades virales como candidatos vacunales contra Flavivirus

Para virus transmitidos por vectores, es razonable pensar que un control efectivo del vector reduciría mayormente la morbilidad de la infección. En el caso de los Flavivirus, el control de las poblaciones de mosquitos vectores ha sido ineficiente (Ooi *et al.*, 2006). Por lo tanto, la vacunación contra los patógenos parece ser el único y más efectivo método para controlar el ritmo de infección. De hecho, una de las vacunas más efectivas desarrolladas con virus vivos atenuados ha sido contra YFV (Theiler and Smith, 1937). Existen además vacunas contra JEV y TBEV. Para el resto de los Flavivirus de importancia epidemiológica como WNV, DENV y SLEV aún no hay vacunas disponibles (Osterhaus *et al.*, 2010).

El gran impacto de las infecciones flavivirales en la salud pública y el hecho de que la prevención es difícil de llevar a cabo a través del control de los vectores, el desarrollo de vacunas contra Flavivirus es esencial para el control a largo plazo, la eliminación de las infecciones y la reducción de la morbilidad y mortalidad asociadas. Las vacunas actuales contra YFV, JEV y TBEV han probado la efectividad como prevención. Actualmente, el esfuerzo conjunto de la vacunología moderna está enfocado en el desarrollo de vacunas contra el resto de los Flavivirus de importancia epidemiológica, además de perseguir la mejora en la efectividad de las vacunas ya existentes. Se han ensayado vacunas en casi todas las plataformas disponibles (**Tabla 8.1**), desde virus completos inactivados, vivos-atenuados, subunidades virales, vacunas de ADN y vectorizadas. Las vacunas disponibles contra JEV y TBEV contienen virus completos inactivados con formalin y purificados

a partir de cerebro murino 25 o de cultivos celulares. Sin embargo, existen varios factores negativos en cuanto al uso de vacunas inactivadas, sus costos, requieren de varias dosis para alcanzar una protección efectiva y lo más importante, requiere de varios refuerzos para mantener la inmunidad.

Tabla 8.1: Vacunas flavivirales en la actualidad. Se detallan las estrategias utilizadas para el diseño de las vacunas, sus características y el estado actual de las pruebas clínicas (Osterhaus *et al.*, 2010).

Tipo de vacuna	Virus	Antígeno	Miscelanea
Virus inactivados/muertos	JEV	Virus completo	Aprobada para el uso en humanos
	DENV-2	Virus completo	Estudios pre-clínicos en ratones y primates no humanos
	WNV	E, prM, virus completo	Baja inmunogenicidad, se requiere el uso de adyuvantes
Subunidad	DENV-2	D III, NS1, proteína E	Testeo de la inmunogenicidad en ratones
	DENV-4	C-M-E-NS1	Testeo de la inmunogenicidad en ratones
	WNV	D III, proteína E, NS1	Baja inmunogenicidad, solo testeada en ratones
	JEV	prM-E	Testeo de la inmunogenicidad en ratones
ADN	DENV	prM-E, NS1	Baja inmunogenicidad
	JEV	E	Baja inmunogenicidad
	WNV	E, prM, C	Baja inmunogenicidad
Virus vivos atenuados	YFV		Aprobada para el uso en humanos
	DENV mono y tetravalente		Pruebas clínicas en fase I y II
	JEV		Pruebas clínicas en fase I y II concluidas
	WNV		
Vectorizadas	WNV	E, prM	Vectores usados: MVA, MV, AdV, pox-, alfavirus

III.8.1.VII. La proteína NS1 flaviviral como blanco para el desarrollo de vacunas

El gen de la NS1 está altamente conservado en todos los flavivirus y codifica un polipéptido de 352 aminoácidos con un peso molecular estimado de 46-55 kDa, dependiendo del patrón de glicosilación de la

proteína. Esta proteína existe en varias formas oligoméricas y se ha encontrado en diferentes localizaciones celulares: unida a la membrana plasmática en asociación con compartimentos vesiculares intracelulares inducidos por el virus (NS1mpi), en la superficie celular (NS1mps) y una forma soluble hexamérica que es secretada formando una lipopartícula (NS1s). La NS1mpi colocaliza con un ARN doble cadena y otros componentes del complejo de replicación viral y juega un rol esencial como cofactor en la replicación. A pesar de que esto hace de NS1 un blanco ideal para el diseño de inhibidores, la naturaleza precisa de su función como cofactor no ha sido dilucidada aún. Varios patrones de interacción potenciales han sido identificados, particularmente para la forma NS1s, muchos de ellos involucrados en estrategias de evasión inmune (Avirutnan *et al.*, 2010). La NS1s y NS1mp son altamente inmunogénicas y ambas proteínas y los anticuerpos que inducen, han sido asociadas a roles de protección y patogénesis en el huésped infectado (Schlesinger, Brandriss and Walsh, 1987; Gubler and Kuno, 1998). Además, NS1 es un importante biomarcador para detectar la infección temprana de la enfermedad (Muller and Young, 2013). A nivel inmunológico, su importancia radica en la activación de los TLRs y la inhibición del sistema de complemento. La NS1 monomérica celular tiene funciones en la replicación viral, mientras que se ha reportado que la forma secretada y la forma asociada a la membrana tienen funciones en la evasión de la respuesta inmune (Rastogi *et al.*, 2016).

III.8.2. Desarrollo de herramientas y estrategias de trabajo

III.8.2.I. Vacunología inversa aplicada: vehiculización de NS1_{SLEV}

Con el fin de obtener VLPs quiméricas generadas por la actividad de Z de JUNV conteniendo NS1_{SLEV} en su superficie (VLP_{SZ+NS1}), se diseñó y construyó el plásmido pResNS1_{SLEV} (**Figura 8.3**) a partir del vector presentador de antígenos pResAg. En este modelo, Z es aportada en *trans*. El clonado molecular de la secuencia de NS1_{SLEV} fue realizado en colaboración con el Lic. Matias S. Lorch, de nuestro laboratorio, quien forma parte del proyecto que tiene a NS1_{SLEV} como protagonista para el diseño de *kits* diagnósticos.

El vector de expresión pResNS1_{SLEV} expresa una proteína quimérica de aproximadamente 61 kDa, compuesta por la secuencia completa de la proteína NS1_{SLEV} (51 kDa) fusionado a la porción de la glicoproteína de G2 de JUNV incluida en pResAg (10 kDa).

III.8.2.I.A. Amplificación por PCR con *primers* específicos

Se diseñaron *primers* que hibridaran desde el codón de inicio de la secuencia de NS1_{SLEV} hasta el codón de finalización. La secuencia de NS1_{SLEV} no posee secuencia Kozak ya que forma parte del polipéptido mayor que será proteolizado co-traduccionalmente. El diseño incluyó el agregado corriente arriba de la secuencia de reconocimiento y corte de las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Xho*I.

La secuencia de los *primers* empleados se detalla en una tabla en el Capítulo Materiales y Métodos. En cuanto al diseño del perfil de ciclado, dado que los *primers* diseñados incorporan secuencias de reconocimiento y corte para endonucleasas de restricción que no están presentes en la secuencia original, se utilizó un protocolo estándar de

ciclado doble, donde en los primeros cinco ciclos la temperatura de hibridación fue de 60°C durante 15" y en los siguientes treinta y cinco ciclos se utilizó la temperatura de hibridación calculada para el largo total de los *primers* de 68°C durante 15". Debido al largo de la secuencia a amplificar y la procesividad de la polimerasa de ADN empleada, la extensión estándar de cada ciclo calculada fue de 2' y la extensión final fue de 8'.

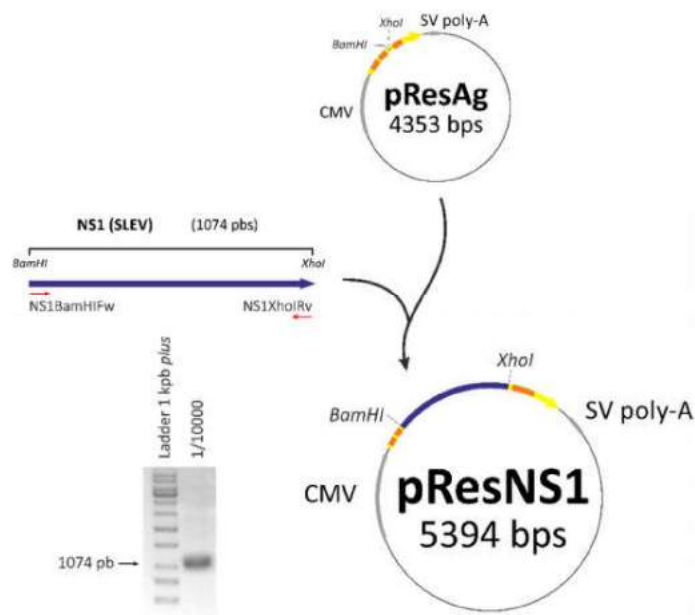


Figura 8.3: Clonado molecular de pResNS1_{SLEV}. Esquema del diseño *in silico* de la estrategia de clonado molecular del plásmido de expresión pResNS1_{SLEV}. En la parte inferior del esquema del ORF se visualizan en un gel de agarosa los productos de amplificación de la secuencia de NS1 con los *primers* indicados; la calle indica la concentración de molde utilizado. CMV prom: promotor de *Citomegalovirus*; SV 40 poly A: terminador del *Simian virus 40*

III.8.2.II. Análisis de la expresión

Los plásmidos fueron transfectados en células HEK-293T y COS-7 para evaluar la existencia de diferencias cuantitativas en la expresión entre ambas líneas celulares. Cada muestra fue procesada separando las fracciones M y Sn. En esta última se espera detectar en mayor

proporción, las proteínas recombinantes y la proteína Z contenidas en VLPs. La fracción de la monocapa fue analizada en todos los casos como control de expresión, ya que en las células deberían detectarse tanto las proteínas expresadas completas aún no vehiculizadas, como los intermediarios siendo traducidos al momento de la cosecha celular.

El método de purificación utilizado fue el de ultracentrifugación en colchón de sacarosa durante 2 hs a 4°C, para luego resuspender en *pellet* en 40 µl de *buffer* PBS 1X.

Los *pellets* obtenidos fueron sometidos a una corrida electroforética en SDS-PAGE y analizados mediante técnicas de inmunodetección con anticuerpos específicos α -Z, α -NS1_{SLEV} y α -SLEV, según el caso, utilizando controles de la técnica y de las proteínas a detectar.

Se ensayaron diferentes cantidades relativas de plásmido hasta optimizar la técnica y se utilizaron como controles negativos, células sin transfectar, células sin transfectar expuestas al reactivo de transfección y el vector presentador de antígenos pResAg "vacío" (sin secuencias proteicas clonadas en su MCS). El control de transfección fue pZ-eGFP, también utilizado como control de generación de VLPs. Otros controles implicaron la transfección del plásmido pZ únicamente y de pResNS1; en el primer caso se espera que se generen VLPs "vacías" y que no sean detectadas con anticuerpos α SLEV ni α Z, y en el segundo caso, se espera que la presencia de NS1 sea detectada en la monocapa, pero no en el sobrenadante con α SLEV.

III.8.2.II.A. pResNS1

Tras una corrida electroforética con sendos controles, se realizó la inmunodetección con sueros policlonales α -Z (1/2000) y α -SLEV (1/640) y se logró detectar en ambos casos la presencia de las proteínas respectivas (**Figura 8.4**).

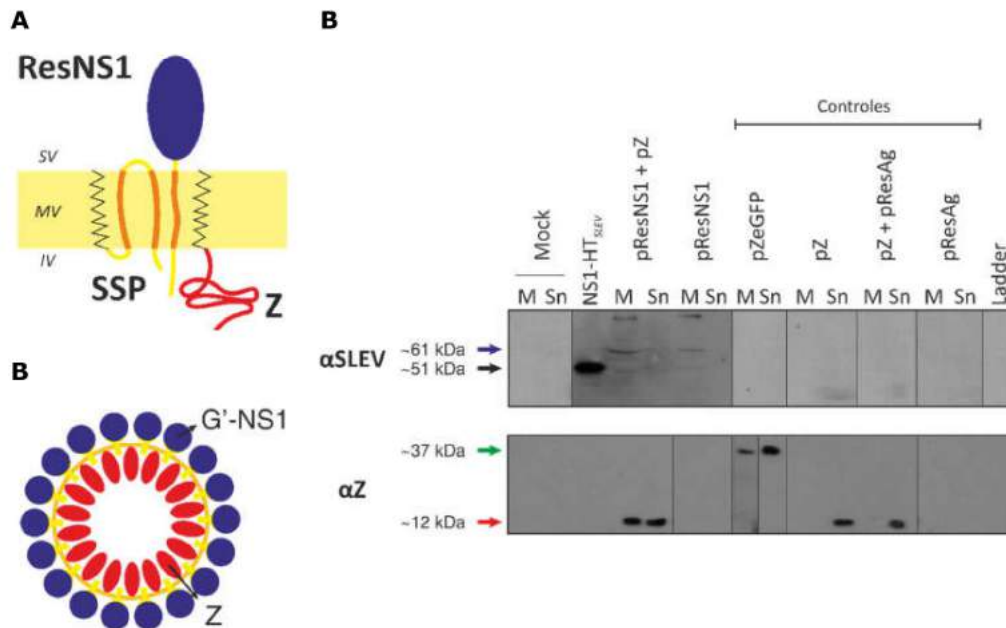


Figura 8.4: Análisis de la expresión de pResNS1. **A-** Diagrama de la sección transversal de una VLP_{Z+NS1} conteniendo las proteínas Z y NS1 ancladas a su membrana; SV: superficie de la VLP; MV: membrana de la VLP; IV: interior de la VLP. **B-** Diagrama de una VLP_{Z+NS1}. **C-** Superior: la flecha negra señala la banda correspondiente al tamaño de NS1-HT_{SLEV} de aproximadamente 51 kDa; la flecha azul señala la banda del tamaño de la proteína recombinante 'ResNS1' expresada en el vector pResNS1 de aproximadamente 61 kDa. Inferior: la flecha roja señala las bandas correspondientes al peso molecular de Z; la flecha verde corresponde a la proteína recombinante Z-eGFP. M: monocapa; Sn: sobrenadante; Mock: células sin transfectar. Los anticuerpos fueron utilizados 1/2000 (α Z) y 1/640 (α SLEV) en PBS1X, caseína 1%, Tween 0,1% y revelados con biolumina conjugada con peroxidasa; control positivo: NS1-HT_{SLEV} expresada en bacterias; pResAg: vector de expresión "vacío"; pZ + pResAg: cotransfección pZ y pResAg; Z-GFP: fusión de la proteína Z con GFP generada en nuestro laboratorio como control de generación de VLPs.

No hubo inmunodetección cruzada entre los controles de Z y SLEV, así como tampoco se obtuvo señal en las células sin transfectar y en las células transfectadas con pResAg.

III.8.2.II.A. Visualización de VLPs_{Z+NS1} mediante microscopía

Las VLPs purificadas a partir de la fracción sobrenadante de los cultivos cotransfectados con pResNS1_{SLEV} y pZ fueron observadas

utilizando un microscopio electrónico de transmisión convencional (**Figura 8.5**).

Se observaron VLPs de diferentes tamaños, en un rango de 60-100 nm de diámetro. Para confirmar la identidad de las proteínas insertas en estas VLPs será necesario acoplar su visualización por TEM a técnicas de inmunodetección.

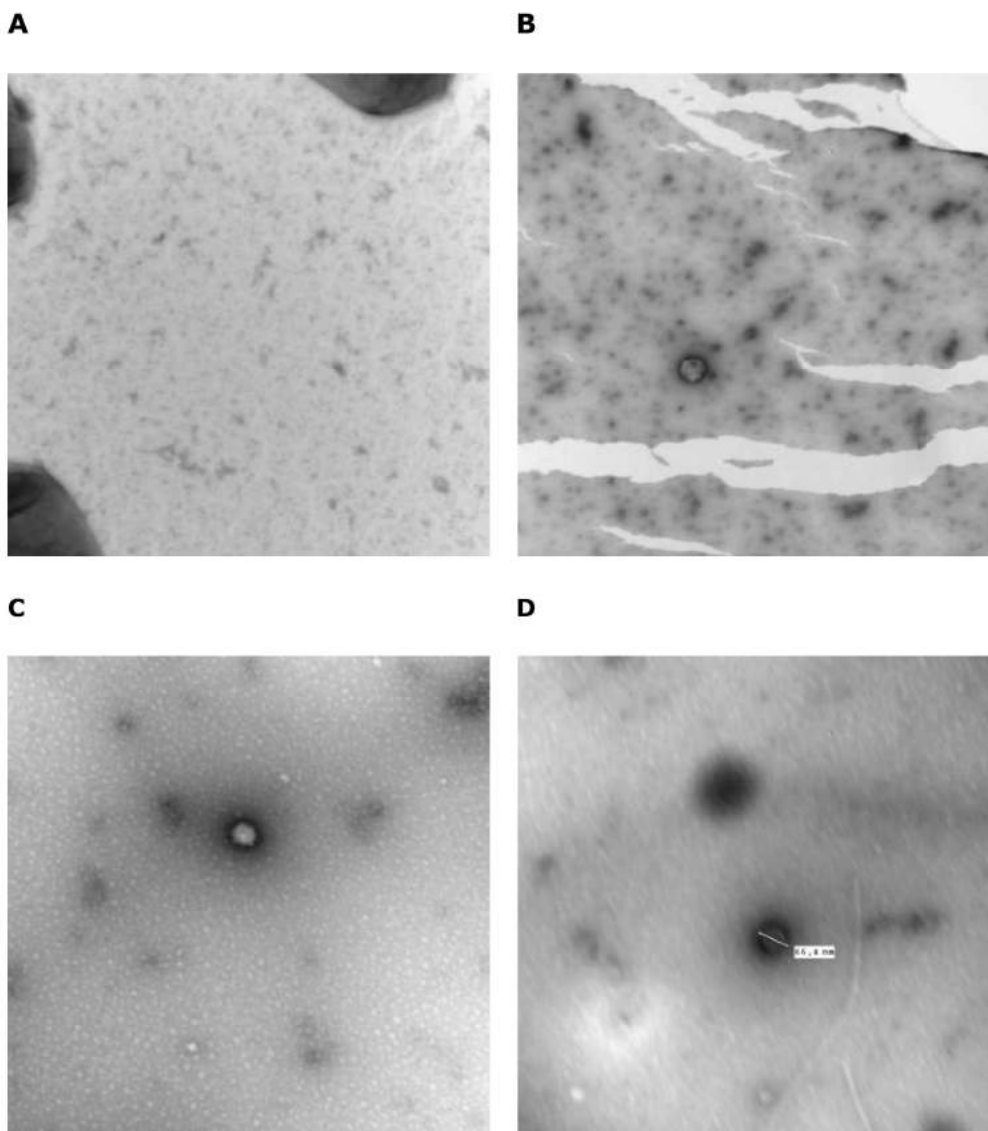


Figura 8.5: Visualización por microscopía electrónica de transmisión de la presencia de VLPs_z en el Sn de cultivo; A- Mock; B- Control de transfección pZ; C- Control de transfección pZ-GFP; D- Cotransfección pZ + pResNS1, se señala una VLP de 66,4 nm de diámetro.

III.8.2.III. Producción de suero policlonal α -NS1_{SLEV}

Con el fin de obtener un suero policlonal α -NS1_{SLEV} para ser utilizado en los ensayos de detección, se inocularon cinco ratones BALB/C con NS1_{SLEV} expresada en *E. coli* y purificada.

Los ratones fueron inmunizados tres veces cada dos semanas con una preparación 50% proteína y 50% adyuvante incompleto. Los sangrados parciales fueron realizados según protocolo estándar en la extremidad de la cola un día antes de cada inoculación.

Para evaluar la inducción de anticuerpos tras cada inoculación se optimizó un EIA indirecto utilizando la misma proteína con la que se realizaron los ensayos de inmunización y se pudo observar una respuesta favorable en todos los animales (**Figura 8.6**).

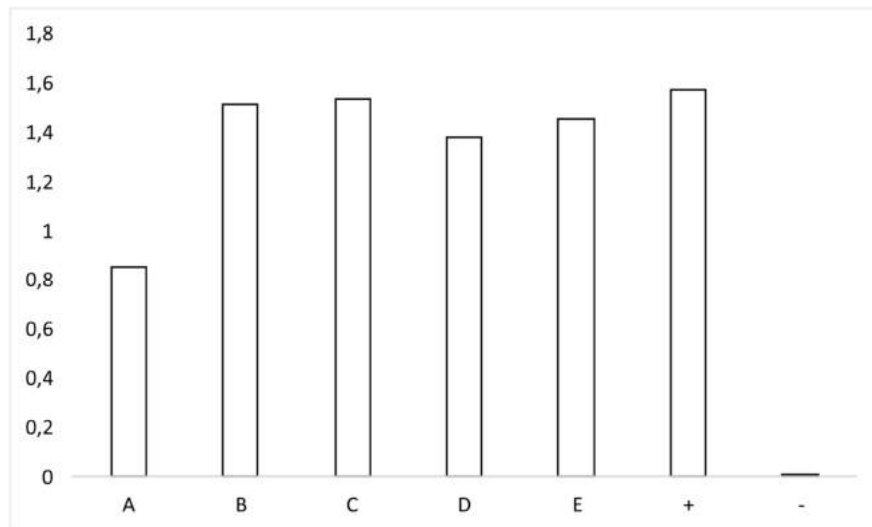


Figura 8.6: Evaluación de la respuesta inmune α -NS1_{SLEV}. Las muestras de suero del día 45 fueron diluidas 1/1600 y utilizadas para la determinación de IgG α -NS1_{SLEV} mediante EIA: En el eje Y se observa la media aritmética de los ensayos duplicados de la densidad óptica (DO) a 590 nm; en el eje X se muestran los cinco ratones utilizados en el ensayo, el control positivo y el control negativo. El control positivo utilizado fue líquido ascítico α -SLEV de ratón y el control negativo fue suero preinmune.

III.8.3. Discusión y conclusión

Las infecciones flavivirales representan un grave problema de salud pública a nivel mundial. Las recientes epidemias generadas por DENV y la emergencia de virus como Zika, han demostrado la importancia de la prevención ya sea mediante el control de los vectores o mediante el diseño de programas de vacunación (Ooi *et al.*, 2006; Malone *et al.*, 2016; Waggoner and Pinsky, 2016).

El control de los vectores ha sido uno de los puntos débiles de los programas de prevención en las últimas décadas, debido principalmente a la imposibilidad de eliminar completamente especies cosmopolitas o por el alto costo de las operaciones. Por otro lado, la vacunología ha tenido un desarrollo importante en los últimos treinta años. Se ha optimizado la protección generada por vacunas ya existentes, mediante el diseño de nuevas plataformas para la vehiculización y presentación antigénica y se han desarrollado herramientas bioinformáticas con carácter predictivo con el fin de desarrollar vacunas *de novo* (Osterhaus *et al.*, 2010).

Asimismo, no solo se trata de prevenir la infección de virosis ya establecidas, sino de prevenir las re-emergencias virales o la diseminación en nuevas áreas donde los vectores son endémicos.

Se ha demostrado que las vacunas de subunidades de flavivirus que utilizan la proteína E recombinante, la combinación de prM-E o sólo el DIII de E, son efectivas e inmunógenas en modelos animales (Chua *et al.*, 2013). La principal desventaja para el uso de DIII como antígeno vacunal es el uso de un adyuvante para la inducción eficaz de una respuesta inmune protectora.

Por otro lado, NS1 es uno de los inmunógenos virales principales, ya que circula en concentraciones relativamente altas en el suero de individuos durante la fase aguda de la infección flaviviral. En la infección primaria por DENV, se obtienen respuestas IgM e IgG α -NS1 relativamente bajas a partir de los 2 y 9 días, respectivamente, de la

aparición de la sintomatología característica (Shu *et al.*, 2003, 2004). Posteriormente, una respuesta anamnésica da como resultado un aumento rápido de los anticuerpos α -NS1 durante la fase aguda de la enfermedad (Falkler *et al.*, 1973; Churdboonchart *et al.*, 1991). A pesar de que estos no son anticuerpos neutralizantes, estudios realizados con algunos de los primeros anticuerpos monoclonales específicos de flavivirus demostraron que eran capaces de proporcionar protección a los ratones frente a un desafío viral letal en pasivo (Gould and Solomon, 2008). En nuestro trabajo, una primera aproximación de un ensayo de inoculación en animales de laboratorio arrojó resultados favorables en cuanto a estimulación de la respuesta humoral α -NS1_{SLEV}. En una etapa posterior, será necesario desafiar ratones con el fin de evaluar la protección generada.

Por otro lado, la aplicación de herramientas de vacunología reversa para la vehiculización de NS1_{SLEV} en VLPs quiméricas, también arrojó resultados favorables. En una etapa ulterior pensamos utilizar la técnica *immunogold* con nuestros anticuerpos específicos α -NS1_{SLEV} acoplada a microscopía electrónica de transmisión con el fin de confirmar definitivamente la identidad de las proteínas vehiculizadas en las VLPs. Asimismo, se pretenden vehiculizar péptidos que incluyan las regiones lineales más inmunogénicas de NS1 con el fin de evitar la expresión de la proteína completa e intentar así maximizar la producción de VLPs_{Z+NS1}.

En cuanto al diagnóstico de SLEV, la reactividad cruzada entre distintos flavivirus pertenecientes al complejo JEV, dificulta el adecuado diagnóstico y entorpece el desarrollo de técnicas serológicas de detección. Por estas razones, es fundamental el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos que permitan diferenciar entre las infecciones flavivirales (Hasan and Jibrán, 2013). La vehiculización de NS1_{SLEV} en un entorno particulado puede ser utilizada también en el diseño de *kits* diagnósticos específicos con el fin de evitar la reactividad cruzada de los métodos actuales. En la actualidad, una de las líneas de

trabajo existentes en el laboratorio está enfocada en desarrollar un método diagnóstico utilizando NS1_{SLEV} expresada en procariotas y se han realizado ensayos de inmunización en ratones para evaluar la respuesta generada α - NS1_{SLEV} con resultados favorables. En el corto plazo, esperamos inocular ratones con VLPs_{SZ+NS1} para evaluar la respuesta inmune generada α -NS1 en un entorno particulado y poder comparar la misma con la respuesta inmune generada por la proteína purificada. Asimismo, una vez que ambos ensayos estén completos, se espera poder desafiar ratones para ensayar la protección alcanzada por la inoculación con VLPs_{SZ+NS1} y con NS1_{SLEV}.

En este capítulo hemos obtenido resultados prometedores que parecen indicar que la vehiculización de NS1_{SLEV} en una herramienta molecular generadora de VLPs recombinantes es exitosa. Su aplicabilidad incluye desde el establecimiento de una nueva plataforma vacunal contra SLEV, contra el cual no se han reportado vacunas exitosas, hasta el desarrollo de *kits* diagnósticos. Llegada esta etapa, se necesitan nuevos análisis que confirmen la identidad de las proteínas contenidas en las VLPs así como la optimización del sistema de expresión para mejorar cuantitativamente la producción de las mismas.



Capítulo 9

Discusión y conclusiones

Discusión y conclusiones

El diseño racional de vacunas no sólo implica la búsqueda de antígenos cuya inmunogenicidad permita inducir respuestas inmunes amplias y completas, sino también el desarrollo de plataformas vacunales adecuadas para el correcto transporte y presentación antigénicos (Osterhaus *et al.*, 2010). Mediante ingeniería genética y utilizando herramientas de la biología estructural, la bioinformática y la vacunología inversa, se han desarrollado plataformas basadas en proteínas de matriz virales capaces de generar VLPs quiméricas con propiedades adecuadas como antígeno o como transportadoras de inmunógenos foráneos (Ludwig & Wagner, 2007).

En este contexto, la proteína Z de los arenavirus se presenta como una herramienta interesante debido a su pequeño tamaño y a su capacidad de dirigir el proceso de brotación de VLPs de manera autónoma sin necesidad de otras proteínas virales (Fehling *et al.*, 2012).

El objetivo general perseguido en este trabajo fue el diseño y desarrollo de una plataforma presentadora de antígenos, basándonos en la estrategia de vacunología inversa. Es así que se evaluó la capacidad de la proteína Z de JUNV para generar VLPs recombinantes en diferentes contextos: por un lado, fusionada a proteínas virales con alta inmunogenicidad y, por otro lado, aportada en *trans* como directora de la brotación de VLPs. En esta última estrategia, se llevó a cabo el diseño y caracterización preliminar de un vector de expresión para células de mamífero, pResAg, a partir de elementos genómicos de JUNV capaz de presentar antígenos anclados en la membrana plasmática de las VLPs generadas por la actividad de Z.

En la **Figura 9.1** se resumen las estrategias diseñadas basadas en la vehiculización antigénica en VLPs_Z.

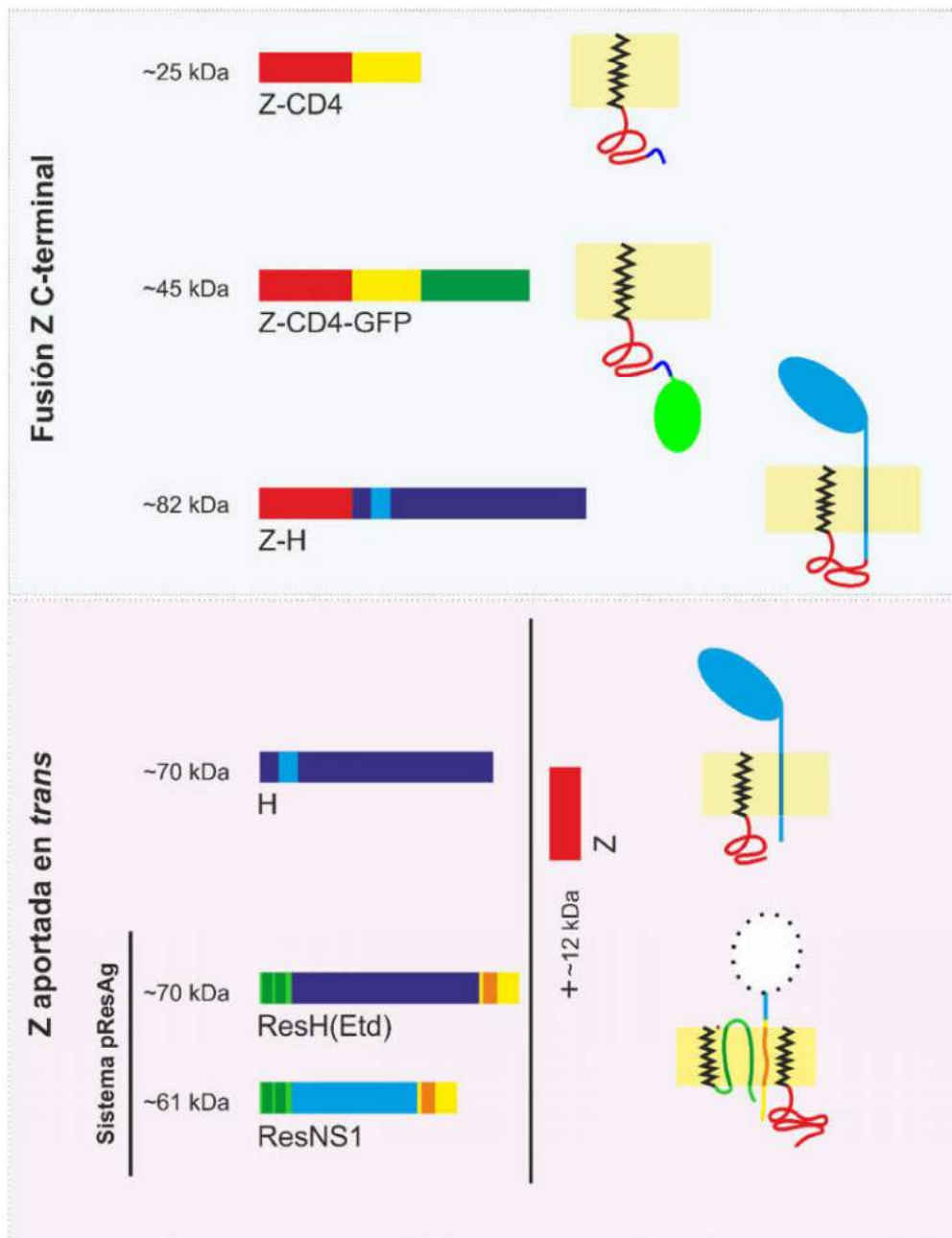


Figura 9.1: Resumen de las proteínas expresadas en las diferentes estrategias diseñadas. Representación esquemática de los diferentes productos proteicos obtenidos a partir de las dos grandes estrategias establecidas en este trabajo doctoral: la fusión Z C-terminal y Z aportada en *trans*. A la izquierda se indican los tamaños de las proteínas, y a la derecha las representaciones esquemáticas de los cortes transversales de las VLPs esperadas.

En una primera aproximación al uso de Z como productora de VLPs químicas, se analizó la expresión de su fusión al dominio CD4

altamente inmunogénico de la proteína VP6 de RV. La elección de CD4 se debió principalmente a su pequeño tamaño y a su elevada antigenicidad (Choi *et al.*, 2000). En un ensayo de inmunización intranasal con VP6 expresada en *E. coli* se observó estimulaba una protección casi completa cercana al 92% (**Cap. 3, Figura 3.2**). Utilizando herramientas de vacunología inversa, se logró determinar qué regiones de la proteína VP6 estimulan una mayor protección. La extraordinaria magnitud de protección proporcionada por la porción CD4 de VP6 podría estar mediada por el epítipo de células T-CD4⁺ y no requerir epítopes como los reconocidos por receptores de inmunoglobulina específicos en células B (Choi *et al.*, 2000). Sin embargo, la protección dependía de la inclusión de un adyuvante mucosal durante la inmunización. Se ha reportado que las VLPs envueltas poseen la capacidad de ser autoadyuvantes, ya que derivan de la membrana plasmática de células que incluyen elementos proteicos que podrían conferirle dichas propiedades (Ludwig & Wagner, 2007). Basándose en este contexto, la Dra. Borio diseñó una estrategia en nuestro laboratorio para vehiculizar el dominio CD4 en VLPs_Z. Como se detalla en el **Capítulo 3**, por un lado fue posible detectar la proteína Z-CD4 y Z-CD4-GFP en el Sn mediante el uso de anticuerpos específicos, mientras que por otro lado se visualizó fluorescencia en los cultivos celulares transfectados con pZ-CD4-GFP, evidenciando su correcta expresión (**Figura 3.4** y **Figura 3.5.C**). Estos análisis de expresión fueron los resultados preliminares de la estrategia, habiéndose diseñado y evaluado la respuesta inmune inducida en ratones de laboratorio por una vacuna de ADN basada en el vector pZ-CD4 y pZ-CD4-GFP (Bergier, 2016). Una perspectiva a corto plazo sería vehiculizar el dominio CD4 de VP6 en pResAg (**Capítulo 5**) y evaluar la capacidad de la plataforma una vez más con un péptido de menor tamaño a los empleados hasta el momento.

Con el fin de seguir caracterizando la capacidad de Z en la generación de VLPs quiméricas, en el **Capítulo 4** se utilizó la proteína

H de MeV, una glicoproteína de membrana en la que se basan las vacunas actuales contra MeV y con la cual se están realizando ensayos de optimización vacunal (Julik & Reyes-Del Valle, 2016). La resistencia, durabilidad y seguridad de la inmunidad inducida por las vacunas contra el sarampión actuales han sido difíciles de superar por estas vacunas experimentales. Es así que la alternativa de generar vacunas α -MeV basadas en VLPs de JUNV conteniendo H es alentadora debido a las ventajas de los sistemas basados en VLPs. De esta forma, se diseñaron dos estrategias para vehiculizar la proteína H del virus del sarampión en VLPs_Z. En la primera de ellas, se fusionó el extremo carboxilo de Z al amino de H, dando lugar a la expresión de una proteína de fusión Z-H con capacidad de dirigir el proceso de brotación de VLPs, y además, contener los epítopes H contra los que se genera respuesta humoral neutralizante. Se ha documentado en otras proteínas de matriz virales, como Gag de HIV o la proteína M1 del virus influenza, retienen la capacidad de gemación cuando son fusionadas a otras proteínas de pequeño tamaño (Chackerian, 2007). Sin embargo, no se ha documentado la fusión de proteínas del tamaño de H (~70 kDa). En el caso de la proteína Z arenaviral, la fusión de Z de TCRV a la proteínas indicadora luciferasa (~24 kDa) (Capul & de la Torre, 2008), y la fusión a GFP (~25 kDa) (Borio *et al.*, 2012) son el mejor ejemplo de proteínas completas fusionadas a Z que le permiten retener su capacidad de brotación, aunque ambas proteínas son de un tamaño menor al de H y una estructura terciaria mucho menos compleja. Se pudo observar que la fusión del extremo carboxilo de Z al extremo amino de H da como resultado una proteína truncada de un tamaño menor al esperado cuando se analizaron las muestras utilizando anticuerpos específicos α -Z (**Figura 4.6**). El bajo rendimiento en la expresión de Z-H y la baja reproducibilidad impidió asimismo la producción a mediana escala para confirmar la presencia de VLPs mediante microscopía electrónica. Esto podría deberse a un efecto, potenciado por la fusión, de la citotoxicidad de Z para la célula

hospedadora, que dificulta su expresión en cantidades detectables a través de los métodos empleados. Fue posible inferir asimismo que la estrategia de fusión no respondió según lo esperado, debido no sólo al tamaño y las características de H sino también a que la proteína recombinante resultante posee dos dominios que anclan la proteína a la membrana y que podrían interferir entre sí en su correcto procesamiento: el primero es el residuo miristoilado de Z en la posición dos y el segundo es el dominio transmembrana propio de H (**Figura 4.6**). En la segunda estrategia diseñada, se ensayó la expresión de la proteína H completa, sin fusionar ninguno de sus extremos a la proteína Z, y la capacidad de ser reclutada en VLPs. En esta estrategia se espera que el péptido señal propio contenido en la secuencia de H dirija la proteína a la membrana de las células transfectadas. El correcto procesamiento y plegado de la proteína le permitiría dimerizar y tetramerizar aún en ausencia de otras proteínas virales (Logan *et al.*, 2016). En esta estrategia, Z debió ser aportada en *trans* y se planteó la hipótesis de que, a pesar de no interactuar entre sí, H y Z se hallen en las VLPs de forma independiente. Los resultados arrojados en esta estrategia fueron alentadores, incluso fue posible fotografiar las VLPs mediante microscopía electrónica de transmisión convencional (**Figura 4.7.C**) aunque no se confirmó la presencia de H en las mismas mediante TEM acoplado a inmunodetección. Sin embargo, las características intrínsecas de las proteínas utilizadas impidieron el escalado en la producción de VLPs que permita la confirmación de su identidad proteica, dando lugar luego a los ensayos de inoculación en animales de laboratorio. Es importante destacar que no se ha documentado sobre la existencia de un sistema similar que implique a la proteína H, por lo que los resultados aquí mostrados serían los primeros sobre la expresión de una proteína recombinante de estas características. Asimismo, sería necesario predecir regiones antigénicas lineales de pequeño tamaño, aunque al ser sus epítopes

tan complejos, aún no se ha documentado una estrategia exitosa para este enfoque.

Debido a todas las desventajas que se presentan cuando se emplea una estrategia de fusión de proteínas, es posible tener en cuenta las propiedades de interacción proteína-proteína que presenta Z. Por ello, la segunda estrategia se basa en dos herramientas: un plásmido que presenta elementos genómicos mínimos de JUNV capaces de interactuar con Z de manera no covalente, y la proteína Z expresada de forma separada. Estos elementos son definidos a partir de bibliografía, ya que según sus características permitirían dirigir antígenos en la superficie de las membranas. En conjunto con la expresión de Z, las membranas podrían dar lugar luego a la formación de VLPs, producidas por la actividad de ésta última. En el **Capítulo 5** se describe la metodología empleada para el diseño, desarrollo y modelado bioinformático de esta plataforma molecular (pResAg) utilizando herramientas de la vacunología inversa. Este tipo de plataformas están siendo utilizadas cada vez más no sólo como vehículo antigénico, sino también como *delivery* de proteínas u oligonucleótidos con fines terapéuticos (Noad & Roy, 2003; Ludwig & Wagner, 2007). Es importante destacar que no existe bibliografía disponible donde se estudien de forma independiente las características de estos elementos genómicos seleccionados. Si bien el diseño del sistema pResAg busca pura y exclusivamente el direccionamiento y anclaje de antígenos a la membrana para ser exportados en VLPs, también se tuvo en cuenta la inmunogenicidad de las proteínas involucradas en el sistema, ya que se eliminaron las secuencias más inmunogénicas del GP-C (G1 y el ectodominio de G2) (**Figura 5.3**) (Branco *et al.*, 2010; Illick *et al.*, 2008). Por otro lado, el modelado comparativo de proteínas llevado a cabo para predecir la conformación de pResAg en la membrana plasmática de las VLPs, resultó similar al obtenido previamente para las proteínas G2 y SSP utilizando otros modelos predictivos (York *et al.*, 2004; Zapata &

Salvato, 2013), por lo que el diseño del sistema parecería ser acorde con el objetivo de anclar y dar lugar a la vehiculización de antígenos virales (**Figura 5.5 y 5.6**). Inicialmente, múltiples clonados en pResAg fueron diseñados. Por un lado, y siguiendo la estrategia planteada para el estudio de Z, se comenzaron las amplificaciones y clonados para las proteínas indicadoras fluorescentes mCherry y eGFP, con el fin de obtener VLPs fluorescentes fácilmente identificables por microscopía de fluorescencia convencional. Debido a que presentaron varios inconvenientes, aún se sigue trabajando en estas construcciones plasmídicas. Alternativamente, se amplificó y clonó una proteína que presente la opción de medir actividad, seleccionándose GST. Su expresión está aún en proceso de optimización. También se diseñaron estrategias para vehiculizar la proteína L1 de HPV (pResL1), altamente inmunogénica. Para este clonado, se eliminó la secuencia de L1 con capacidad de generar VLPs con el fin de evitar las interferencias de los dos sistemas. Finalmente, en cuanto a las herramientas diseñadas para SLEV, se pretende evaluar la vehiculización de la proteína E, una de las proteínas más inmunogénicas de los flavivirus (Oliphant *et al.*, 2006).

Otra de las características a optimizar será el desarrollo de un vector bicistrónico, que contenga la secuencia de pResAg y la de Z bajo promotores diferentes en un mismo plásmido. Dicho vector ha sido denominado pReZAg y se encuentra en la etapa de clonado. Este vector eliminará los factores aleatorios relativos a la co-transfección de dos plásmidos cuyas secuencias nucleotídicas podrían conferir diferentes características que interfieran con el proceso de transfección.

Siguiendo con el objetivo de caracterizar la capacidad de vehiculización de antígenos por parte de pResAg, en el **Capítulo 6** se evaluó la capacidad de pResAg de vehiculizar el ectodominio de H de MeV. Se seleccionó esta antígeno debido a sus propiedades inmunogénicas y al haber ensayado previamente su fusión al extremo C de Z. Para esta evaluación se tuvieron en cuenta los cinco tipos en que se clasifican los epítopes de H y se los incluyó precisamente por

ser los responsables de la estabilidad antigénica característica del sarampión: el epítoto hemaglutinante *noose*, el epítoto de unión al receptor, el epítoto *sugar shielded*, epítoto neutralizante (NE) y el epítoto *loop*, (Tahara *et al.*, 2016). Por un lado, se logró detectar la presencia de H en el sobrenadante de cultivo en presencia de Z y fue posible fotografiar VLPs mediante microscopía electrónica de transmisión convencional (**Figura 6.3** y **Figura 6.5**). Por otro lado, se encontró la proteína completa en baja concentración y altas concentraciones de fragmentos de tamaños menores a los esperados. Tras un análisis bioinformático de la secuencia, se identificaron varias proteasas que podrían ser responsables del procesamiento indeseado del ectodominio de H. Esto impidió que la estrategia sea escalada para producir VLPs e inocular animales de laboratorio para evaluar la respuesta inmune generada α -H. Como perspectivas, sería importante evaluar la secuencia mínima de H que pueda ser transportada de forma estable e inducir una respuesta inmune detectable y protectora. Esta secuencia deberá ser predicha utilizando herramientas bioinformáticas, basándonos una vez más en la vacunología inversa. Alternativamente, se podría construir una biblioteca de VLPs_{H-G'}, que abarque diferentes epítotos lineales, de manera individual o combinada. Asimismo, esta combinación podría ser realizada a nivel de secuencia (diseños en tándem), o bien emplear formulaciones de múltiples VLPs_{H-G'} (VLPs_{H1-G'} + VLPs_{H2-G'}, etc.). Esta estrategia podría ser útil para superar los inconvenientes que se presentan con secuencias de mucha longitud asociadas a proteínas de elevada complejidad.

Por último, en el **Capítulo 7** se describe la vehiculización de la proteína NS1_{SLEV}, donde se cambia radicalmente la naturaleza del antígeno, tanto por sus características fisico-químicas como biológicas. La selección del antígeno se basó en que la forma secretada y la forma asociada a la membrana de la NS1 de flavivirus tienen funciones en la evasión de la respuesta inmune (Rastogi *et al.*, 2016), activan los TLRs, inhiben el sistema de complemento y son un importante biomarcador

para detectar la infección temprana de la enfermedad (Muller & Young, 2013). Asimismo, en nuestro trabajo la evaluación de un ensayo de inoculación en animales de laboratorio empleando HT-NS1_{SLEV} (proteína recombinante expresada en bacterias) arrojó resultados favorables en cuanto a estimulación de la respuesta humoral (**Figura 7.7**). La vehiculización de NS1_{SLEV} en pResAg mostró resultados alentadores (**Figura 7.5** y **Figura 7.6**), ya que fue posible detectar la proteína en el Sn de cultivo, evidenciando su correcta expresión en esta plataforma. Este resultado es totalmente innovador para una proteína flaviviral de importancia inmunológica y ha impulsado al diseño de nuevas estrategias que incluyan otras proteínas flavivirales como el dominio III de la proteína E de SLEV. Por otro lado, con el fin de llegar a resultados concluyentes, en una etapa ulterior se utilizará la técnica *immunogold* empleando las IgGs purificadas a partir del suero policlonal α -NS1_{SLEV} acoplada a microscopía electrónica de transmisión con el fin de confirmar definitivamente la identidad de las proteínas vehiculizadas en estas VLPs. Asimismo, se pretenden vehiculizar péptidos que incluyan las regiones lineales más inmunogénicas de NS1 con el fin de evitar la expresión de la proteína completa e intentar así maximizar la producción de VLPs_{Z+NS1}. Por otro lado, la vehiculización de NS1_{SLEV} en un entorno particulado puede ser utilizada también en el diseño de *kits* diagnósticos específicos con el fin de evitar la reactividad cruzada entre diferentes flavivirus de los métodos actuales.

El conjunto de los resultados obtenidos dan lugar en primer término a observar que es necesario continuar con la caracterización del sistema de vehiculización aquí diseñado, así como la potencialidad para dirigir la brotación de Z en diferentes contextos de fusión proteica.

Una de las opciones más importante a tener en cuenta es la utilización de péptidos de bajo peso molecular. Ha sido ampliamente documentado que el *delivery* de péptidos más pequeños es mucho más eficiente para numerosas proteínas generadoras de VLPs (Kaczmarczyk

et al., 2011) y no solo como antígenos, si no también como moléculas terapéuticas (Seow & Wood, 2009; Kato *et al.*, 2015).

Una alternativa atractiva para aumentar la inmunogenicidad, es el acoplamiento de proteínas portadoras que contienen epítopes de células T y péptidos que contienen epítopes de células B (Sun *et al.*, 1999). Se ha documentado recientemente que el decorado de VLPs de influenza con moléculas inmunoestimulantes ancladas a glicofosfatidilinositol (GPI-ISM, del inglés *glycosylphosphatidylinositol immunostimulatory molecules*) mediante transferencia proteica, inducía una respuesta inmune celular mucho más efectiva que los controles sin inmunoestimulantes en un modelo animal (Patel *et al.*, 2015). Incluso este mecanismo puede ser un método aplicable a pResAg ya que, según este estudio, la incorporación del inmunostimulante dependía del anclaje a membrana del GPI (Patel *et al.*, 2015).

Asimismo, la vacunación terapéutica tiene un gran potencial tanto para las enfermedades infecciosas en general como para el cáncer y las enfermedades crónicas. Sin embargo, en la mayoría de los casos es necesario avanzar en la obtención de inmunidad protectora. Un objetivo importante a este respecto es optimizar vacunas terapéuticas candidatas para inducir respuestas inmunes amplias y específicas. Una adecuada y completa respuesta inmune incluye anticuerpos específicos (respuesta humoral) y células T-CD4+ y T-CD8+ (respuesta celular) (Gourley *et al.*, 2004). Asociado a esto, se diseñó una estrategia para vehiculizar un ligando específico que permita la internalización de las VLPs luego de la unión a su receptor celular con el fin de evaluar su capacidad para el desarrollo de terapias dirigidas a células tumorales. Como ligando específico se pretende utilizar la proteína transferrina (Tf) encargada del transporte de hierro en suero sanguíneo cuya vía de internalización incluye la unión a su receptor celular TfR1 y la posterior endocitosis mediada por clatrina. De esta forma se evaluará la capacidad de una línea celular tumoral de internalizar VLPs

recombinantes para desarrollar una herramienta que permita el ingreso de moléculas terapéuticas a células oncogénicas (Daniels et al., 2006; Prutkiet al., 2006; Tortorella and Karagiannis, 2014).

Según la OMS (OMS, 2011), a pesar de las mejoras sanitarias y el descubrimiento y uso de antibióticos, las enfermedades infecciosas siguen siendo la principal causa de muerte en todo el mundo. Factores como la expansión de las poblaciones humanas globales y la urbanización, el comercio internacional y los viajes, los sistemas de ganadería intensiva y la proliferación de poblaciones de diferentes reservorios contribuyen a la propagación y persistencia de patógenos emergentes o reemergentes. Es así que, entre otros ejemplos, la fiebre de Zika causada por el virus Zika (ZIKV, del inglés *Zika Virus*), no sólo se diseminó rápidamente por el continente americano, sino que mostró una patología no documentada hasta el momento (o al menos pobremente registrada) causando un síndrome congénito en recién nacidos, y un fuerte impacto en los entramados sociales y económicos de diferentes poblaciones. Por esto, la inmunización debería ser reconocida como el principal componente del derecho a la salud humana y su acceso debe ser una responsabilidad individual, social y gubernamental, ya que únicamente la vacunación, previene unos 2,5 millones de muertes al año en todo el mundo.

Desde el origen de la vacunología clásica o convencional en 1796, con el descubrimiento de la vacuna contra la viruela, los principales avances se han logrado con el mínimo conocimiento de los complejos mecanismos inmunológicos por los cuales las vacunas inducen inmunidad protectora (Plotkin, 2009). La llegada de la genómica ha cambiado radicalmente la forma en que se identifica a los candidatos vacunales. Como resultado de las revoluciones tecnológicas, se ha dado lugar a un renacimiento en el desarrollo de vacunas en el que la identificación rápida y dirigida de nuevos antígenos vacunales es posible mediante análisis genómicos, transcriptómicos y proteómicos a gran escala.

Es así que, aplicando las herramientas disponibles actuales, en este trabajo doctoral se logró diseñar y estudiar experimentalmente un vector plasmídico que contiene elementos genómicos de un virus endémico de nuestro país, ganando a través de los mismos la capacidad potencial de vehiculizar y anclar un péptido viral con características inmunogénicas para ser utilizado como plataforma vacunal genérica. Los resultados obtenidos indican que, aunque se debe seguir indagando en la composición óptima de esta plataforma, puede presentarse como una alternativa simple y eficaz en la prevención de múltiples enfermedades infecciosas.



Sección IV

Materiales y Métodos



Capítulo 10

Materiales y métodos

En esta sección se detallarán los materiales y métodos utilizados a lo largo del trabajo doctoral. Los reactivos químicos utilizados de grado analítico empleados fueron adquiridos en Merck, Sigma, Carlo Erba, Anedra, Biopack, Biorad, Britania, ICN, Gibco. Asimismo, los insumos de biología molecular fueron adquiridos en *Promega* (Madison, EE.UU.), *New England Biolabs* (NEB, Beverly, EE.UU.), *Thermo Scientific* (Vilnius, Lituania), *Bio-Rad* (Hércules, California, EE.UU.), *Invitrogen* (Carlsbad, EE.UU.), *Eppendorf* (Hamburgo, Alemania), *Qiagen* (Duesseldorf, Germany). La esterilización de los materiales se realizó teniendo en cuenta las recomendaciones de los distintos fabricantes. En general se realizó por calor húmedo utilizando el autoclave SMI AVX 90.E (Francia) a 1 atmósfera de presión y 121 °C durante 15 minutos, mientras que la filtración se realizó con filtros de 0,22 µm microclar (MINI CLAR, Argentina). El agua destilada empleada en la preparación de diversos reactivos fue obtenida con el equipo FIGMAY F.M. 4 (Argentina), mientras que la desionización de la misma se realizó con EASY pure RF (*Thermo Scientific Barnstead*, EE.UU.).

IV.10.1. Lugar de trabajo

El lugar de trabajo fue el Área de Virosis Emergentes y Zoonóticas del Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Molecular, dependiente del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes. En ciertos casos, el trabajo se realizó en colaboración con otras instituciones, haciendo uso de sus respectivas instalaciones, a saber:

- **Sección Virología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay:** Desde febrero a marzo de 2016, realicé una pasantía no rentada en el laboratorio del Dr. Juan Arbiza en el marco de un PICT-CABBIO

binacional con el fin de concretar tareas de colaboración entre ambos grupos de trabajo.

- **Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT-CONICET La Plata:** Durante 2014 y 2015, se utilizó equipamiento de esta institución para tareas de purificación de VLPs, bajo la dirección y el aval del Dr. Víctor Romanowski.

- **Laboratorio de Virología QB-20, Departamento de Química Biológica – IQIBICEN – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires:** Bajo el aval de la Dra. Sandra Cordo fue posible utilizar las instalaciones de este laboratorio para la concreción de experimentos y tareas de colaboración entre grupos de trabajo.

- **Laboratorio de Biología Molecular, Fundación Instituto Leloir:** Las instalaciones de este laboratorio fueron utilizadas gracias a la colaboración del Dr. Néstor Gabriel Iglesias en reiteradas ocasiones durante el año 2015.

-También se trabajó en colaboración con el estudiante Agustín Ormazabal del SCI-Prot: Simulación Computacional e Investigación de Proteínas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes.

IV.10.2. Procedimientos de rutina

Los procedimientos realizados con cultivos celulares eucariotas, se llevaron a cabo en flujos laminares NuAire Clase II A/B3 (Biological Safety Cabinets, Modelo UN-425- 600E, EE.UU.), en la Sala de Cultivo Celular del Pabellón de Laboratorios de la UNQ.

Por otro lado, los cultivos bacterianos fueron procesados en un flujo laminar Telstar Clase II (Modelo AV- 100, España) de uso general para todos los laboratorios de la universidad.

Las esterilizaciones de los diferentes reactivos e insumos fueron realizadas teniendo en cuenta las recomendaciones de los fabricantes. La esterilización por calor húmedo fue realizada en autoclave SMI AVX 90.E (Francia) a 1 atmósfera de presión y 121 °C, mientras que la filtración se realizó con filtros de 0,22 µm microclar (MINI CLAR, Argentina). El agua destilada empleada en la preparación de diversos reactivos fue obtenida con el equipo FIGMAY F.M. 4 (Argentina), mientras que la desionización se realizó con EASYpure RF (Thermo Scientific Barnstead, EE UU).

IV.10.2.I. Técnicas de Biología Molecular

IV.10.2.I.A. Cepas bacterianas

Para el clonado de las construcciones se utilizó la cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) Top10 Genotipo: {F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 galUgalK Δ(ara-leu)7697 rpsL (StrR) endA1 nupG} (Casadaban& Cohen, 1980).

IV.10.2.I.A.1. Cultivos bacterianos

Los medios de cultivo líquidos empleados en todos los procedimientos fueron elaborados de acuerdo a la fórmula Luria-Bertani (LB, composición: 5g Extracto de levadura; 10 g Triptona; 10 g NaCl; H₂O hasta llevar a 1 L). Los medios de cultivo sólidos fueron elaborados adicionando a la mezcla anterior agar microbiológico en una concentración final de 1.5%.

Para la producción de cultivos electrocompetentes para electroporación, los medios empleados fueron idénticos a los primeros sin el agregado de NaCl. Dicha producción se inició inoculando este

medio de cultivo con bacterias crecidas previamente durante la noche en medio LB con NaCl y estreptomicina en concentración final 10 mg/l, a continuación fue incubado a 37°C y en agitación constante a 200 rpm hasta alcanzar un valor de 0,5 unidades de densidad óptica medida a 600 nm de longitud de onda (DO_{600}). A partir de este punto todo el proceso se realizó en forma refrigerada. Las bacterias fueron centrifugadas a máxima velocidad y lavadas tres veces con agua desionizada estéril y una con glicerol 10%. El *pellet* obtenido luego de la última centrifugación se resuspendió en 1 ml de glicerol 10%, dividiéndose en fracciones de 100 μ l en tubos pre-enfriados estériles para finalmente ser almacenados a -80°C.

IV.10.2.I.B. Extracciones plasmídicas

Las extracciones plasmídicas para todos los clonados moleculares y técnicas de biología molecular se realizaron mediante la técnica estándar de lisis alcalina (*Miniprep* o minipreparaciones) descrita en (Sambrook *et al.*, 1989). Aquellos vectores que fueron utilizados para transfección de células de mamíferos, fueron sometidos a una ronda de purificación con polietilenglicol 8000 (PEG₈₀₀₀). La calidad y rendimiento de las mismas fueron verificadas en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio, y el rendimiento fue corroborado mediante el empleo del Nanodrop 1000 (*Thermo*), midiendo absorbancia a 260 nm.

IV.10.2.I.C. Amplificación de ADN por PCR

La técnica fundamental para producir los fragmentos de ADN de interés y generar las construcciones plasmídicas fue la amplificación por PCR (del inglés *polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa), también utilizada como técnica de confirmación e

identificación de fragmentos de ADN en los vectores finales y en los subclonados intermedios.

El volumen final utilizado en todos los casos fue de 10 μ l; las concentraciones optimizadas de los reactivos fueron de 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 1 μ M de cada *primer* y 1 U de ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq ADN polimerasa *Pegassus*, Productos Bio-Lógicos).

En los casos en que fue necesaria la amplificación de fragmentos de tamaño considerable donde la procesividad de la enzima debe ser elevada, se utilizaron diferentes polimerasas de ADN con sus respectivos volúmenes finales optimizados según recomendación de los fabricantes (Taq ADN polimerasa *Platinum*, Productos Bio-Lógicos, Pfu ADN polimerasa, Productos Bio-Lógicos; KAPA2G Robust, KAPA-BioSystems).

Los diferentes ciclados fueron diseñados en relación a la temperatura de hibridación de los *primers* para los distintos fragmentos de ADN, partiendo de un ciclado estándar (**Tabla 10.1**). En muchos casos se utilizó un ciclado doble para incorporar sitios de enzimas de restricción (5 ciclos a una temperatura por debajo de la temperatura óptima de hibridación seguidos de 35 ciclos a temperatura óptima).

Tabla 10.1: Perfil de ciclado estándar diseñado en el laboratorio.

	Desnaturalización inicial	94°C	2'
	Desnaturalización	94°C	15"
5 ciclos	<i>Annealing</i>	60°C	15"
	Extensión	72°C	2'
	Desnaturalización	94°C	15"
35 ciclos	<i>Annealing</i>	68°C	15"
	Extensión	72°C	2'
	Extensión final	72°C	8'

IV.X.2.I.C.I. *Primers*

Estrategia	Nombre	Secuencia 5' a 3'
pZ-H y pH	HBamHIFor	CGCGGATCCATGTCACCACAACGAGACCGG
	HNotITAGRvA	GCGGCCGCCTATCTGCGATTGGTTCCATCTTCCCG
pResAg	pResFwSalI	GTCGACCCATTGGGGCCAATACGCC
	pResRvSalI	GTCGACGGTGGTGCCAGCCCTGGGACCGAAC
pResH(Etd)	ETDHFw	GGATCCAGACTTCATCGGGCAGCCAT
	ETDHRv	CTCGAGTCTGCGATTGGTTCC
pResNS1	NS1BamHIFw	CGCGGATCCGATTCTGGGATGTGC
	NS1XhoIRv	GGCCTCGAGAGCTGTCACCCTTGATTTAC
	CMV prom	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
<i>Primers</i> Universales	SV 40 poly A	GAAATTTGTGATGCTATTGC
	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
	SP6	ATTTAGGTGACACTATAG

IV.10.2.I.D. Digestiones enzimáticas

Las digestiones enzimáticas utilizadas para los clonados moleculares de las distintas construcciones plasmídicas fueron realizadas según el protocolo estándar sugerido por el fabricante y en las condiciones adecuadas para las diferentes enzimas de restricción (New England Biolabs, Fermentas, Promega). En todas las digestiones simples en que se usó una unidad final, las incubaciones se realizaron *over night* (ON, incubación estándar de 16 hs) a 37 °C en estufa. En aquellos casos en que se utilizaron dos enzimas en condiciones de reacción incompatible, las reacciones se realizaron secuencialmente con rondas de inactivación enzimática y precipitación alcohólica del ADN intermedias. Los volúmenes utilizados estuvieron comprendidos entre 10 y 20 µl finales.

IV.10.2.I.E. Ligaciones

Los diferentes fragmentos de ADN que compusieron cada una de las construcciones plasmídicas fueron ligados utilizando 1 U de ADN ligasa del bacteriófago T4 realizando una incubación ON a 4 °C según el protocolo estándar de la **Tabla 10.2**.

Tabla 10.2: Protocolo estándar diseñado para la ligación de fragmentos en vectores de clonado y expresión. Los volúmenes de vector e inserto fueron calculados utilizando la ecuación de la derecha. R: relación relativa entre las cantidades de vector e inserto utilizados. El volumen de H₂O utilizado el necesario para llegar al volumen final de 10 µl.

Reactivo	Concentración final
Buffer	1%
Enzima	1 unidad
Vector	-
Inserto	-
PEG ₄₀₀₀	50%
H ₂ O	-
Volumen final	10 µl

$$\left[\frac{\text{Masa (en ng)}}{\text{Largo en pb}} \right]_{\text{inserto}} = R \cdot \left[\frac{10 \text{ ng}}{\text{Largo en pb}} \right]_{\text{vector}}$$

IV.10.2.I.F. Electroporación y plaqueo

Las electroporaciones se realizaron en cultivos bacterianos de *E. coli* electrocompetentes pertenecientes a la cepa TOP-10 adecuada para clonado molecular. Se utilizó un equipo de BioRad Gene Pulser II, empleando en cada caso la cantidad de moléculas adecuada en 100 µl de cultivo bacteriano almacenado a -80 °C. El protocolo estándar involucra una incubación de una hora en agitación (200 rpm) a 37 °C en medio de cultivo LB puro sin antibiótico. Esto se realiza para minimizar la invasividad de la técnica ya que se somete a las bacterias a un campo eléctrico durante unos microsegundos. Finalmente, una alícuota de cultivo (200-1000 µl) incubado se sembró en placas de Petri con LB sólido preparadas con el antibiótico correspondiente para el plásmido a seleccionar.

En los casos en que se utilizó un subclonado intermedio con plásmidos comerciales que facilitarían la construcción de los vectores finales, se seleccionó un sistema que utiliza el ensayo de α -complementación y permite discriminar entre aquellas colonias o clones que incorporaron plásmidos sin inserto (α -complementación positiva) de aquellos que contienen el inserto de interés clonado en el vector (α -complementación negativa). Para esta técnica, el medio de cultivo LB sólido fue adicionado con 40 μ l del reactivo cromogénico X-gal (5-Br-4-Cl-3-indolil- α -D-galactósido) en dimetilformamida (20 mg/ml).

IV.10.2.I.G. Análisis de recombinantes

A fin de reconocer los clones de interés, las colonias obtenidas en cada siembra fueron analizadas utilizando alguno o una combinación de los métodos descritos a continuación.

IV.10.2.I.G.I. Eckardt

El empleo de esta técnica permite una primera aproximación a la identificación de los clones de interés mediante el análisis del retardo electroforético de las construcciones provenientes de cada colonia, pero necesariamente debe ser combinada con otras técnicas para proporcionar información precisa. Para esta técnica se utilizaron palillos estériles con los que se levantaron porciones de las colonias a analizar; estas fueron colocadas en tubos de 0.5 ml y posteriormente se añadieron por tubo 16 μ l de *Buffer* de lisis 1 (40 volúmenes solución II *Miniprep*, 11 volúmenes de agua, 9 volúmenes de *buffer* de siembra – azul de bromofenol 0.5% y glicerol 50% en TAE 1X, volúmenes calculados según la ecuación de la **Tabla 10.3**), cada muestra fue agitada con vórtex y a continuación se agregaron 3 μ l de solución III

de *Miniprep*, la mezcla resultante se agitó nuevamente con vórtex y luego fueron centrifugadas. El sobrenadante se sembró en un gel de agarosa analítico.

Tabla 10.3: Ecuación utilizada para el cálculo de volúmenes de las soluciones a utilizar en el protocolo Eckardt para el análisis de recombinantes. Los volúmenes se calculan según la cantidad de muestras a analizar en el momento, para evitar variaciones temporales en las soluciones.

$$\frac{N^{\circ} \text{ de tubos} \cdot 16}{60} = 1 \text{ volumen (en } \mu\text{l)}$$

IV.10.2.I.G.II. PCR de colonias

Esta técnica se utilizó para comprobar la identidad de aquellos clones o colonias seleccionados que presentasen el fragmento de interés previamente amplificado por PCR. Las colonias se repicaron utilizando palillos estériles y una pequeña alícuota de la colonia fue resuspendida en 10 μl de agua estéril bidestilada. Con el fin de liberar el ADN contenido en las células de manera rápida y efectiva, las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 15 minutos para luego ser centrifugadas a 13200 rpm. Se tomó 1 μl de cada muestra para ser utilizado como molde las reacciones de PCR, empleando pares de *primers* que permitan identificar el inserto de interés en el vector.

IV.10.2.I.G.III. Digestiones enzimáticas: confirmación de clones

Las digestiones enzimáticas fueron realizadas como se describió previamente. Con el fin de confirmar la identidad de los clones positivos se seleccionaron aquellas enzimas cuya secuencia de reconocimiento y corte estuviesen presentes en los fragmentos de interés. Para cada

plásmido diseñado *in silico* y generado *in vitro* mediante técnicas de ingeniería genética, es posible predecir un patrón de productos de digestión a ser visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa luego de realizar una digestión enzimática. Aquellos clones o colonias que arrojaron resultados positivos en la técnica de PCR de colonias y más tarde presentaron el patrón de bandas adecuado, fueron identificados como positivos y seleccionados para ser confirmados por secuenciación.

IV.10.2.I.G.IV. Secuenciación

Para confirmar la identidad de las diferentes construcciones se utilizó el servicio de secuenciación automatizadas de Macrogen (Corea del Sur) utilizando *primers* universales provistos por el mismo servicio. Se enviaron minipreparaciones plasmídicas a una concentración adecuada (100 ng/ μ l) precipitadas mediante la técnica de PEG₈₀₀₀.

IV.10.2.I.H. Análisis de ácidos nucleicos

IV.10.2.I.H.I. Precipitación de ácidos nucleicos

Para la concentración de ácidos nucleicos se utilizó el protocolo estándar de precipitación con etanol en presencia de sales. En este caso, se utilizó una solución de acetato de sodio 3 M pH 5,3. A partir de un volumen de ácidos nucleicos, se agregaron 2,5 volúmenes de etanol 96° junto con 0,1 volúmenes de la solución de acetato de sodio. Se incubó a -20°C durante 20 min, y se centrifugó a máxima velocidad durante 20 min a 4°C. Luego se realizó un lavado con etanol 70% y se resuspendió el *pellet* en el volumen de agua deseado, que por lo general fue de 10 μ l.

IV.10.2.I.H.II. Electroforesis de ácidos nucleicos

Para la detección de ácidos nucleicos en diferentes experimentos, se realizaron electroforesis en geles de agarosa, con buffer TAE 1X (Tris base 0,04 M; ácido acético glacial 1,14 ml/l solución; EDTA pH 8, 1 Mm). Para diferenciar los diferentes tamaños de los fragmentos, se utilizaron diferentes porcentajes de agarosa p/v teniendo en cuenta los límites de detección de la técnica y patrones de peso molecular (Productos Bio-Lógicos, Argentina) adecuados. El método de tinción de ácidos nucleicos utilizado fue el de bromuro de etidio (Sigma, stock 20000X, 10 mg/ml) para ser revelado en transiluminador UV.

IV.10.2.I.I. Electroforesis de proteínas

Para analizar las diferentes proteínas se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) a diferentes concentraciones utilizando el sistema de *buffer* Tris-glicina en un equipo vertical Miniprotean III de BIO-RAD. Las muestras fueron preparadas utilizando *buffer* de siembra 4X (azul de bromofenol 0,4%, glicerol 40%, SDS 8%, DTT 400 Mm, Tris pH 6,8 200 Mm), incubadas a 100 °C durante 15 minutos, centrifugadas a 13200 rpm durante 15 minutos y sembradas en gel. Las corridas electroforéticas fueron realizadas a 35 mA por gel durante 30-40 minutos. Los protocolos y soluciones respectivas utilizados se prepararon de acuerdo a lo descrito por (Sambrook et al., 1989).

IV.10.2.I.J. Técnicas de inmunodetección de proteínas

IV.10.2.I.J.I. *Western Blotting*

Para la realización del *Western Blotting* (WB) las proteínas a analizar fueron sometidas a una corrida electroforética en SDS-PAGE (10-18% en gel de poliacrilamida) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond P+, Amersham Pharmacia) en *buffer* Tris-glicina conteniendo 20% (v/v) de metanol.

Para evitar la unión no específica de los anticuerpos, las membranas fueron bloqueadas en *buffer* de dilución (BD: Caseína 1%-PBS 1X–Tween 20 0,01%) ON a 4° C.

Para la incubación de los anticuerpos primarios se utilizaron diluciones entre 1/500 y 1/2000 en BD a 37 °C durante 1 h. Para la incubación del anticuerpo secundario se utilizaron anticuerpos comerciales α -conejo o α -ratón conjugados con peroxidasa (Santa Cruz, Biotechnology) en una dilución 1/10000 en BD y fueron incubados a 37 °C durante 1 h.

Entre cada incubación, la membrana fue lavada tres veces con PBS 1X durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación.

IV.10.2.I.J.II. Enzimoinmuno ensayo indirecto (EIA)

Para llevar a cabo el análisis de los sueros extraídos se realizó un ensayo de EIA indirecto. Para ello, se sensibilizó una policubeta (*Greiner Bio-One, Microlon*) de 96 pocillos con una solución de 10 μ g/ml de la proteína NS1 purificada en *buffer* Carbonato-Bicarbonato pH 9,0 (Na₂CO₃ 10 mM, NaHCO₃ 90 mM, NaCl 140 mM), para el análisis del suero α -NS1. Luego de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados con Solución de Lavado (*Buffer* PBS conteniendo 500 mM de NaCl y 0,2 % de Tween

20, pH 7,2) y se agregaron los sueros a evaluar diluidos en Solución de Dilución (Solución de Lavado con 1% de Albúmina de suero bovino -PBS-BSA 1 %-, pH 7,2). Se incubó durante 1 hora a 37°C, realizando tres lavados al finalizar el tiempo. Luego se agregó la dilución correspondiente del conjugado comercial IgG de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con peroxidasa (Santa Cruz *Biotechnologies*) en solución diluyente y se incubó durante 1 hora a 37°C. Tras la etapa de lavado, se agregó a cada pocillo la solución de revelado (1 mg/ml Ofenilendiamina, OPD, en *buffer* citrato pH5, ácido cítrico 100 mM, Na₂HPO₄ 200 mM con el agregado de 1 ul de H₂O₂ 30% por cada mg de reactivo), se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad, se detuvo mediante el agregado de una solución 2N de H₂SO₄ y se procedió a determinar la absorbancia a 490 nm en lector *Dimex Technologies MRXTC*.

IV.10.2.I.K. Técnicas *in vivo* en modelos animales

IV.10.2.I.K.I. Inmunización de ratones y producción de suero policlonal α-NS1

Para la producción de suero policlonal α-NS1 se emplearon cinco ratones Balb/C macho de seis semanas de edad. Antes de la primera inoculación (día 0), se extrajo una muestra de sangre (suero preinmune) para luego realizar la inmunización con 50 µg de proteína NS1 purificada (cedida por el Lic. Matias S. Lorch) en 100 µl de adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich & Co) y el día 14 se realizó un refuerzo de la misma. Las inoculaciones se realizaron por vía subcutánea en la región posterior del lomo del animal. Los días 14, 28 y 60 se tomaron muestras de sangre para realizar el seguimiento de la respuesta humoral. La sangre extraída fue centrifugada a 5000 g para

separar el suero. Estos fueron conservados a -20 °C hasta su posterior análisis mediante la técnica de enzimo-inmuno-ensayo.

IV.10.2.II. Técnicas de Biología Celular

IV.10.2.II.A. Cultivos eucariotas - Mantenimiento de líneas celulares

Las líneas celulares fueron cultivadas y mantenidas en frascos de poliestireno de 25 y 75 cm² y en policubetas de diferentes superficies (Greiner-Bio One, Argentina), con medio DMEM (MP Biomedicals, EE UU), suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (SFB) (Greiner-Bio One, Argentina; Natocor, Argentina; Internegocios, Argentina) y 1X de antibióticos/antimicóticos (Invitrogen), incubando a 37 °C con 5 % de CO₂ (Sanyo MCO-17AIC, Sanyo Electric Co).

Los repiques celulares se efectuaron cuando el cultivo presentaba una cobertura de la superficie superior al 70 % de confluencia con o sin Tripsina 1X (*stock* 10X, PAA Laboratories GmbH, Alemania) durante cinco minutos a 37 °C para desprender las células de la superficie plástica. La inactivación de la Tripsina se realizó mediante el agregado de medio con suero, y siendo luego diluidas en medio de cultivo fresco.

IV.10.2.II.A.I. Células HEK 293-T y HEK-293-T/17

La línea celular 293T fue obtenida a partir de la transformación de células de riñón de embrión humano (*HEK, Human Embryo Kidney*) con ADN de adenovirus tipo 5 (DuBridge et al., 1987). Esta variante contiene el antígeno mayor T de SV40 que permite una replicación episomal de alto número de copias de aquellos vectores que contengan un origen de replicación del virus SV40. Asimismo, se utilizó el clon 17

de esta línea celular siendo su principal característica la de ser más fácilmente transfectable al utilizar los reactivos seleccionados en esta tesis doctoral.

IV.10.2.II.A.II. Células COS-7

Esta línea celular deriva de células de riñón de mono verde africano (CV-1), la cual fue transformada con un origen de replicación mutante de SV40 que codifica para el antígeno T de tipo salvaje (Gluzman 1981).

IV.10.2.II.B. Transfección de líneas celulares

En todos los casos, la transfección fue realizada utilizando el polímero comercial polietilenimina PEI (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Argentina) en monocapas crecidas al 70% de confluencia en medio DMEM-SFB 10%. El ADN plasmídico se purificó por el método PEG8000 y las cantidades fueron optimizadas para cada construcción en particular.

IV.10.2.II.C. Ultracentrifugación en colchón de sacarosa

Los cultivos celulares fueron procesados de manera diferencial. Por un lado, se colectaron las monocapas (M) en volúmenes de lisis celular *ProteoJET* (Fermentas) coherentes a la superficie del plástico utilizado. Por otro lado, los sobrenadantes (Sn) fueron clarificados a baja velocidad (5000 rpm) a temperatura ambiente durante 10 minutos a fin de eliminar restos celulares arrastrados en la recolección.

Finalmente, la purificación de las VLPs contenidas en los sobrenadantes de cultivo clarificados se realizó mediante

ultracentrifugación en colchón de sacarosa al 30% a 96.000 *g* durante dos horas y a 4 °C en rotores basculantes SW-28 y SW-40ti (dependiendo de los volúmenes utilizados) en una ultracentrífuga Beckman XL-70. Los *pellets* obtenidos fueron resuspendidos en PBS 1X estéril.

IV.10.2.III. Técnicas de microscopía

IV.10.2.III.A. Microscopía de fluorescencia

La captura de imágenes se realizó a partir de células adherentes cultivadas. Luego de 48 hs de incubación (en el caso de células transfectadas), las mismas fueron observadas *in vivo*. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio invertido de epifluorescencia y contraste de fase con sistema de captura digital de imágenes y video y con platina termostatzada modelo Eclipse TE2000, marca Nikon, gentileza del Laboratorio de Oncología Molecular de la UNQ.

IV.10.2.III.B. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Una gota de muestra resuspendida luego de la ultracentrifugación del sobrenadante clarificado de la transfección de células 293T fue depositada en una grilla de *formvar-carbón* recubierto de níquel durante 1 min. Se realizó una tinción negativa con 2% ácido fosfotungsténico y examinadas en TEM JEOL JEM-1010 perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

IV.10.2.IV. Técnicas bioinformáticas

IV.10.2.IV.A. Diseño *in silico* de los clonados moleculares

Se utilizó el software *CloneManager* para el diseño y construcción de todos los vectores de clonado y expresión utilizados en este trabajo doctoral

IV.10.2.IV.B. Alineamiento de secuencias nucleotídicas

Para los alineamientos se utilizó la rutina ClustalW (Thompson, Higgins and Gibson, 1994) alojada en el programa bioinformático MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013), empleando los parámetros establecidos por defecto.

IV.10.2.IV.C. Diseño de *primers*

El diseño de *primers* se realizó con el programa *CloneManagaer*. Una vez determinadas y definidas las regiones de interés se diseñaron *primers* teniendo en cuenta parámetros tales como composición de CG (mínimo 50%), temperatura de hibridación, formación de estructuras secundarias internas y la posibilidad de conservar una guanina o citosina en el extremo 3' a fin de optimizar el proceso de hibridación y amplificación. Tanto en la secuencia directa como en la complementaria, y cuando se trata de *primers* que hibridan en la zona de los extremos de las proteínas, se agregaron sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción a fin de facilitar pasos posteriores de clonado direccionado, teniendo en cuenta la adición de las bases extras que optimizan el corte enzimático.

IV.10.2.IV.D. Modelado bioinformático de proteínas

Se utilizó el servidor JPred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>), el cual predice estructuras secundarias utilizando el algoritmo Jnet. Dicho algoritmo realiza la predicción por alineamiento de la secuencia *blanco* con secuencias de estructura conocida, y asume que la estructura de la secuencia blanco se corresponde con la estructura de la secuencia de mayor identidad en el alineamiento.

Otra alternativa utilizada fue el servidor Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>), cuyo algoritmo de predicción se basa en alineamientos múltiples y segmentación de secuencia para su posterior análisis por modelos ocultos de Markov.

La tercera alternativa utilizada fue el servidor I-Tasser (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/phyre2_output/29e99c93e9d00b5f/summary.html), cuyo algoritmo utiliza estructuras de árbol de datos sobre los cuáles se realizan comparaciones dinámicas en forma iterativa.

IV.10.2.IV.D.I. Construcción del sistema

Una vez que se dispuso de la predicción de las estructuras tridimensionales de las proteínas, se dispusieron a una distancia y posición óptimas modificando las coordenadas tridimensionales de sus átomos mediante un programa realizado *de novo* en lenguaje *Fortran* (Ormazabal, comunicación personal).

Para el modelado de la membrana plasmática, se utilizó la subrutina "Membrane Builder" del servidor Charm-Gui (<http://www.charmm-gui.org/?doc=input/membrane>). En este caso se seleccionó una composición de membrana rica en esteroides emulando

la membrana plasmática de una célula de mamífero. La celda periódica utilizada fue hexahédrica.



Bibliografía

Bibliografía

Agnandji, S. T., Lell, B., Solmeheim Soulanoudjingar, S. and Fernandes, J. F. (2011) 'First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children', *The New England Journal of Medicine*, 362(20), pp. 1863–1875. doi: 10.1056/NEJMoa1102287.

Assateerawatt, A., Tanphaichitr, V. S., Suvatte, V. and Yodthong, S. (1993) 'Immunogenicity and efficacy of a recombinant DNA hepatitis B vaccine, GenHevac B Pasteur in high risk neonates, school children and healthy adults.', *Asian Pacific journal of allergy and immunology*. Thailand, 11(1), pp. 85–91.

Bachmann, M. F. and Jennings, G. T. (2010) 'Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns.', *Nature reviews. Immunology*. Nature Publishing Group, 10(11), pp. 787–96. doi: 10.1038/nri2868.

Beignon, A. S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D. G., Larsson, M., Gorelick, R. J., Lifson, J. D. and Bhardwaj, N. (2005) 'Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions', *Journal of Clinical Investigation*, 115(11), pp. 3265–3275. doi: 10.1172/JCI26032.

Bellier, B. and Klatzmann, D. (2013) 'Virus-like particle-based vaccines against hepatitis C virus infection.', *Expert review of vaccines*, 12(2), pp. 143–54. doi: 10.1586/erv.13.10.

Belyaev, A. S. and Roy, P. (1992) 'Presentation of hepatitis B virus preS2 epitope on bluetongue virus core-like particles.', *Virology*. United States, 190(2), pp. 840–844.

Bieniasz, P. D. (2006) 'Late budding domains and host proteins in enveloped virus release.', *Virology*, 344(1), pp. 55–63. doi: 10.1016/j.virol.2005.09.044.

Blanco, E. (2013) *Structure and Physics of Viruses*. Edited by M. G. Mateu. Dordrecht: Springer Netherlands (Subcellular Biochemistry). doi: 10.1007/978-94-007-6552-8.

Borio, C. S., Bilén, M. F., Argüelles, M. H., Goñi, S. E., Iserte, J. a, Glikmann, G. and Lozano, M. E. (2012) 'Antigen vehiculization particles based on the Z protein of Junin virus.', *BMC biotechnology*, 12, p. 80. doi: 10.1186/1472-6750-12-80.

Branco, L. M., Grove, J. N., Geske, F. J., Boisen, M. L., Muncy, I. J., Magliato, S. a, Henderson, L. a, Schoepp, R. J., Cashman, K. a, Hensley, L. E. and Garry, R. F. (2010) 'Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever.', *Virology journal*. BioMed Central Ltd, 7(1), p. 279. doi: 10.1186/1743-422X-7-279.

Braun, M., Jandus, C., Maurer, P., Hammann-Haenni, A., Schwarz, K., Bachmann, M. F., Speiser, D. E. and Romero, P. (2012) 'Virus-like particles induce robust human T-helper cell responses', *European Journal of Immunology*, 42(2), pp. 330–340. doi: 10.1002/eji.201142064.

Briese, T., Paweska, J. T., McMullan, L. K., Hutchison, S. K., Street, C., Palacios, G., Khristova, M. L., Weyer, J., Swanepoel, R., Egholm, M., Nichol, S. T. and Lipkin, W. I. (2009) 'Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa', *PLoS Pathogens*, 5(5), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.ppat.1000455.

Brown, C. S., Welling-Wester, S., Feijlbrief, M., Van Lent, J. W. and Spaan, W. J. (1994) 'Chimeric parvovirus B19 capsids for the

presentation of foreign epitopes.', *Virology*, pp. 477–88. doi: 10.1006/viro.1994.1059.

Burns, N. R., Saibil, H. R., White, N. S., Pardon, J. F., Timmins, P. A., Richardson, S. M., Richards, B. M., Adams, S. E., Kingsman, S. M. and Kingsman, A. J. (1992) 'Symmetry, flexibility and permeability in the structure of yeast retrotransposon virus-like particles.', *The EMBO journal*, 11(3), pp. 1155–64. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=556558&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Capecchi, B., Adu-Bobie, J., Di Marcello, F., Ciucchi, L., Massignani, V., Taddei, A., Rappuoli, R., Pizza, M. and Aric?, B. (2005) 'Neisseria meningitidis NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells', *Molecular Microbiology*, 55(3), pp. 687–698. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04423.x.

Capul, A. a and de la Torre, J. C. (2008) 'A cell-based luciferase assay amenable to high-throughput screening of inhibitors of arenavirus budding.', *Virology*. Elsevier Inc., 382(1), pp. 107–14. doi: 10.1016/j.virol.2008.09.008.

Capul, A. a, de la Torre, J. C. and Buchmeier, M. J. (2011) 'Conserved residues in Lassa fever virus Z protein modulate viral infectivity at the level of the ribonucleoprotein.', *Journal of virology*, 85(7), pp. 3172–8. doi: 10.1128/JVI.02081-10.

Capul, A. a, Perez, M., Burke, E., Kunz, S., Buchmeier, M. J. and de la Torre, J. C. (2007) 'Arenavirus Z-glycoprotein association requires Z myristoylation but not functional RING or late domains.', *Journal of virology*, 81(17), pp. 9451–60. doi: 10.1128/JVI.00499-07.

Charrel, R. N., Feldmann, H., Fulhorst, C. F., Khelifa, R., Chesse, R. de and Lamballerie, X. de (2002) 'Phylogeny of New World arenaviruses based on the complete coding sequences of the small

genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(5), pp. 1118–1124. doi: 10.1016/S0006-291X(02)02053-3.

Chen, Q. and Lai, H. (2013) 'Plant-derived virus-like particles as vaccines.', *Human vaccines & immunotherapeutics*, 9(1), pp. 26–49. doi: 10.4161/hv.22218.

Clegg, J. C. S., Wilson, S. M. and Oram, J. D. (1991) 'Nucleotide sequence of the S RNA of Lassa virus (Nigerian strain) and comparative analysis of arenavirus gene products', *Virus Research*, 18(2–3), pp. 151–164. doi: 10.1016/0168-1702(91)90015-N.

Cornu, T. I. and De la torre, J. C. (2001) 'RING Finger Z Protein of Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) Inhibits Transcription and RNA Replication of an LCMV RING Finger Z Protein of Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) Inhibits Transcription and RNA Replication of an LCMV S-Segment', 75(Lcmv), pp. 9415–9426. doi: 10.1128/JVI.75.19.9415.

Dalba, C., Bellier, B., Kasahara, N. and Klatzmann, D. (2007) 'Replication-competent vectors and empty virus-like particles: new retroviral vector designs for cancer gene therapy or vaccines.', *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. The American Society of Gene Therapy, 15(3), pp. 457–466. doi: 10.1038/sj.mt.6300054.

Delgado, S., Erickson, B. R., Agudo, R., Blair, P. J., Vallejo, E., Albariño, C. G., Vargas, J., Comer, J. A., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., Olson, J. G. and Nichol, S. T. (2008) 'Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia', *PLoS Pathogens*, 4(4), pp. 1–6. doi: 10.1371/journal.ppat.1000047.

Djavani, M., Lukashevich, I. S., Sanchez, A., Nichol, S. T. and

Salvato, M. S. (1997) 'Completion of the Lassa fever virus sequence and identification of a RING finger open reading frame at the L RNA 5' End.', *Virology*, 235(2), pp. 414–418. doi: 10.1006/viro.1997.8722.

Doan, L. X., Li, M., Chen, C. and Yao, Q. (2005) 'Virus-like particles as HIV-1 vaccines.', *Reviews in medical virology*. England, 15(2), pp. 75–88. doi: 10.1002/rmv.449.

Dormitzer, P. R., Grandi, G. and Rappuoli, R. (2012) 'Structural vaccinology starts to deliver.', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 10(12), pp. 807–13. doi: 10.1038/nrmicro2893.

Eichler, R., Lenz, O., Strecker, T., Eickmann, M., Klenk, H.-D. and Garten, W. (2004) 'Lassa virus glycoprotein signal peptide displays a novel topology with an extended endoplasmic reticulum luminal region.', *The Journal of biological chemistry*, 279(13), pp. 12293–9. doi: 10.1074/jbc.M312975200.

Emonet, S., Lemasson, J. J., Gonzalez, J. P., de Lamballerie, X. and Charrel, R. N. (2006) 'Phylogeny and evolution of old world arenaviruses', *Virology*, 350(2), pp. 251–257. doi: 10.1016/j.virol.2006.01.026.

Farazi, T. A., Waksman, G. and Gordon, J. I. (2001) 'The Biology and Enzymology of Protein N-Myristoylation', *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), pp. 39501–39504. doi: 10.1074/jbc.R100042200.

Fehling, S. K., Lennartz, F. and Strecker, T. (2012) 'Multifunctional nature of the arenavirus RING finger protein Z.', *Viruses*, 4(11), pp. 2973–3011. doi: 10.3390/v4112973.

Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G. A., Li, J., Mottram, P. L., McKenzie, I. F. C. and Plebanski, M. (2004) 'Size-Dependent Immunogenicity: Therapeutic and Protective Properties of Nano-Vaccines against Tumors', *The Journal of Immunology*, 173(5),

pp. 3148–3154. doi: 10.4049/jimmunol.173.5.3148.

Frank, I., Piatak, M., Stoessel, H., Romani, N., Bonnyay, D., Lifson, J. D. and Pope, M. (2002) 'Infectious and whole inactivated simian immunodeficiency viruses interact similarly with primate dendritic cells (DCs): differential intracellular fate of virions in mature and immature DCs.', *Journal of virology*, 76(6), pp. 2936–51. doi: 10.1128/JVI.76.6.2936.

Freed, E. O. (2002) 'MINIREVIEW Viral Late Domains', 76(10), pp. 4679–4687. doi: 10.1128/JVI.76.10.4679.

Galarza, J. M., Latham, T. and Cupo, A. (2005) 'Protection against a Lethal Influenza Virus Challenge', 18(1), pp. 244–251.

Gamvrellis, A., Leong, D., Hanley, J. C., Xiang, S. D., Mottram, P. and Plebanski, M. (2004) 'Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells', *Immunology and Cell Biology*, 82(5), pp. 506–516. doi: 10.1111/j.0818-9641.2004.01271.x.

Gao, X., Wang, W. J., Li, Y. F., Zhang, S. G., Duan, Y. Q., Xing, L., Zhao, Z. P., Zhang, P. R., Li, Z. W., Li, R. S., Wang, X. and Yang, P. H. (2013) 'Enhanced Influenza VLP vaccines comprising matrix-2 ectodomain and nucleoprotein epitopes protects mice from lethal challenge', *Antiviral Research*, 98(1), pp. 4–11. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.01.010.

Garrus, J. E., Von Schwedler, U. K., Pornillos, O. W., Morham, S. G., Zavitz, K. H., Wang, H. E., Wettstein, D. A., Stray, K. M., Côté, M., Rich, R. L., Myszka, D. G. and Sundquist, W. I. (2001) 'Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding', *Cell*, 107(1), pp. 55–65. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00506-2.

Grundner, C., Mirzabekov, T., Sodroski, J. and Wyatt, R. (2002) 'Solid-phase proteoliposomes containing human immunodeficiency

virus envelope glycoproteins.', *Journal of virology*, 76(7), pp. 3511–21. doi: 10.1128/JVI.76.7.3511.

Günther, S., Hoofd, G., Charrel, R., Röser, C., Becker-Ziaja, B., Lloyd, G., Sabuni, C., Verhagen, R., Van Der Groen, G., Kennis, J., Katakweba, A., Machang'u, R., Makundi, R. and Leirs, H. (2009) 'Mopeia virus-related arenavirus in natal multimammate mice, Morogoro, Tanzania', *Emerging Infectious Diseases*, 15(12), pp. 2008–2012. doi: 10.3201/eid1512.090864.

Hwang, D. J., Roberts, I. M. and Wilson, T. M. (1994a) 'Assembly of tobacco mosaic virus and TMV-like pseudovirus particles in *Escherichia coli*.', *Archives of virology. Supplementum*. Austria, 9, pp. 543–558.

Hwang, D. J., Roberts, I. M. and Wilson, T. M. (1994b) 'Expression of tobacco mosaic virus coat protein and assembly of pseudovirus particles in *Escherichia coli*.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), pp. 9067–9071.

Jácamo, R., López, N., Wilda, M. and Franze-Fernández, M. T. (2003) 'Tacaribe virus Z protein interacts with the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis.', *Journal of virology*, 77, pp. 10383–10393. doi: 10.1128/JVI.77.19.10383-10393.2003.

Jones, R. M., Chichester, J. A., Mett, V., Jaje, J., Tottey, S., Manceva, S., Casta, L. J., Gibbs, S. K., Musiychuk, K., Shamloul, M., Norikane, J., Mett, V., Streatfield, S. J., Van De Vegte-Bolmer, M., Roeffen, W., Sauerwein, R. W. and Yusibov, V. (2013) 'A plant-produced Pfs25 VLP malaria vaccine candidate induces persistent transmission blocking antibodies against *plasmodium falciparum* in immunized mice', *PLoS ONE*, 8(11). doi: 10.1371/journal.pone.0079538.

Joshi, H., Lewis, K., Singharoy, A. and Ortoleva, P. J. (2013)

'Epitope engineering and molecular metrics of immunogenicity: A computational approach to VLP-based vaccine design', *Vaccine*. Elsevier Ltd, 31(42), pp. 4841–4847. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.07.075.

Kalniciema, I., Skrastina, D., Ose, V., Pumpens, P. and Zeltins, A. (2012) 'Potato virus γ -like particles as a new carrier for the presentation of foreign protein stretches', *Molecular Biotechnology*, 52(2), pp. 129–139. doi: 10.1007/s12033-011-9480-9.

Kentsis, A., Gordon, R. E. and Borden, K. L. B. (2002a) 'Control of biochemical reactions through supramolecular RING domain self-assembly.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), pp. 15404–9. doi: 10.1073/pnas.202608799.

Kentsis, A., Gordon, R. E. and Borden, K. L. B. (2002b) 'Self-assembly properties of a model RING domain.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), pp. 667–72. doi: 10.1073/pnas.012317299.

Kim, D., Martinez-Sobrido, L., Choi, C., Petroff, N., García-Sastre, A., Niewiesk, S. and Carsillo, T. (2011) 'Induction of type I interferon secretion through recombinant Newcastle disease virus expressing measles virus hemagglutinin stimulates antibody secretion in the presence of maternal antibodies.', *Journal of virology*, 85(1), pp. 200–7. doi: 10.1128/JVI.01624-10.

Kündig, T. M., Klimek, L., Schendzielorz, P., Renner, W. A., Senti, G. and Bachmann, M. F. (2015) 'Is The Allergen Really Needed in Allergy Immunotherapy?', *Current Treatment Options in Allergy*, 2(1), pp. 72–82. doi: 10.1007/s40521-014-0038-5.

Kushnir, N., Streatfield, S. J. and Yusibov, V. (2012) 'Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and

production systems and advances in clinical development', *Vaccine*. Elsevier Ltd, 31(1), pp. 58–83. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.083.

De La Cruz, V. F., Lal, A. A. and McCutchan, T. F. (1988) 'Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage', *Journal of Biological Chemistry*, 263(9), pp. 4318–4322.

Lee, K. J. and Pinschewer, D. D. (2002) 'Identification of the Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) Proteins Required To Rescue LCMV RNA Analogs into LCMV-Like Particles†', 76(12), pp. 6393–6397. doi: 10.1128/JVI.76.12.6393.

Lenz, O., ter Meulen, J., Klenk, H. D., Seidah, N. G. and Garten, W. (2001) 'The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), pp. 12701–5. doi: 10.1073/pnas.221447598.

Lenz, P., Day, P. M., Pang, Y. Y., Frye, S. A., Jensen, P. N., Lowy, D. R. and Schiller, J. T. (2001) 'Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells', *J Immunol*, 166(9), pp. 5346–5355. doi: 10.4049/jimmunol.166.9.5346.

Lin, Y.-L., Hu, Y.-C., Liang, C.-C., Lin, S.-Y., Liang, Y.-C., Yuan, H.-P. and Chiang, B.-L. (2014) 'Enterovirus-71 Virus-Like Particles Induce the Activation and Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells through TLR4 Signaling.', *PloS one*, 9(10), p. e111496. doi: 10.1371/journal.pone.0111496.

Liu, F., Ge, S., Li, L., Wu, X., Liu, Z. and Wang, Z. (2012) 'Virus-like particles: Potential veterinary vaccine immunogens', *Research in Veterinary Science*. Elsevier Ltd, 93(2), pp. 553–559. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.10.018.

Liu, W., Jiang, H., Zhou, J., Yang, X., Tang, Y., Fang, D. and Jiang, L. (2010) 'Recombinant dengue virus-like particles from *Pichia pastoris*: Efficient production and immunological properties', *Virus Genes*, 40(1), pp. 53–59. doi: 10.1007/s11262-009-0418-2.

López, N., Jácomo, R. and Franze-Fernández, M. T. (2001) 'Transcription and RNA replication of tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is an inhibitor of these processes.', *Journal of virology*, 75(24), pp. 12241–12251. doi: 10.1128/JVI.75.24.12241-12251.2001.

Lünsdorf, H., Gurramkonda, C., Adnan, A., Khanna, N. and Rinas, U. (2011) 'Virus-like particle production with yeast: ultrastructural and immunocytochemical insights into *Pichia pastoris* producing high levels of the hepatitis B surface antigen.', *Microbial cell factories*. BioMed Central Ltd, 10(1), p. 48. doi: 10.1186/1475-2859-10-48.

Madalinski, K., Sylvan, S. P. E., Hellström, U., Mikolajewicz, J., Zembrzuska-Sadkowska, E. and Piontek, E. (2001) 'Antibody responses to preS components after immunization of children with low doses of BioHepB', *Vaccine*, 20(1–2), pp. 92–97. doi: 10.1016/S0264-410X(01)00312-7.

Maione, D., Margarit, I., Rinaudo, C. D., Massignani, V., Scarselli, M., Tettelin, H., Brettoni, C., Iacobini, E. T., Agostino, N. D., Miorin, L., Buccato, S., Mariani, M., Nogarotto, R., Dei, V. N., Vegni, F., Fraser, C., Teti, G., Madoff, L. C., Paoletti, L. C., Rappuoli, R., Kasper, D. L., Telford, J. L. and Grandi, G. (2006) 'Identification of a Universal Group B Streptococcus Vaccine by Multiple Genome Screen', 309(5731), pp. 148–150.

Mareze, V. A., Borio, C. S., Bilén, M. F., Fleith, R., Mirazo, S., Mansur, D. S., Arbiza, J., Lozano, M. E. and Bruña-Romero, O. (2016) 'Tests in mice of a dengue vaccine candidate made of chimeric Junin

virus-like particles and conserved dengue virus envelope sequences', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(1), pp. 125–133. doi: 10.1007/s00253-015-6973-7.

Matić, S., Rinaldi, R., Masenga, V. and Noris, E. (2011) 'Efficient production of chimeric Human papillomavirus 16 L1 protein bearing the M2e influenza epitope in *Nicotiana benthamiana* plants', *BMC Biotechnology*, 11(1), p. 106. doi: 10.1186/1472-6750-11-106.

Mbow, M. L., De Gregorio, E., Valiante, N. M. and Rappuoli, R. (2010) 'New adjuvants for human vaccines.', *Current opinion in immunology*. England, 22(3), pp. 411–416. doi: 10.1016/j.coi.2010.04.004.

McGaughey, G. B., Barbato, G., Bianchi, E., Freidinger, R. M., Garsky, V. M., Hurni, W. M., Joyce, J. G., Liang, X., Miller, M. D., Pessi, A., Shiver, J. W. and Bogusky, M. J. (2004) 'Progress towards the development of a HIV-1 gp41-directed vaccine.', *Current HIV research*. Netherlands, 2(2), pp. 193–204.

Metz, S. W., Feenstra, F., Villoing, S., van Hulten, M. C., van Lent, J. W., Koumans, J., Vlak, J. M. and Pijlman, G. P. (2011) 'Low temperature-dependent salmonid alphavirus glycoprotein processing and recombinant virus-like particle formation', *PLoS ONE*, 6(10), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0025816.

Middelberg, A. P. J., Rivera-Hernandez, T., Wibowo, N., Lua, L. H. L., Fan, Y., Magor, G., Chang, C., Chuan, Y. P., Good, M. F. and Batzloff, M. R. (2011) 'A microbial platform for rapid and low-cost virus-like particle and capsomere vaccines', *Vaccine*. Elsevier Ltd, 29(41), pp. 7154–7162. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.075.

Moriel, D. G., Bertoldi, I., Spagnuolo, A., Marchi, S., Rosini, R., Nesta, B., Pastorello, I., Corea, V. A. M., Torricelli, G., Cartocci, E., Savino, S., Scarselli, M., Dobrindt, U., Hacker, J., Tettelin, H., Tallon,

L. J., Sullivan, S., Wieler, L. H., Ewers, C., Pickard, D., Dougan, G., Fontana, M. R., Rappuoli, R., Pizza, M. and Serino, L. (2010) 'Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), pp. 9072–7. doi: 10.1073/pnas.0915077107.

Neuman, B. W., Adair, B. D., Burns, J. W., Milligan, R. A., Buchmeier, M. J. and Yeager, M. (2005) 'Complementarity in the Supramolecular Design of Arenaviruses and Retroviruses Revealed by Electron Cryomicroscopy and Image Analysis Complementarity in the Supramolecular Design of Arenaviruses and Retroviruses Revealed by Electron Cryomicroscopy and Imag', *Journal of virology*, 79(6), pp. 3822–3830. doi: 10.1128/JVI.79.6.3822.

Osterhaus, A. D. M. E., Koraka, P. and Martina, B. E. E. (2010) 'Bioinformatics in new generation flavivirus vaccines', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. doi: 10.1155/2010/864029.

Ostrowski, M., Vermeulen, M., Zabal, O., Geffner, J. R., Sadir, a M. and Lopez, O. J. (2005) 'Impairment of thymus-dependent responses by murine dendritic cells infected with foot-and-mouth disease virus', *J Immunol*, 175(6), pp. 3971–3979. doi: 175/6/3971 [pii].

Paavonen, J., Jenkins, D., Bosch, F. X., Naud, P., Salmerón, J., Wheeler, C. M., Chow, S.-N., Apter, D. L., Kitchener, H. C., Castellsague, X., de Carvalho, N. S., Skinner, S. R., Harper, D. M., Hedrick, J. A., Jaisamrarn, U., Limson, G. A. M., Dionne, M., Quint, W., Spiessens, B., Peeters, P., Struyf, F., Wieting, S. L., Lehtinen, M. O. and Dubin, G. (2017) 'Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial', *The Lancet*. Elsevier,

369(9580), pp. 2161–2170. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60946-5.

Parida, S. K. and Kaufmann, S. H. E. (2010) 'Novel tuberculosis vaccines on the horizon', *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Ltd, 22(3), pp. 374–384. doi: 10.1016/j.coi.2010.04.006.

Perez, M., Craven, R. C. and de la Torre, J. C. (2003) 'The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(22), pp. 12978–83. doi: 10.1073/pnas.2133782100.

Perez, M., Greenwald, D. L., Carlos, J. and Torre, D. La (2004) 'Myristoylation of the RING Finger Z Protein Is Essential for Arenavirus Budding Myristoylation of the RING Finger Z Protein Is Essential for Arenavirus Budding', 78(20), pp. 11443–11448. doi: 10.1128/JVI.78.20.11443.

Pizza, M., Scarlato, V., Maignani, V., Giuliani, M. M., Aricò, B., Comanducci, M., Jennings, G. T., Baldi, L., Bartolini, E., Capecchi, B., Galeotti, C. L., Luzzi, E., Manetti, R., Marchetti, E., Mora, M., Nuti, S., Ratti, G., Santini, L., Savino, S., Scarselli, M., Storni, E., Zuo, P., Broecker, M., Hundt, E., Knapp, B., Blair, E., Mason, T., Tettelin, H., Hood, D. W., Jeffries, A. C., Saunders, N. J., Granoff, D. M., Venter, J. C., Moxon, E. R., Grandi, G. and Rappuoli, R. (2000) 'Identification of Vaccine Candidates Against Serogroup B Meningococcus by Whole-Genome Sequencing', *Science*, 287(5459), pp. 1816–1820. doi: 10.1126/science.287.5459.1816.

Plotkin, S. A. (2009) 'Vaccines: The fourth century', *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(12), pp. 1709–1719. doi: 10.1128/CVI.00290-09.

Rappuoli, R. (2007) 'Bridging the knowledge gaps in vaccine design.', *Nature biotechnology*, 25(12), pp. 1361–6. doi:

10.1038/nbt1207-1361.

Rinaudo, C. D., Telford, J. L., Rappuoli, R. and Seib, K. L. (2009) 'Vaccinology in the genome era', *Journal of Clinical Investigation*, 119(9), pp. 2515–2525. doi: 10.1172/JCI38330.

Rodríguez-Limas, W. a, Tyo, K. E. J., Nielsen, J., Ramírez, O. T. and Palomares, L. a (2011) 'Molecular and process design for rotavirus-like particle production in *Saccharomyces cerevisiae*.', *Microbial cell factories*. BioMed Central Ltd, 10(1), p. 33. doi: 10.1186/1475-2859-10-33.

Romanowski, V., Pidre, M. L., Lozano, M. E. and Goñi, S. E. (2017) 'Arenaviruses and Hemorrhagic Fevers: From Virus Discovery to Molecular Biology, Therapeutics, and Prevention in Latin America', in *Human Virology in Latin America From Biology to Control*. Springer Nature.

Rosini, R., Rinaudo, C. D., Soriani, M., Lauer, P., Mora, M., Maione, D., Taddei, A., Santi, I., Ghezzi, C., Brettoni, C., Buccato, S., Margarit, I., Grandi, G. and Telford, J. L. (2006) 'Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*', *Molecular Microbiology*, 61(1), pp. 126–141. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05225.x.

Roy, P. and Noad, R. (2009) 'Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts', *Adv Exp Med Biol*, 655, pp. 145–158. doi: 10.1007/978-1-4419-1132-2_11.

Schlie, K., Maisa, A., Freiberg, F., Groseth, A., Strecker, T. and Garten, W. (2010) 'Viral protein determinants of Lassa virus entry and release from polarized epithelial cells.', *Journal of virology*, 84(7), pp. 3178–88. doi: 10.1128/JVI.02240-09.

Spohn, G., Jennings, G. T., Martina, B. E., Keller, I., Beck, M.,

Pumpens, P., Osterhaus, A. D. and Bachmann, M. F. (2010) 'A VLP-based vaccine targeting domain III of the West Nile virus E protein protects from lethal infection in mice.', *Virology journal*, 7, p. 146. doi: 10.1186/1743-422X-7-146.

Strecker, T., Eichler, R., Meulen, J., Weissenhorn, W., Klenk, H. D., Garten, W. and Lenz, O. (2003) 'Lassa Virus Z Protein Is a Matrix Protein Sufficient for the Release of Virus-Like Particles', 77(19), pp. 10700–10705. doi: 10.1128/JVI.77.19.10700.

Swenson, D. L., Warfield, K. L., Negley, D. L., Schmaljohn, A., Aman, M. J. and Bavari, S. (2005) 'Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections', *Vaccine*, 23(23), pp. 3033–3042. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.11.070.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013) 'MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0', *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), pp. 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and 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 Acids Research*, 22(22), pp. 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.

Ulmer, J. B., Valley, U. and Rappuoli, R. (2006) 'Vaccine manufacturing: challenges and solutions', *Nature Biotechnology*, 24(11), pp. 1377–1383. doi: 10.1038/nbt1261.

Volpon, L., Osborne, M. J., Capul, A. a, de la Torre, J. C. and Borden, K. L. B. (2010) 'Structural characterization of the Z RING-eIF4E complex reveals a distinct mode of control for eIF4E.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(12), pp. 5441–6. doi: 10.1073/pnas.0909877107.

World Health Organisation (2011) 'Global Vaccine Action Plan', *Vaccine*, pp. 1–147. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.02.015.

Wu, C. Y., Yeh, Y. C., Yang, Y. C., Chou, C., Liu, M. T., Wu, H. S., Chan, J. T. and Hsiao, P. W. (2010) 'Mammalian expression of virus-like particles for advanced mimicry of authentic influenza virus', *PLoS ONE*, 5(3). doi: 10.1371/journal.pone.0009784.

Wurm, F. M. (2004) 'Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells.', *Nat Biotechnol*, 22(11), pp. 1393–1398. doi: 10.1038/nbt1026.

Zeltins, A. (2013) 'Construction and characterization of virus-like particles: A review', *Molecular Biotechnology*, 53(1), pp. 92–107. doi: 10.1007/s12033-012-9598-4.

Zeng, J., Fournier, P. and Schirrmacher, V. (2002) 'Stimulation of human natural interferon- α response via paramyxovirus hemagglutinin lectin-cell interaction', *Journal of Molecular Medicine*, 80(7), pp. 443–451. doi: 10.1007/s00109-002-0339-1.

