

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**Desarrollo de partículas semejantes a virus (VLPs)
basadas en la proteína VP6 de rotavirus como sistema de
presentación de antígenos heterólogos**

**Trabajo de Tesis presentado para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas**

Autor: Lic. Andrea Peralta

Director: Dr. Oscar Taboga

Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar

2006

INDICE	i
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUCCION	
1.Desarrollo de nuevos inmunógenos	1
1.1Ventajas del sistema baculovirus-células de insecto	5
2. Las partículas semejantes a virus (VLPs)	6
2.1 Las VLPs en el diagnóstico serológico	9
2.2 Las VLPs como vacunas	10
2.3 VLPs quiméricas	12
3. La proteína VP6 de rotavirus	15
3.1 La proteína VP6 como carrier de epitopes foráneos	19
4. El epitope V5	22
MATERIALES Y METODOS	
1. Virus	25
2. Células	25
3. Animales de laboratorio	25
4. Cepas bacterianas	25
5. Metodología del ADN recombinante	26
5.1 Preparación del ADN plasmídico de alta calidad	26
5.2 Digestión con enzimas de restricción	26
5.3 Defosforilación de los extremos 5'fosfato	26
5.4 Electroforesis en geles de agarosa	26
5.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida	27
5.6 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa o poliacrilamida	27
5.7 Reacciones de ligado molecular	27
5.8 Transformación de bacterias	28
5.9 Minipreparaciones de ADN	28

6. Secuenciación de ADN	29
7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	29
8. Tinción con el colorante azul de Coomasie	29
9. Identificación de proteínas mediante Western blot	30
9.1 Electrotransferencia	30
9.2 Detección inmunológica de las proteínas	30
10. Análisis y elección de posibles sitios de inserción en VP6	31
11. Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis de VP6	31
12. Mutagénesis dirigida por PCR de VP6	33
13. Construcción de las fusiones VP6/V5	34
13.1. Diseño de oligonucleótidos para la secuencia codificante del epítipo V5	34
13.2. Formación del dúplex codificante para el epítipo V5	35
13.3. Clonado de la secuencia sintética V5 en los vectores pBS-VP6 _{XbaI}	35
13.4. Construcción de la versión N-term	36
14. Construcción del vector de transferencia	36
15. Producción de baculovirus recombinantes	37
16. Clonado viral	38
17. <i>Dot-blot</i> de ADN	38
17.1 Prehibridación	38
17.2 Marcación de la sonda radioactiva	38
17.3 Hibridación	39
17.4 Revelado	39
18. Amplificación de <i>stocks</i> virales	39
19. Titulación de <i>stocks</i> virales	40
20. Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes	40
21. Caracterización de la quimera VP6/V5 ₁₄	41
22. Evaluación de la capacidad de las proteínas quiméricas VP6/V5 de formar trímeros	41
23. Evaluación de la capacidad de las proteínas recombinantes de formar VLPs	41

24. Microscopía electrónica	42
25. Ensayo de inmunización con las quimeras VP6/V5 en su forma monomérica	43
25.1 Obtención del antígeno	43
25.2 Inmunización de ratones	43
25.3 Efecto de anticuerpos preexistentes contra la proteína carrier	43
26. Ensayo de Inmunización con VLPs	44
27. Evaluación de la respuesta inmune inducida	44
28. Ensayo de ELISA para detectar anticuerpos anti-epitope V5	44
28.1 Expresión y producción de la proteína CAT-V5	44
28.2 Expresión de los clones pRSET/CAT-V5	45
28.3 Producción y purificación del antígeno CAT-V5	46
28.4 Puesta a punto del ensayo de ELISA	47
29. ELISA para detectar anticuerpos anti-VP6	48
30. Caracterización de la accesibilidad del epitope V5 en los diferentes multímeros mediante ensayos de ELISA	49
31. Análisis estadísticos	50
32. Análisis in silico de estructura de proteínas	50

RESULTADOS

Capítulo I

1. Análisis y elección de sitios de inserción de secuencias heterólogas en la proteína VP6 de rotavirus	51
2. Construcción de baculovirus recombinantes para distintas versiones de VP6/V5	54
2.a Mutagénesis dirigida por PCR y clonado en el vector intermediario pBS	54
2.b Síntesis e inserción del epitope V5	57
2.c Construcción de los vectores de transferencia	58
2.d Construcción de la versión mutada en la posición Nterm	60

3. Obtención de los baculovirus recombinantes	63
-----------------------------------------------	----

Capítulo II

1. Expresión de las quimeras VP6/V5 a partir de los baculovirus recombinantes	65
2. Identidad de las quimeras VP6/V5	66
3. Caracterización antigénica de la quimera VP6/V5 ₁₄	68
4. Análisis de la capacidad de formar trímeros	69
5. Análisis de la capacidad de formar multímeros	71
6. Análisis de la interacción de las quimeras VP6/V5 con la proteína VP2	74

Capítulo III

1. Producción de las quimeras VP6/V5 en su forma monomérica	77
2. Inmunización de ratones con la forma monomérica de las quimeras VP6/V5	79
3. Evaluación de la respuesta humoral inducida	80
3.1 Desarrollo de un ELISA para detectar anticuerpos anti-V5	80
3.2 Análisis de los sueros: 1° sangría	82
3.3 Análisis de los sueros 2° sangría: efecto del booster	83
3.4 Respuesta a la proteína carrier	84
3.5 Cinética de anticuerpos en los animales inmunizados con las quimeras VP6/V5 en su forma monomérica	86
4. Efecto de la presencia de respuesta inmune contra el carrier previa a la inmunización con las quimeras VP6/V5	87

Capítulo IV

1. Características antigénicas de los multímeros VP6/V5+VP2	90
1.1 Obtención de los multímeros mixtos	90
1.2 Accesibilidad del epítopo V5 e influencia de su inserción en la antigenicidad de los multímeros VP6/V5+VP2	90
2. Inmunogenicidad de los multímeros VP6/V5+VP2	92

	Indice
2.1 Respuesta inmune humoral contra el epítopo V5	93
2.2 Respuesta inmune humoral contra la proteína carrier	95
3. Análisis estructural de las VLPs	98
3.1 Efecto de la inserción del epítopo V5 en el ensamblaje de las VLPs	98
3.2 características morfológicas de las VLPs	101
DISCUSION	105
1. Elección del sistema de expresión	108
2. Elección de los sitios de inserción	109
3. Caracterización de las quimeras VP6/V5	109
3.a Expresión e identidad de las quimeras VP6/V5	109
3.b Formación de trímeros y multímeros	111
3.c caracterización estructural de las quimeras VP6/V5	114
4. Las quimeras VP6/V5 como inmunógenos	116
4.a Las quimeras en estado monomérico	116
4.b Las quimeras multiméricas como inmunógenos	118
4.c Efecto de una respuesta inmune preexistente contra el carrier	119
5. Implicancias y Perspectivas	121
CONCLUSIONES	123
BIBLIOGRAFIA	125

RESUMEN

En este trabajo de tesis se ha ensayado la presentación de secuencias aminoacídicas heterólogas en la superficie de partículas semejantes a virus derivadas de la proteína VP6 de rotavirus para usos biotecnológicos. Para esto, se seleccionaron nueve sitios de inserción en la proteína VP6, que corresponden a las posiciones aminoacídicas 1,14, 101, 146, 171, 235, 301/308, 358, y 382 mediante algoritmos que predicen hidrofiliidad y antigenicidad, así como a partir de datos cristalográficos. A través de mutagénesis dirigida por PCR se insertó un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción XbaI en la secuencia de VP6 que permitió el clonado posterior de un epítopo de 14 aminoácidos derivado del paramixovirus SV5, originando así las distintas versiones VP6-V5. De las distintas quimeras expresadas en células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes se determinaron los niveles de expresión alcanzados, su capacidad de trimerización, su capacidad de multimerización, sus propiedades antigénicas, su interacción con la proteína VP2 y su inmunogenicidad en animales de laboratorio. La inserción del epítopo V5 en las posiciones 171, 235 y 301/8 impidió la formación de trímeros, mientras que la inserción de la secuencia heteróloga en las posiciones 358 y 382 afectó seriamente la capacidad de multimerizar, lo que no pudo ser revertido por la coexpresión de la proteína VP2, que estabiliza las estructuras multiméricas. Los resultados obtenidos aportan datos que ayudan a caracterizar con mayor precisión los dominios de trimerización y de multimerización de la proteína VP6, acotando el dominio de trimerización a los aminoácidos 171 y 328 y el de multimerización, a los aminoácidos 315 a 397. Por otro lado, la versión VP6/V514 no fue reconocida por distintos sueros policlonales anti-VP6, mientras que sí lo fue por un anticuerpo monoclonal anti-V5, indicando que mediante la inserción de una secuencia en esta posición se interrumpe el sitio antigénico lineal inmunodominante de la proteína VP6. La caracterización estructural de los multímeros VP6/V5 mediante gradientes de CsCl, microscopía electrónica y ensayos de ELISA *sandwich* reveló que la inserción del epítopo V5 en la posición 171 de VP6 produce las VLPs quiméricas más estables y que exponen el epítopo heterólogo en su superficie. La inmunización de ratones con la mayoría de las quimeras VP6/V5 en su estado monomérico resultó en la inducción de una sólida respuesta humoral contra el epítopo V5, que dependió de la posición de éste en la proteína *carrier* y que se mantuvo constante hasta los 150 días de iniciado el experimento. Un resultado similar se obtuvo cuando se inmunizaron ratones con las quimeras VP6/V5 en estado multimérico, en particular, con la versión VP6/V5₁₄. En este caso, es notable remarcar que se obtuvo una sólida respuesta humoral contra el epítopo V5 aún utilizando sólo 30 ng de proteína quimérica como inmunógeno, lo que equivale a utilizar 0,9 ng de péptido V5. Se puede concluir que los resultados obtenidos en este trabajo de tesis aportan valiosos datos a la caracterización antigénica y estructural de la proteína VP6 de rotavirus, los que permitieron identificar sitios de inserción de secuencias heterólogas que pueden utilizarse en la producción de VLPs quiméricas capaces de inducir sólidas respuestas inmunes humorales contra el epítopo transportado, a dosis muy bajas.

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**Development of virus like particles (VLPs) based on VP6
protein of rotavirus as presentation system for
heterologous epitopes**

Thesis presented to obtain the PhD degree

Author: Lic. Andrea Peralta

Advisor: Dr. Oscar Taboga

Institute of Biotechnology, CICVyA, INTA Castelar

2004

ABSTRACT

The presentation of heterologous amino acid sequences on the surfaces of virus-like particles derived from rotavirus VP6 protein as a technological tool has been studied in this work. Nine insertion sites in the VP6 sequence have been selected corresponding to amino acids 1,14, 101, 146, 171, 235, 301/308, 358, and 382 on the basis of their profiles of antigenicity, hydrophilicity and crystallographic data. By using site-directed PCR mutagenesis, single XbaI sites were incorporated in the VP6 sequence followed by cloning of a synthetic duplex coding for a 14 amino acid epitope derived from paramyxovirus SV5, giving rise to the different mutants VP6-V5. After expression of the VP6-V5 chimeras in insect cells infected with recombinant baculoviruses, the expression levels as well as their ability to trimerize, multimerize, interact with VP2, their antigenic properties and immunogenicity in laboratory animals were evaluated. Insertion of V5 epitope at positions 171, 235 and 301/8 abolished the ability to form trimers, while insertion at positions 358 and 382 drastically affected the ability to form multimers. This fact could not be reverted by coexpression of VP2, a protein of the rotavirus core that stabilizes multimeric structures. The results obtained in this work are useful to more precisely characterize the domains involved in trimer and multimer formation, restricting the trimerization domain to amino acids 171 to 328 and the multimerization domain to amino acids 315 to 397. On the other hand, the monomeric form of VP6/V514 could not be recognized by sera from different species, whereas a monoclonal anti-V5 antibody did recognize it, indicating that the insertion interrupted the major linear antigenic site in VP6.

A structural characterization of the different chimeras employing ultracentrifugation in CsCl gradients, electron microscopy and sandwich ELISA revealed that insertion of V5 at 171 produced the more stable chimeras, displaying the foreign epitope on their surface. Immunization of mice with most of the monomeric chimeras elicited a solid humoral immune response, exhibiting dependence on the insertion site in the carrier protein. Antibody titers after two doses persisted until 150 days after the first inoculation. Similar results were obtained when mice were immunized with multimeric chimeras, using as little as 30 ng of VLPs, comprising 0.9 ng of V5 peptide.

In conclusion, the results obtained in this work yielded valuable data on the structural and antigenic issues of rotavirus VP6 protein, and allowed the identification of precise sites for the insertion of foreign sequences that can be used in the production of chimeric VLPs able to induce solid humoral responses against the transported epitope at very low doses.

Por fin llegó el tan ansiado momento!!!! Después de tanto esfuerzo, sacrificios y nervios. Pero por suerte tuve a mi lado un montón de gente que hizo que toda esta experiencia resultara grandiosa. A todos ustedes, mi agradecimiento.

Reconocimientos

A la Educación Pública y Gratuita, que posibilitó que estudiara lo que me gustaba, con excelentes profesores y que adquiriera una sólida formación. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires: Muchas Gracias.

Al Conicet, por otorgarme una beca de postgrado que posibilitó mi supervivencia en estos años de tesis.

Al Dr. Palma, por abrirme las puertas del Instituto de Biotecnología, a pesar de la difícil situación en ese momento.

Agradecimientos

A Oscar, quién más podría estar en primer lugar? Mi director, mi maestro, mi guía. Es tanto lo que tengo que agradecerte!!!!

Por lo mucho que me enseñaste a nivel profesional y personal, por toda tu paciencia que más de una vez puse a prueba, por todas las oportunidades que me diste, por las largas discusiones científicas (y de las otras), por tus consejos, por motivarme a aprender cada día más, por soportar estoicamente el elevado nivel de estrógenos del laboratorio y porque “*vos siempre tenés la razón*”. Infinitas gracias por todo!!!!.

A las *seniors* del laboratorio. A Lela, por tus consejos acertados, por interesarte cómo van mis experimentos y por pincharme para que escriba!! A Analía, porque siempre estas dispuesta a ayudarme, por estar atenta a los detalles y por darme prioridad en el pedido de ratones!!! A Gaby C., por darme tantos ánimos en el tramo final (y sí, no me voy a olvidar de llaver una torta para festejar la tesis).

A mis amigas Silvina y Vicky

A Sil porque me ayudaste desde el primer momento, por preocuparte siempre por mí, por hacerme sentir parte de tu familia, por toda tu bondad y cariño. Un millón de gracias!!!.

A Vicky, por todos tus consejos, por la cantidad de veces que me dijiste “*largá con la pipeta y ponete a escribir*”, por nuestras largas charlas. Gracias!!!.

A Pauli, por supuesto!!!! Por ser tan buena conmigo, por ayudarme cuando más lo necesito, por tu paciencia infinita, por las largas horas que pasamos junto al microscopio electrónico, porque sin tu ayuda la última parte de la tesis no hubiera sido posible, porque me enseñaste a trabajar en equipo y fue genial. Muchísimas gracias!!!!!!!

A mis compañeros de laboratorio: Pauli, Sil, Eva, Gaby L., Tati, Flor, Guido, Dani, Flavia, Ruben, Ari y Sole. Gracias a todos por acompañarme y soportarme.

A Eva y Guido, por su ayuda con la estadística. A Gaby L., por ser la discjockey. A Ari, por apoyarnos mutuamente en los momentos críticos de la beca. A Flor por sus viajes al fotógrafo. A las "chicas" por las charlas alrededor del mate.

A Fabiana, por tomarse el tiempo suficiente y corregir la tesis. Gracias por tus valiosos aportes!!!.

A Sebastián, por su invaluable aporte con el manejo de programas de estructura de proteínas. Muchísimas gracias.

A Angel, por considerarme y confiarme el trabajo en R.P., que me permitió crecer profesional y personalmente.

A Silvio, por tus conocimientos y consejos y por alivianar los viajes con tus chistes!!!!

Al grupo TBC, Paz, Kari, Vero, Andre, Martín, Nacho, Laura, Fabi, Alito, Gaby, Marisa R. Por ser tan buena onda y por compartir todo como si fuésemos un solo grupo.

A las chicas que en el último año tomaron la posta en la lucha por los derechos de los becarios, Paula R. y Kari, gracias!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

A las organizadoras de salidas, Julia, Mariela, Vero y Romi, porque viene muy bien desenchufarse del laburo y salir a tomar algo.

Al grupo plantas, Norma, Ruth, Ceci V., Mariana, Esteban, Sebas, Vero N., Ana, Naty, Arielito (gracias por los viajes INTA-Flores!!!), Florencia, Dani T., Paola, Paula F., Caro (la organizadora de eventos), Luis (gracias por todos los papers que me conseguiste!!!!!!!!!!!!). Gracias a todos.

A Majo y Vilma, por supuesto!!!. Por prepararme litros y litros de *buffers*, por mantener limpia la zona de flujos, por asegurarse que nada falte. Gracias!!!!

A Isa y Fabián, por preocuparse que tuviera el material que necesitaba. A Haydeé y Tere, por ser tan afectuosas conmigo.

A Jorge y Silvio D., por cuidar los ratones y asegurarse que todo estuviera en orden. A Antonio, por enseñarme a sangrar los pobres ratoncitos, por sus charlas históricas, porque siempre se acuerda de mi cumpleaños, gracias!!!!!!

A mi Familia, por apoyarme en todo, por preocuparse ante cada instancia, por desearme siempre lo mejor, porque juntos somos fuertes. A todos, Gracias.

1. Desarrollo de nuevos inmunógenos

La prevención de enfermedades infecciosas implica la activación y el establecimiento de los mecanismos de defensa del organismo antes de la interacción con el patógeno específico, de manera de que el hospedador inicie una rápida respuesta al momento de la infección. La vacunación es, en nuestros días, el método más económico y eficaz para el control y erradicación de distintas enfermedades infecciosas.

El concepto básico para el diseño de una vacuna es simular en el hospedador la infección con el patógeno o, al menos, aquellos aspectos de la infección natural importantes para montar los mecanismos destinados a su eliminación. Por lo tanto, no existe una única clase de vacuna aplicable a los diferentes tipos de patógenos.

Tradicionalmente, el control de las enfermedades infecciosas se llevó a cabo mediante la utilización de vacunas basadas en la inactivación química o térmica del patógeno (vacunas inactivadas) o en la atenuación del mismo mediante pasajes seriados en animales o cultivos celulares (vacunas atenuadas). Estas vacunas “clásicas” presentan ventajas y desventajas particulares.

Por un lado, las **vacunas inactivadas** son inocuas, confieren adecuados niveles de protección (aunque es necesario suministrar varias dosis) y existe una vasta experiencia en su producción y en sus efectos. Sin embargo, estas vacunas tienen altos costos de producción, son inestables, despiertan una respuesta inmune principalmente humoral, requieren el uso de adyuvantes y se asocian a riesgos de bioseguridad por manipulación del patógeno en las plantas de producción o de inadecuada inactivación (König *et al.*, 2001).

Por otro lado, las **vacunas atenuadas** son de bajo costo y de formulación sencilla (no requieren de adyuvantes), confieren inmunidad de larga duración y pueden despertar tanto una respuesta inmune celular como humoral. Sin embargo, existe la posibilidad de reversión de cepas atenuadas a virulentas. Además, esta clase de vacunas puede ser patógena para animales inmunocomprometidos, son

inestables a la temperatura, presentan riesgos de bioseguridad en las plantas productoras y dificultan la diferenciación entre animales vacunados e infectados.

Por lo expuesto anteriormente, la búsqueda de vacunas alternativas que aseguren una adecuada protección de la población susceptible y reduzcan los riesgos y costos que implican la producción y utilización de vacunas convencionales, sigue siendo una prioridad para las campañas de prevención y erradicación de enfermedades de interés pecuario.

Con el desarrollo de la biología molecular, la ingeniería genética y la inmunología ha sido posible caracterizar genética y estructuralmente diferentes patógenos, identificar epitopes y regiones proteicas que estimulan respuestas humorales y celulares y transferir información genética de un organismo a otro. Esto permitió el diseño racional y el desarrollo de vacunas de nueva generación tales como las vacunas a subunidades, a péptidos sintéticos, a vectores vivos bacterianos y virales y a ácidos nucleicos (ADN).

Todas ellas poseen una composición definida, escaso riesgo de escape por manipulación de patógenos y permiten la diferenciación de animales vacunados de infectados. Sin embargo, cada una de estas estrategias presenta desventajas particulares tales como la falta de conformación nativa de los antígenos expresados en sistemas procariontes, la baja inmunogenicidad de epitopes libres, la necesidad de desarrollo de métodos de purificación, la patogenicidad potencial de los vectores vivos y la selección de variantes virales observada debido a la baja antigenicidad de las vacunas peptídicas (Weidt *et al.*, 1995; Taboga *et al.*, 1997).

El mayor beneficio de la inmunización con una vacuna peptídica es la capacidad de inmunizar con una estructura mínima, consistente en un antígeno bien definido y caracterizado. Sin embargo, en la práctica, esta estrategia reduccionista no ha dado buenos resultados debido a la pobre inmunogenicidad de los péptidos libres. Esta diferencia entre el diseño teórico de un inmunógeno y los resultados empíricos se podría explicar de la siguiente manera: el sistema inmune evolucionó a través del tiempo para luchar contra agentes infecciosos (virus, bacterias, parásitos). Por lo tanto, no debería sorprender que un inmunógeno consistente en

un péptido aséptico y libre de toxinas, sea ignorado y termine siendo poco eficiente para inducir inmunidad (Celis, 2002).

Así, con el objeto de aumentar la inmunogenicidad de epitopes o de sitios antigénicos simples, diferentes investigadores han usado muy diversas estrategias, entre las que podemos mencionar:

a) acoplamiento a moléculas *carrier* tales como Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) o seroalbúmina bovina (BSA) (DiMarchi *et al.*, 1986; Broekhuijsen *et al.*, 1987), utilización de adyuvantes e inmunomoduladores (Berinstein *et al.*, 1993) o conjugación a liposomas o fosfolípidos (Allison *et al.*, 1974; Lifshitz *et al.*, 1981; El Guink *et al.*, 1989).

Para acoplar un péptido a una molécula *carrier* se debe seleccionar el agente químico que llevará a cabo la reacción, dependiendo de los grupos reactivos que presentan tanto el péptido como el *carrier* (Harlow y Lane, 1988). Por ejemplo, al seleccionar glutaraldehído como agente acoplante, el acoplamiento se produce entre los grupos NH₂ libres (el extremo N-terminal o los residuos ε-NH₂ de las lisinas). Si se utiliza MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) o sus derivados (sulfo-MBS), la unión entre el péptido y el *carrier* ocurre a través de cisteínas y grupos NH₂ libres. Si se utilizan carbodiimidas [EDAC o 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimida], el acoplamiento se realiza a través de los grupos carboxilos de los aminoácidos aspártico y glutámico.

Sin embargo, la estrategia del acoplamiento químico presenta muchas desventajas: i) es un proceso muy costoso; ii) los químicos utilizados son tóxicos (glutaraldehído), carcinogénicos (BDB) o insolubles en agua (MBS), siendo necesario trabajar con dimetilformamida; iii) se requieren varios pasos de purificación para eliminar los químicos que llevan a cabo la reacción y iv) la composición de la preparación es indefinida.

Por otro lado, los adyuvantes e inmunomoduladores pueden presentar efectos adversos, por lo que su utilización trata de reducirse al máximo.

b) expresión de epitopes peptídicos en la superficie de virus que no son patógenos para mamíferos: existen numerosos ejemplos utilizando baculovirus o virus de plantas como sistemas de presentación de antígenos heterólogos.

b.1) expresión de epitopes heterólogos en la superficie de virus patógenos de vegetales. Para ello se han utilizado diferentes virus, entre otros, el virus del mosaico del coliflor (Porta *et al.*, 1996; McLain *et al.*, 1996), el virus del mosaico del tabaco (Turpen *et al.*, 1995; Sugiyama *et al.*; 1995), el virus de la atrofia del tomate (Joelson *et al.*, 1997) o el Potyvirus del ciruelo (Fernandez-Fernandez *et al.*, 1998) para presentar epitopes derivados de diversos patógenos, tales como HIV de tipo 1, parvovirus canino, virus de la inmunodeficiencia felina, rinovirus humano y malaria.

b.2) expresión de epitopes en la superficie de baculovirus y células de insecto infectadas. En este sistema se han expresado pequeños epitopes como así también proteínas derivadas del HIV (Ernst *et al.*, 1998), del virus de la fiebre aftosa (Tami *et al.*, 2000; Tami *et al.*, 2004), del circunsporozoito de *Plasmodium berghei* (Yoshida *et al.*, 2003), la proteína F de PPRV (Peste des petits ruminants) y la proteína H de RPV (Rinderpest virus) (Rahman *et al.*, 2003).

Debido a la estructura espacial de las cápsides virales los antígenos de interés son presentados al sistema inmune de manera multimérica, en presencia de epitopes para células T de la partícula viral, capaces de inducir respuestas humorales y celulares. Además, estas macromoléculas pueden ser fácilmente purificadas mediante centrifugación.

Sin embargo, a pesar de ser 100% seguros ya que no pueden replicar en células de mamífero, el hecho de poseer material genético podría ofrecer alguna resistencia en cuanto a su utilización.

c) exposición de epitopes en la superficie de partículas semejantes a virus (VLPs). Las VLPs (del inglés *virus-like particles*) están formadas por proteínas de origen viral capaces de autoensamblarse en partículas semejantes a virus al ser expresadas en sistemas heterólogos, aún en ausencia de otros componentes

virales. Son consideradas un sistema seguro de presentación de antígenos foráneos, ya que carecen de genoma viral.

Las primeras VLPs obtenidas, basadas en el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B fueron producidas en sistemas bacterianos y en levaduras. Sin embargo, fue el desarrollo de sistemas de expresión eucariotas y en particular el sistema baculovirus-células de insecto, lo que permitió el desarrollo y producción de VLPs complejas, basadas en proteínas derivadas de rotavirus (Redmond *et al.*, 1991; Crawford *et al.*, 1994), virus *bluetongue* (French *et al.*, 1990), virus de la hepatitis B (Pumpens *et al.*, 1995) y parvovirus (Kajigaya *et al.*, 1991), entre otros.

1.1 Ventajas del sistema baculovirus-células de insecto

Los baculovirus son un grupo diverso de virus perteneciente a la familia *Baculoviridae* que infectan muchas especies de insectos como sus hospedadores naturales. Sus cepas son altamente específicas y no se propagan en ningún hospedador no invertebrado, por lo que se los considera seguros para su empleo en la producción de inmunógenos que serán utilizados en mamíferos.

Varias características particulares del sistema de expresión “baculovirus-células de insecto” lo distinguen de los sistemas de expresión bacterianos. A menudo, las proteínas expresadas en sistemas bacterianos son insolubles, se agregan o se pliegan espacialmente de manera incorrecta. En cambio, las proteínas expresadas en este sistema son solubles y funcionalmente activas en la mayoría de los casos. Este sistema de expresión es capaz de sintetizar proteínas recombinantes de tamaño casi ilimitado a muy altos niveles de expresión, con adecuadas modificaciones post traduccionales y correcta localización celular.

A diferencia de otros sistemas de expresión eucariotas, las células de insecto pueden ser cultivadas sin suplementos derivados de células de mamífero, por lo que el riesgo de contaminación con patógenos oportunistas está minimizado.

En la tabla siguiente se resumen algunas de estas características:

Característica	Baculovirus	Bacterias
Simpleza	✓	✓
Tamaño de la proteína	ilimitado	< 100 kDa
Expresión múltiple	✓	
Clivaje de péptido señal	✓	
Splicing de intrones	✓	
Transporte nuclear	✓	
Proteína funcional	✓	a veces
Fosforilación	✓	a veces
Glicosilación	✓	Sólo micobacterias
Acilación	✓	
Miristilación	✓	

2. Las partículas semejantes a virus (VLPs)

Su historia comenzó alrededor del año 1980 y tuvo como requisito previo el desarrollo de sistemas de expresión de *E. coli* y levaduras y el uso de estos sistemas para la expresión de proteínas de cápsides virales y proteínas de envoltura, en particular las derivadas del virus de la hepatitis B (HBV).

La expresión del antígeno core del HBV en *E. coli* (Burrell *et al.*, 1979; Pasek *et al.*, 1979; Edman *et al.*, 1981; Stahl *et al.*, 1982) y de la proteína pequeña (S) del antígeno de superficie en levaduras (Valenzuela *et al.*, 1982; Harford *et al.*, 1982) resultó en el autoensamble de estas proteínas en partículas semejantes a virus, aún en ausencia de cualquier otro componente viral. Estas partículas fueron morfológica e inmunológicamente indistinguibles de los verdaderos productos de ensamble del HBV (Valenzuela *et al.*, 1982; Cohen y Richmond, 1982; Milich *et al.*, 1988).

El desarrollo y uso de una vacuna recombinante contra la hepatitis B basada en partículas del antígeno S expresadas en levaduras sirvió como un fuerte estímulo para futuros intentos en desarrollos de este tipo. En las VLPs basadas en el antígeno core de HBV y expresadas en levaduras, los epitopes son presentados en el contexto de antígenos de histocompatibilidad de clase I y II, y pueden inducir la producción tanto de anticuerpos como de células T citotóxicas, confiriendo así protección contra la infección viral. De esta manera pudo demostrarse protección al menos parcial usando las proteínas del core del virus de la hepatitis B humano y el virus de la hepatitis de marmota (Murray *et al.*, 1984; Schödel *et al.*, 1993).

El desarrollo de otros sistemas de expresión, en particular el sistema “baculovirus-células de insecto” fue el acontecimiento que marcó un nuevo impulso en el desarrollo de las partículas semejantes a virus. De esta manera, en la década de los ‘90 se crearon VLPs para una serie de virus mediante la utilización de este sistema, por ejemplo, de rotavirus (Redmond *et al.*, 1993; Crawford *et al.*, 1994; Zeng *et al.*, 1994), virus bluetongue (French y Roy 1990; French *et al.*, 1990), virus de la hepatitis A (Rosen *et al.*, 1993), virus adeno-asociados (Ruffing *et al.*, 1992), papilomavirus humano (HPV) (Kirnbauer *et al.*, 1992; Rose *et al.*, 1993; Volpers *et al.*, 1994), parvovirus (Kajigaya *et al.*, 1991; Salimans *et al.*, 1992), virus del sarampión (Fooks *et al.*, 1993) y retrovirus, en particular, lentivirus (Delchambre *et al.*, 1989; Gheysen *et al.*, 1989; Luo *et al.*, 1990; Rasmussen *et al.*, 1990; Thomsen *et al.*, 1992).

La posibilidad de expresar en células de insecto varias proteínas simultáneamente, hecho desarrollado primero con el virus *bluetongue* (Luodon y Roy 1991), facilitó el estudio de los procesos de ensamble de proteínas estructurales en sistemas heterólogos e hizo posible el coensamble de múltiples proteínas de cápside de otros virus, como rotavirus (Crawford *et al.*, 1994), poliovirus (Bräutigam *et al.*, 1993), polyomavirus (An *et al.*, 1999) y el virus del arroz pigmeo (*rice dwarf virus*) (Hagiwara *et al.*, 2003).

Hasta la fecha, se han obtenido VLPs de más de 30 virus diferentes procedentes de distintas familias: *Caliciviridae*, *Picornaviridae*, *Flaviviridae*, *Retroviridae*, *Paramyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Parvoviridae*, *Circoviridae*, *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae*, *Hepadnaviridae*, etc.

Este grupo es extremadamente diverso en términos de “estructura viral” : cápsides formadas por una única proteína, por dos o más proteínas, con y sin envoltura.

En la figura 1, se esquematiza la complejidad que pueden tener las VLPs.

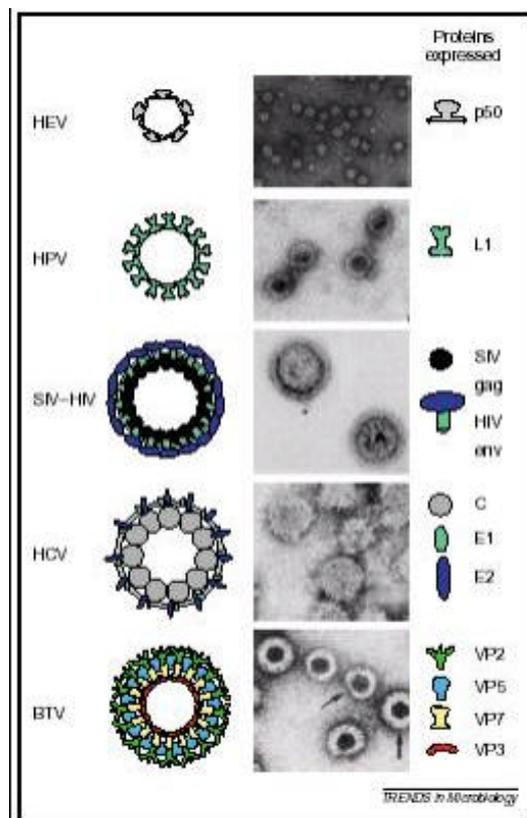


Figura 1: Grado de complejidad de las VLPs. Esquema obtenido de Noad y Roy, 2003. Abreviaturas: HEV, virus de la hepatitis E ; HPV, virus papiloma humano; SIV-HIV: virus de la inmunodeficiencia del simio-virus de la inmunodeficiencia humana; BTV, virus bluetongue.

Finalmente, vale señalar que en todos los ejemplos mencionados, las VLPs son de fácil enriquecimiento y purificación en el laboratorio. Además, las VLPs no contienen material genético derivado del patógeno, no replican y no son infecciosas.

2.1 Las VLPs en el diagnóstico serológico

En los casos en los que no es posible multiplicar virus *in vitro* (como en casos de HBV, HPV, virus *Norwalk* y parvovirus), las VLPs expresadas por técnicas recombinantes ofrecen una gran oportunidad para establecer sistemas de diagnóstico serológico. Ya que estas partículas muestran cantidades pronunciadas de determinantes antigénicos, en particular aquéllos de naturaleza conformacional especialmente importantes para la detección de anticuerpos contra el virus, tienen una ventaja decisiva respecto de las proteínas monoméricas.

Tomando como ejemplo el virus del papiloma humano, los ensayos serológicos desarrollados antes de 1993 (*immunoblots*) para identificar infecciones de alto riesgo para HPV, fallaron en asociar la reactividad de los sueros con otros indicadores de la infección por HPV (por ejemplo, aparición de verrugas o desarrollo de neoplasia). Debido a que la respuesta humoral que se induce frente a una infección por HPV está dirigida principalmente a epitopes conformacionales de la cápside viral, las VLPs basadas en las proteínas de cápside L1 y L2 (serotipos 11y 16) demostraron ser de gran utilidad en el serodiagnóstico de HPV presentando una alta correlación con la historia clínica de la paciente (Carter *et al.*, 1993; Rose *et al.*, 1993; Kirnbauer *et al.*, 1994; Dilner *et al.*, 1995).

El caso del virus *Norwalk* (NV) (patógeno humano que causa gastroenteritis aguda) es otro ejemplo para el que no existen líneas celulares o modelos animales en los que el virus pueda multiplicar. La única fuente de antígeno para establecer sistemas de diagnóstico proviene de muestras humanas, con todas las desventajas y riesgos que ello acarrea. En 1992, Jiang y colaboradores lograron expresar la proteína de cápside de NV, obteniendo grandes cantidades de VLPs. Esto permitió el desarrollo de un rápido, sensible y confiable test de diagnóstico para NV (Jiang *et al.*, 1992).

2.2 Las VLPs como vacunas

En el caso particular del virus del papiloma humano, la producción de VLPs basadas en la proteína L1 de HPV (utilizando el sistema baculovirus-células de insecto), no sólo resultó una valiosa herramienta en el diagnóstico serológico sino que también se convirtió en un gran candidato a vacuna por dos motivos fundamentales: las VLPs carecen del ADN potencialmente oncogénico de HPV y además expresan epitopes conformacionales necesarios para inducir altos títulos de anticuerpos neutralizantes (Kirnbauer *et al.*, 1992; Kirnbauer 1996).

La expresión conjunta de las proteínas de cápside L1 y L2 de HPV dio como resultado la formación de VLPs que inducen altos títulos de anticuerpos neutralizantes y proveen inmunidad protectora de larga duración en animales frente a la infección viral y el desarrollo de papilomas. Estos resultados se obtuvieron empleando distintos modelos animales: conejos (Breitburd *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 1996), vacas (Kirnbauer *et al.*, 1996) y perros (Suzich *et al.*, 1995), analizando distintas vías de inmunización y de protección frente al desafío.

Estudios recientes mostraron que estas VLPs son seguras e inmunogénicas en humanos (Harro *et al.*, 2001) induciendo una respuesta inmune humoral y celular específica contra HPV (Emeny *et al.*, 2002). En un estudio realizado con 2300 mujeres voluntarias (negativas para HPV serotipo 16), se aplicaron tres dosis de VLPs derivadas de HPV-16 o tres dosis de placebo. Se realizó un seguimiento clínico durante dos años para evaluar la protección frente a la exposición natural al virus. Sólo se observó neoplasia cervical relacionada con HPV-16 en el grupo que recibió el placebo. Estos resultados demostraron que las VLPs derivadas de HPV-16 presentan un 100% de eficacia (con un intervalo de confianza del 95%) en la prevención de infecciones de alto riesgo por HPV (Koutsky *et al.*, 2002).

En el caso de los rotavirus, principal agente viral que causa gastroenteritis aguda en la mayoría de los mamíferos incluido el hombre, la expresión conjunta de las proteínas VP6, VP2, VP4 y VP7 llevó a la obtención de VLPs complejas y su utilización como vacuna experimental contra rotavirus. Al inmunizar ratones por vía parenteral con estas VLPs complejas se obtuvo una respuesta inmune humoral

protectora frente al desafío con cepas de rotavirus homólogas y heterólogas (Redmond *et al.*, 1993; Madore *et al.*, 1999). Se observó un resultado similar cuando las VLPs fueron administradas por vía intranasal (O'Neal *et al.*, 1997).

En otros estudios, Fernandez y colaboradores analizaron la utilización de estas VLPs complejas en la inmunización del ganado vacuno. Terneros recién nacidos alimentados con calostro de vacas inmunizadas con dichas VLPs resultaron protegidos frente al desafío viral (Fernandez *et al.*, 1998). Estos sugieren que las VLPs derivadas de rotavirus pueden inducir inmunidad de mucosas.

Al comparar el nivel de protección inducido por las VLPs complejas con aquél de la vacuna tradicional contra rotavirus (virus inactivado) en el ganado bovino, se obtuvieron títulos de anticuerpos significativamente más altos en calostro, leche y suero en las vacas inmunizadas con las VLPs con respecto a las inmunizadas con la vacuna comercial (Kim *et al.*, 2002). ¿A qué se debe esta diferencia en la inducción de anticuerpos si los dos inmunógenos son proteínas con una conformación espacial determinada y sin capacidad de replicar? Una explicación posible es que la mayoría de las VLPs formadas por las proteínas VP2, VP6, VP4 y VP7 de rotavirus, son partículas de triple cápside (Crawford *et al.*, 1994; Zeng *et al.*, 1996) similares a la estructura natural de los viriones de rotavirus, mientras que las cepas de rotavirus obtenidas por pasajes en cultivos de tejidos son en su mayoría partículas de doble cápside (Saif *et al.*, 1977). Debido a la manipulación en su producción, las partículas pierden la capsida más externa formada por VP4 y VP7 que son las proteínas inductoras de anticuerpos neutralizantes. Este hecho demuestra una vez más la ventaja de utilizar VLPs como vacunas.

Otro ejemplo de VLPs complejas utilizadas como vacunas es el caso del virus *bluetongue* (BTV). Este virus causa una grave enfermedad en las ovejas y tiene amplia distribución mundial, ya que es transmitida por la picadura de un mosquito vector. El virus presentan una estructura compleja de doble cápside concéntrica formada por las proteínas VP2, VP3, VP5 y VP7, que al ser expresadas en forma conjunta en el sistema baculovirus-células de insecto, se ensamblan en VLPs. La inmunización de ovejas Merino con VLPs complejas de BTV dio como resultado la

inducción de una respuesta inmune humoral específica que protegió con un 100% de eficacia frente al desafío con una cepa homóloga de BTV (Roy *et al.*, 1992; Roy *et al.*, 1994).

Si pensamos en el sistema de inmunidad de mucosas, un inmunógeno no replicativo debe superar diversas dificultades: el pH ácido del estómago, las enzimas proteolíticas del tracto digestivo y las barreras físicas y bioquímicas propias de la mucosa (Morrow *et al.*, 1999). Generalmente, en la formulación de inmunógenos de administración oral o nasal, se han agregado “adyuvantes de mucosas” como por ejemplo, la toxina colérica. Sin embargo, estos adyuvantes pueden provocar efectos locales no deseados (Boyaka *et al.*, 1999). Para superar todos estos inconvenientes, se propuso la utilización como inmunógeno por vía oral o nasal de VLPs basadas en proteínas virales que normalmente estimulan la inmunidad de mucosas a través de las células epiteliales M y del tejido linfoide intestinal, aprovechando la estructura particulada de las VLPs para presentar múltiples copias de un epítipo y la afinidad por el epitelio de mucosas (Bergmann y Waldman, 1988; de Aizpurra y Russel-Jones, 1988; Estes *et al.*, 2002).

Esto quedó demostrado al utilizar VLPs de Virus *Norwalk* como inmunógeno por vía oral tanto en ratones como en humanos, las que indujeron una respuesta inmune sistémica y de mucosas sin necesidad de administrar adyuvantes (Ball *et al.*, 1998; Ball *et al.*, 1999).

2.3 VLPs quiméricas

La razón principal por la que se intentaron crear VLPs quiméricas para su uso como vacunas se basó en la baja inmunogenicidad de los péptidos libres. Con la intención de aumentar la inmunogenicidad de moléculas con epítopes neutralizantes, estos péptidos se expresaron genéticamente acoplados a VLPs. Debido a su estructura espacial, los sitios antigénicos son presentados al sistema inmune de manera multimérica, asociados a proteínas inmunogénicas.

Esto pudo ser demostrado claramente en VLPs quiméricas derivadas de la proteína core del HBV con la inserción de un péptido de rinovirus. El péptido

presentado por la VLP resultó ser 10 veces más inmunogénico que el acoplado a la proteína KLH una proteína *carrier* no multimérica y 100 veces más inmunogénico que el péptido libre (Francis *et al.*, 1990).

La proteína core de HVB fue la primera en ser usada como transportadora de epitopes por varias razones: i) fue una de las primeras proteínas virales expresadas al comienzo del desarrollo de la ingeniería genética; ii) pudo ser producida a muy altos niveles y se ensambló correctamente en ausencia de otros componentes virales en diferentes especies procariontas y eucariotas, tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Spodoptera frugiperda*, ovocitos de *Xenopus*, y varios cultivos celulares de mamíferos; iii) presenta una gran flexibilidad y alta capacidad de aceptar en su secuencia grandes inserciones foráneas.

En un primer momento, algunos investigadores pensaron que la inmunogenicidad de la proteína *carrier* podría interferir en la inducción de una respuesta adecuada. Sin embargo, la presencia de epitopes para células T-*helper* presentes en la proteína *carrier* podría ser utilizado para la inducción de una respuesta inmune contra el epítipo foráneo. Apoyando esta hipótesis, las VLPs que han sido utilizadas como *carriers* mostraron una gran inmunogenicidad, ya que fueron capaces de disparar fuertes respuestas inmunes de células B, T-*helper* y T citotóxicas contra epitopes heterólogos (Schlinger *et al.*, 1992; Schödel *et al.*, 1992; Layton *et al.*, 1993; von Bruun *et al.*, 1993; Tindle *et al.*, 1994; Sedlick *et al.*, 1995; Sedlick *et al.*, 1997; Ball *et al.*, 1998; Emery *et al.*, 2002; Niikura *et al.*, 2002), en ensayos realizados en primates y roedores.

Más aún, se han reportado ejemplos en los que las VLPs fueron capaces de inducir una respuesta inmune sin la aplicación de adyuvantes o usando adyuvantes permitidos para su aplicación en humanos (Francis *et al.*, 1990; Griffiths *et al.*, 1991; Harris *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1992; Sedlick *et al.*, 1999).

Otro ejemplo de VLPs quiméricas viene dado por la expresión de la proteína de cápside (CP) del virus del mosaico Johnson Grass (JGMV) fusionada a un epítipo

de la proteína E del virus de la encefalitis de Japón (JEV). Esta proteína de fusión formó VLPs que presentaron eficientemente el péptido de interés al sistema inmune sin necesidad de utilizar adyuvantes. Los ratones inmunizados con estas VLPs quiméricas desarrollaron altos títulos de anticuerpos neutralizantes y resultaron protegidos frente al desafío con una dosis letal de JEV (Saini y Vrtati, 2003).

Como se mencionó anteriormente, la utilización de VLPs quiméricas no sólo permite desarrollar una respuesta humoral contra epitopes heterólogos de interés; también es posible desarrollar una respuesta celular T protectora.

La expresión de la proteína de cápside L2 de HPV fusionada al antígeno E7 (marcador de tumores por HPV) dio como resultado la formación de VLPs quiméricas L1/L2-E7 que resultaron indistinguibles de las VLPs parentales L1/L2 en su morfología y en su habilidad para inducir anticuerpos neutralizantes contra HPV. La inmunización de ratones con estas VLPs L1/L2-E7 primó una respuesta que resultó protectora frente al desafío con células tumorales que expresaban el antígeno E7. Esta protección se observó en ratones deficientes en el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) pero no en ratones *knockout* para beta2-microglobulina (proteína que integra el complejo MHC de clase I), indicando que la protección fue mediada por linfocitos citotóxicos restringidos a clase I (Greenstone *et al.*, 1998).

Con respecto a la inmunidad de mucosas, se ha demostrado que VLPs derivadas de virus que normalmente estimulan esta vía, también son capaces de estimular el sistema inmune de mucosas (O'Neal *et al.*, 1997; Ball *et al.*, 1998; Fernandez *et al.*, 1998; Ball *et al.*, 1999).

De igual manera, la inmunización de ratones por vía oral con VLPs quiméricas derivadas del virus de la hepatitis E, indujo niveles significativos de IgG e IgA específicos contra el epitope heterólogo en secreciones intestinales, sin necesidad de utilizar adyuvantes (Niikura *et al.*, 2002).

3. La proteína VP6 de Rotavirus

Rotavirus es un miembro de la familia *Reoviridae*. Este virus replica en el tracto intestinal de un amplio rango de especies de mamíferos, incluyendo al hombre, causando gastroenteritis aguda y diarrea. Algunas evidencias sugieren que rotavirus produce una enterotoxina (NSP4) que causa o contribuye al desarrollo de la diarrea (Tian *et al.*, 1994; Hoire *et al.*, 1999).

El virus es altamente contagioso y puede sobrevivir hasta varios días en el ambiente. La ruta de contaminación es fecal-oral.

La partícula viral está compuesta de una estructura de triple cápside que contiene los 11 segmentos de ARN doble cadena que conforman su genoma (Figura 2). La cápside externa está formada por dos proteínas: VP7 (una glicoproteína) y VP4, proteína que forma las espículas. Esta última, se cliva mediante tripsina durante el mecanismo de penetración para originar VP5 y VP8. Las proteínas VP4 y VP7 son inductoras de anticuerpos neutralizantes (Fields *et al.*, 1996).

La cápside interna o *core* tiene una estructura icosaédrica y contiene el genoma de los rotavirus. Cada segmento genómico está anclado a un vértice del *core* mediante las proteínas VP1 y VP3 que tienen función de ARN polimerasa y de guanililtransferasa, respectivamente, mientras que la proteína VP2 es la que forma la cápside interna (Fields *et al.*, 1996).

Esta cápside interna está rodeada por una cápside intermedia formada por 780 moléculas de VP6 (la proteína mayoritaria de los rotavirus), ordenadas en trímeros. La proteína VP6 tiene un peso molecular aparente igual a 45 KDa (Fields *et al.*, 1996).

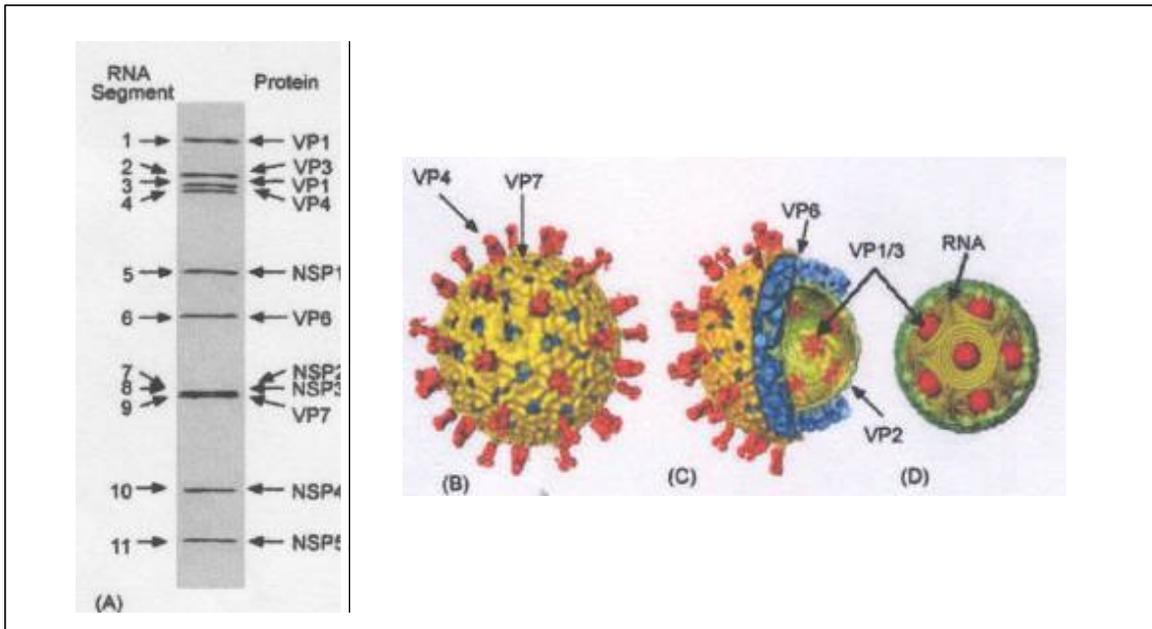


Figura 2: Esquema de la partícula viral de los rotavirus. (A) Representación del genoma segmentado de los rotavirus. A la izquierda se indican los fragmentos genómicos y a la derecha la proteína codificada por cada uno de ellos. (B) Representación de la cápside externa de rotavirus formada por VP4 y VP7. (C) Representación de la estructura de triple cápside, donde se observa la capsida externa (VP7 en amarillo y VP4 en rojo), la cápside media formada por la proteína VP6 (en azul) y la cápside interna o *core* formada por la proteína VP2 (en verde). (D) Representación del *core*: se grafica las proteínas VP2 (verde oscuro), VP1 y VP3 (rojo) y el RNA genómico (verde claro). Cada segmento genómico está anclado por VP1 y VP3 a un vértice de la cápside interna.

La proteína VP6 corresponde al 50-60% de la masa total del virión (Fields *et al.*, 1996). Es altamente inmunogénica y antigénica y es la proteína más frecuentemente detectada en los ensayos de diagnóstico e inmunológicos. Posee los determinantes antigénicos que permiten caracterizar y clasificar las distintas cepas de rotavirus en grupos y subgrupos (Thoules *et al.*, 1982; Greenberg *et al.*, 1983; Kohli *et al.*, 1992).

Al tratar la partícula viral con agentes quelantes (por ejemplo EDTA 10mM) se puede “desnudar” al virión de su cápside externa (VP4 y VP7), quedando una partícula de doble cápside o DLPs (del inglés, *double layered particles*) formada por una capa de proteína VP6 rodeando al *core*. Las DLPs derivadas de rotavirus no son infectivas pero son transcripcionalmente activas. Mediante este

procedimiento fue posible realizar en las décadas de 1970 y 1980 los primeros análisis de la estructura y ordenamiento de la proteína VP6 en el virión. Utilizando la técnica de *freeze-drying* se postuló la presencia de trímeros de VP6 en la partícula viral (Esparza y Gil, 1978; Roseto *et al.*, 1979). Esto se confirmó más tarde por análisis bajo condiciones reductoras o desnaturizantes de la proteína VP6 separada del virión por tratamiento con CaCl_2 1,5M (Gorziglia *et al.*, 1985; Sabara *et al.*, 1987). Dichos autores confirmaron la formación de trímeros de VP6 y determinaron la naturaleza de esta asociación; los monómeros se unen para formar trímeros por fuertes uniones hidrofóbicas y los trímeros se unen entre sí por puentes disulfuro.

La proteína VP6 es capaz de autoensamblarse en partículas esféricas y láminas tanto en su forma nativa (Ready y Sabara, 1987) como cuando es expresada en forma de proteína recombinante en el sistema baculovirus-células de insecto (Clapp y Patton, 1991; Tosser *et al.*, 1992) (Figura 3).

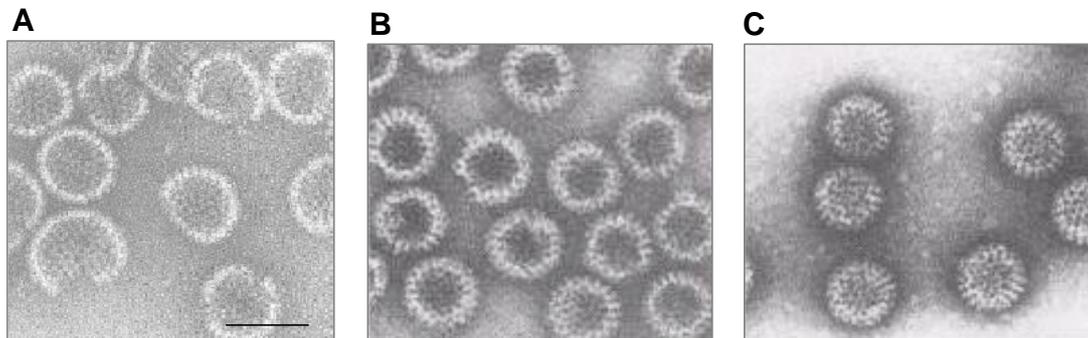


Figura 3: Microscopía electrónica de VLPs de VP6. Las “esferas” de VP6 expresada en el sistema baculovirus-células de insecto son morfológicamente indistinguibles de las que se forman por desnudamiento secuencial de rotavirus. (A) VLPs formadas únicamente por la proteína VP6. (B) VLPs formadas por las proteínas VP6 y VP2. (C) DLPs naturales derivadas de la cepa SA11 de rotavirus. La barra indica 100nm. Fotografías obtenidas de Crawford *et al.*, 1994 y de Lepault *et al.*, 1999.

Estas estructuras resultaron ser prácticamente indistinguibles de las formadas naturalmente. Sin embargo, un análisis ultrafino de estas estructuras determinó algunas diferencias. Por ejemplo: los túbulos de VP6 ensamblados *in vitro* presentan un radio medio de 325Å y un largo axial de 721Å, mientras que para las

estructuras tubulares que se encuentran naturalmente en una infección por rotavirus se determinó un radio promedio de 250Å y un largo de 562Å (Ready *et al.*, 1988).

Las diferencias encontradas en las estructuras que adopta la proteína VP6 al ser ensamblada en sistemas heterólogos pueden ser explicadas por el pH del sistema de producción *in vitro*. Lepault y col., determinaron que el estado de protonación de VP6 define el tipo de ensamble, probablemente al afectar el contacto lateral específico entre los trímeros (Lepault *et al.*, 2001) (Figura 4).

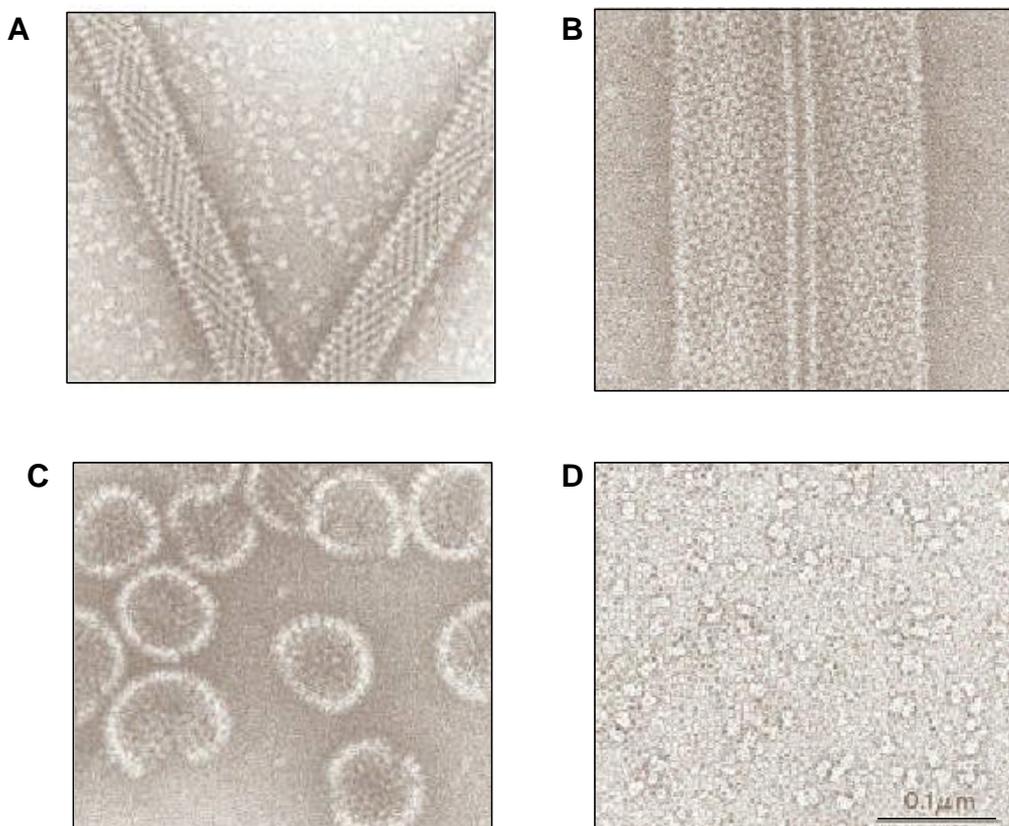


Figura 4: Caracterización de los distintos ensambles de la proteína VP6. (A): Formación de túbulos de VP6 de 45 nm de diámetro a pH 8 o alta astringencia iónica (Ca^{2+} o Zn^{2+} 100mM). (B): Túbulos de 75nm de diámetro a pH 6,5. (C): Esferas de VP6 a pH 5,5 y baja astringencia iónica. (D): Trímeros de VP6 obtenidos a pH 2,5 o alta astringencia iónica (Ca^{2+} 600mM). La barra indica 0,1 μm . Fotografías obtenidas de Lepault *et al.*, 2001.

Si bien la proteína VP6 tiene la capacidad por sí sola de ensamblarse en formas esféricas, la correcta geometría de la partícula viral está determinada por la proteína VP2, que aporta el ambiente electroestático positivo necesario para formar partículas esféricas un pH neutro (Lepault *et al.*, 2001; Mathieu *et al.*, 2001).

La producción de VLPs basadas en la proteína VP6 de rotavirus en el sistema baculovirus-células de insecto permitió, en un primer momento, analizar la morfogénesis de rotavirus, logrando establecer a grandes rasgos los dominios de oligomerización y de unión al *core* de rotavirus (Clapp y Patton, 1991; Charpillienne *et al.*, 2002).

Mediante deleciones de grandes secciones de la región amino terminal y carboxilo terminal de la proteína VP6, Clapp y Patton en 1991 postularon que la capacidad de formar VLPs radica en el dominio C-terminal, comprendido entre los aminoácidos 251 y 397. El dominio de trimerización estaría ubicado en la zona media de VP6 (aminoácidos 105 a 328) pero por la metodología utilizada no pudo ser localizado con precisión. En 1997, Afracchino y Gonzalez utilizaron la misma estrategia de análisis, pero trabajaron con deleciones pequeñas de VP6 y lograron acotar el dominio de trimerización a los residuos aminoacídicos 246 a 314.

A diferencia de los anteriores, Charpillienne y colaboradores (2002), utilizaron la sustitución de aminoácidos para analizar la interacción de VP6 con VP2. De esta manera determinaron que los aminoácidos 32, 65 y 70 son críticos en la interacción de VP6 con el *core* de rotavirus y en la recuperación de la capacidad de transcripción de las partículas de doble capa (*double layered particles* o DLP).

3.1 La proteína VP6 como *carrier* de epitopes foráneos

Como se mencionó anteriormente, la proteína VP6 es altamente inmunogénica y antigénica.

Para que una molécula sea considerada un buen inmunógeno, debe poseer epitopes que puedan unirse a los anticuerpos de superficie de los linfocitos B vírgenes así como también epitopes que promuevan la comunicación célula a

célula entre los linfocitos B y las células T-*helper* (entre el complejo MHC de clase II y el receptor T). Esta interacción es sumamente importante para producir la maduración del linfocito B a célula secretora de anticuerpos (plasmocito).

El epítopo que se une al anticuerpo de superficie del linfocito B puede no ser el mismo que promueve la unión entre el complejo MHC de clase II y el receptor T, pero sí deben estar en la misma molécula o complejo.

El rol clásico de una proteína *carrier* es proveer epítopos T-*helper* para la producción de anticuerpos contra un antígeno poco inmunogénico o hapteno. En algunos casos, el péptido puede ser inmunogénico per-se ya que esa secuencia es al mismo tiempo un epítopo B y un epítopo T, entonces la molécula *carrier* actúa simplemente como sistema de presentación multimérico (Francis *et al.*, 1985).

La proteína VP6 de rotavirus podría funcionar como *carrier* de epítopos heterólogos ya que posee dos características fundamentales:

- Es capaz de formar VLPs, macromoléculas con varias copias de un polipéptido y conformación espacial definida.
- Posee al menos dos epítopos para células T-*helper* (Baños *et al.*, 1997). Uno de ellos, la región comprendida por los aminoácidos 289-302 está altamente conservada entre 18 cepas distintas de rotavirus pertenecientes al grupo A.

En 1990, se evaluó por primera vez la utilización de VLPs basadas en la proteína VP6 como *carrier* de epítopos foráneos. La metodología utilizada en ese momento fue el acoplamiento químico de estas VLPs con diferentes proteínas o epítopos derivados de rotavirus o herpes bovino tipo 1. Con estas VLPs quiméricas se realizaron ensayos de inmunización en ratones, incluyendo como controles grupos de ratones inmunizados con los antígenos solubles (proteína o péptido sintético) o acoplados a la proteína *carrier* KLH, una proteína monomérica. Los resultados obtenidos indicaron que estas “esferas de VP6” actuaron como muy efectivos transportadores inmunológicos induciendo una respuesta inmune humoral contra

los antígenos heterólogos con mayor título de anticuerpos y de mayor duración en el tiempo (Redmond *et al.*, 1991; Frenchick *et al.*, 1992).

Sin embargo, a pesar de los resultados alentadores obtenidos por Redmond y Frenchick, no ha habido reportes posteriores a la utilización de VLPs basadas en la proteína VP6 de rotavirus como sistema de presentación de epitopes heterólogos. La razón principal parece deberse a que la metodología de acoplamiento químico es sumamente costosa: al costo de producción de las VLPs hay que agregarle el de la producción y purificación de las proteínas heterólogas o el de la síntesis de los péptidos foráneos (por ejemplo, para asegurar el acoplamiento entre la proteína VP7 de rotavirus a 10 μg de las “esferas de VP6” se requieren 100 μg de VP7; Redmond *et al.*, 1993). Además, se agrega el costo y dificultad de los pasos de purificación del producto final, necesarios para eliminar todo rastro de los agentes químicos utilizados en la reacción de acoplamiento.

También es necesario considerar que si los aminoácidos involucrados en el acoplamiento químico están involucrados en la antigenicidad del péptido, ésta puede verse seriamente afectada.

La metodología más conveniente debe considerar, entonces, expresar la proteína carrier y el epitope heterólogo como una fusión transcripcional, en un sistema de expresión capaz de producir cantidades considerables del producto quimérico acoplado a procedimientos de purificación o concentración sencillos. Sin embargo, para lograr este objetivo, es necesario conocer cuáles son las posiciones aminoacídicas de VP6 capaces de tolerar la inserción de secuencias foráneas sin afectar la propiedad de multimerizar en VLPs y que además expongan el epitope heterólogo en su superficie, en una conformación adecuada para inducir anticuerpos anti-epitope.

Con el fin de explorar los posibles sitios de inserción de epitopes foráneos en una proteína que forma VLPs, diferentes autores han usado una de dos estrategias:

- i) Aprovechar los sitios blanco de enzimas de restricción que posee naturalmente la proteína carrier (Niikura *et al.*, 2002)

- ii) Realizar la inserción del epítoto heterólogo en sitios expuestos al solvente o en las zonas denominadas *loops*, mediante mutagénesis dirigida por PCR, si se posee datos cristalográficos de la proteína *carrier* (Rueda *et al.*, 1999; Kratz *et al.*, 1999).

En este trabajo de tesis, se empleó la estrategia de mutagénesis insercional mediante PCR y la evaluación de las propiedades estructurales, antigénicas e inmunogénicas de las distintas quimeras expresadas en el sobrenadante de cultivo de células infectadas con baculovirus recombinantes.

4. El epítoto V5

Para investigar el efecto de la inserción de una secuencia aminoacídica foránea en la capacidad de multimerización en distintas versiones de la proteína VP6 quimérica y evaluar el grado de exposición en la superficie de las partículas, así como su inmunogenicidad, se seleccionó el epítoto V5 como epítoto heterólogo.

El péptido V5 es una secuencia inmunogénica que deriva del virus SV5 (simian virus 5). El virus SV5 pertenece al género Rubulavirus de la familia *Paramyxoviridae*. Está relacionado morfológica y antigénicamente con el virus parainfluenza humano subtipo 2 (hPIV2) que infecta el tracto respiratorio inferior. El virus SV5 puede afectar a monos, perros, cerdos y al hombre (Goswami *et al.*, 1984; Chatziandreu *et al.*, 2004) por lo que se estudia la posibilidad de reclasificarlo con el nombre de parainfluenza virus 5.

El péptido V5 fue caracterizado por primera vez por Randall y colaboradores en 1987, cuando intentaban obtener una batería de anticuerpos monoclonales que permitieran diferenciar aislamientos del virus SV5 provenientes de humanos, monos y perros.

Debido a sus características inmunológicas, el epítoto V5 es frecuentemente empleado como *tag* marcador de proteínas recombinantes. El péptido identificado

originalmente estaba formado por 9 aminoácidos, pero al producirlo de manera sintética resultó ser hidrofóbico, lo cual dificultaba su utilización. Con el fin de exponer el oligopéptido en la superficie de proteínas, se agregaron 5 aminoácidos hacia el extremo carboxilo terminal.

El péptido resultante formado por 14 aa mantuvo su antigenicidad y fue reconocido por el anticuerpo monoclonal SV5-P-k cuando se lo utilizó como *tag* en el extremo C-terminal de diversas proteínas, tales como GST (Glutation S Transferasa) y las proteínas p27 y gp110 del virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV) (Randall 1989; Hanke *et al.*, 1992), aún cuando estas proteínas fueron obtenidas en condiciones desnaturalizantes. Además, cuando se utilizó el péptido V5 como *tag* del fragmento variable (Fv) de un anticuerpo específico para una lisosima expresado en bacterias, su secreción al espacio periplásmico no se vió afectada y el fragmento Fv-tagV5 pudo ser utilizado en el desarrollo de un ensayo de ELISA (Hanke *et al.*, 1992).

En consecuencia, el epítopo V5 formado por 14 aminoácidos puede utilizarse como *tag* de proteínas manteniendo su antigenicidad y la de la proteína marcada. Además, se dispone comercialmente de un anticuerpo monoclonal que permite reconocer proteínas fusionadas al epítopo V5 por distintos ensayos: *Western blot*, ELISA e inmunoprecipitación.

Objetivos:

El objetivo general del proyecto consiste en caracterizar antigénica y estructuralmente la proteína VP6 de rotavirus mediante mutagénesis insercional y evaluar el empleo de partículas semejantes a virus (VLPs) basadas en esta proteína como sistema de presentación multimérico de sitios antigénicos heterólogos.

Los objetivos particulares son:

1. Expresar en células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes quimeras proteicas de VP6 con la inserción del epitope V5 de paramyxovirus en distintas posiciones aminoacídicas.
2. Determinar la capacidad de las proteínas quiméricas VP6-V5 de mantener las propiedades de trimerización, interacción con la proteína VP2 de rotavirus y de multimerización en partículas semejantes a virus.
3. Evaluar la inmunogenicidad de las diferentes construcciones en animales de laboratorio.

1. Virus

El baculovirus utilizado en este trabajo fue el virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV). Su multiplicación se realizó en células Sf9 crecidas en forma de monocapa a 27°C.

Se utilizó la cepa de Rotavirus bovino NCDV (grupo A, G6 P1). Su multiplicación se realizó en células MA104 a 37°C.

2. Células

Se utilizaron las células de insecto de la línea Sf9 (ATCC) derivada de tejido ovárico de *Spodoptera frugiperda*. Las células se crecieron a 27°C en forma de monocapa o de cultivos en suspensión en medio TNM-FH (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sudamericano, irradiado, Gibco-BRL) y una solución de antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U/ml, estreptomicina 10 mg/ml, amphotericina B 25 µg/ml, Gibco-BRL).

Las células MA104 se crecieron en forma de monocapa en medio MEM-D suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco-BRL).

3. Animales de laboratorio

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BalbC de 2 meses de edad. Los animales fueron provistos por el Bioterio del INTA.

4. Cepas bacterianas

Para las estrategias de clonado se utilizó la cepa DH5α de *Escherichia coli* cuyo genotipo es el siguiente :

supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR (φ80dlacΔlacZ)M15.

Se utilizó también la cepa JM110 de *E. coli* cuyo genotipo es el siguiente:

rpsL (Str^r) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dan dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lac^qZΔM15].

Para la expresión de proteínas en bacterias se utilizó la cepa BL21 de *E. coli* cuyo genotipo es el siguiente: B F- dcm ompT hsdS(r_B- m_B-) gal.

Los cultivos líquidos se realizaron en medio LB (5 g/l Triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl), con agitación constante de 100 rpm a 37°C.

5. Metodología del ADN recombinante

5.1 Preparación de ADN plasmídico de alta calidad

Se utilizaron las columnas de intercambio aniónico comerciales QIAPREP. La purificación del ADN plasmídico se realizó a partir de 3ml de sobrenadante de cultivo saturado de bacterias transformadas, rindiendo aproximadamente 2µg de ADN que fue eluido de la columna con 100µl de una solución de Tris-HCl 10mM pH8.

5.2 Digestión con enzimas de restricción

Para las digestiones de los diferentes plásmidos se utilizaron 500ng de ADN, 5U de enzima de restricción (New England Biolabs), buffer apropiado y un volumen final de 20µl. Las reacciones se incubaron de 2 a 3 hs a la temperatura recomendada para cada enzima.

5.3 Defosforilación de los extremos 5' fosfato

La reacción de remoción de los grupos fosfato de los extremos 5' de los plásmidos digeridos se realizó utilizando 5U de la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP, New England Biolabs) agregadas directamente al volumen de reacción de digestión. La reacción se incubó por 15 minutos a 37°C.

5.4 Electroforesis en geles de agarosa

Se realizaron geles de agarosa de concentraciones entre 0,8% y 1,5%. Los geles se corrieron en buffer TAE (Tris-acetato 10mM, EDTA 1mM) a 5-10 V/cm a temperatura ambiente. Con el fin de visualizar las bandas de ADN se utilizó bromuro de etidio a una concentración de 0,5µg/ml de gel.

Para sembrar las muestras se utilizó un buffer de siembra de concentración 10X (glicerol 50%, TAE 10X, azul de bromofenol 1%).

Los geles se fotografiaron utilizando un equipo Fotodyne y el programa Collage (Macintosh).

5.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Con el fin de purificar el fragmento que codifica para el epitope V5 de tan sólo 50pb, se utilizaron minigeles de poliacrilamida 8% (6 x 9 cm), con un grado de entrecruzamiento acrilamida:bisacrilamida de 29:1. Los geles se corrieron a una corriente constante de 25mA en *buffer* TBE (Tris 89mM; ácido bórico 89mM, EDTA 2mM) durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, los geles fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (10mg/ml) durante dos minutos y luego visualizados con el equipo Fotodyne.

5.6 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa o de poliacrilamida

Las bandas de ADN resueltas mediante geles de agarosa o de poliacrilamida se escindieron del gel mediante el uso de bisturí y se purificaron utilizando el kit "QiaexII purification system" (QIAGEN). El ADN obtenido se resuspendió en una solución de Tris-HCl 10mM pH8 siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5.7 Reacciones de ligado molecular

Para el ligado molecular de los diferentes insertos a los plásmidos correspondientes, se utilizaron entre 50 y 100ng de vector y diferentes relaciones molares vector: inserto (1:1 y 1:3). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 10µl, en presencia de buffer de ligado (Tris-HCl 50mM pH7,5, MgCl₂ 10mM, dithiothreitol 10mM, dATP 1mM, seroalbúmina bovina 25µg/ml) y 10 U de enzima T4 ADN ligasa (New England Biolabs). La reacción se incubó a 16°C toda la noche, incluyendo un control de vector sin inserto.

5.8 Transformación de bacterias

Las bacterias se hicieron competentes para la transformación mediante el método de Hanahan (1985) y se mantuvieron congeladas a -70°C hasta su uso. Entonces se descongelaron y se mantuvieron en hielo por 10 min. A $50\mu\text{l}$ de bacterias se agregaron $5\mu\text{l}$ del producto de las diferentes reacciones de ligado, se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 30 a 45 minutos. Posteriormente se realizó un choque térmico a 42°C por 90 seg y se dejó en hielo por 2 min adicionales. Se agregaron luego $200\mu\text{l}$ de medio LB, se incubó a 37°C con agitación suave y se plaqueó entonces en medio LB agarizado conteniendo ampicilina a una concentración final de 100 ug/ml . Las placas se incubaron a 37°C toda la noche y las colonias se picaron con escarbadietes esterilizados, que se usaron para inocular cultivos de 3ml de LB/Ampicilina.

5.9 Minipreparaciones de ADN

Se utilizó el método de Birnboim y Doly (1979) con ligeras modificaciones. Se partió de 3ml de cultivo de bacterias en medio LB/Ampicilina crecido toda la noche a 37°C . Las bacterias se cosecharon por centrifugación a $10.000 \times g$ en una microcentrífuga de mesa y se resuspendieron en $200\mu\text{l}$ de Solución I (Tris-HCl 25mM pH8, EDTA 10mM , glucosa 50mM). Luego se agregaron $200\mu\text{l}$ de Solución II (NaOH $0,2\text{N}$, SDS 1%) se mezcló suavemente por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron $200\mu\text{l}$ de Solución III (acetato de potasio 3M) y se mezcló por inversión. Se centrifugó el floculado a $10.000 \times g$ durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante libre de floculado y se traspasó a un tubo de microcentrífuga limpio donde se precipitó el ADN plasmídico por el agregado de 0,6 volúmenes de isopropanol y centrifugación a $10.000 \times g$ durante 20 minutos. Se enjuagó el precipitado con etanol 70% , se secó bajo vacío y se resuspendió en $50\mu\text{l}$ de H_2O conteniendo ARNasa (100 ug/ml).

Para verificar la presencia, integridad y orientación de los diferentes insertos en cada estrategia de clonado, se digieron de 2 a $6\mu\text{l}$ de esta solución con las enzimas de restricción apropiadas.

6. Secuenciación de ADN

Se realizó mediante el método de los terminadores de cadena (Sanger, 1977), empleando el kit de secuenciación *fmol Sequencing kit* de PROMEGA.

Cada reacción se realizó a partir de 500 ng de ADN plasmídico de calidad apta para secuenciación, 50 ng de oligonucleótido iniciador y 5 μ Ci de [³⁵S]-dATP, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Los productos de las reacciones de secuenciación se resolvieron en geles de poliacrilamida 6% desnaturalizantes (acrilamida 6%, bisacrilamida 0,3%, urea 42%, TBE 0,5%, persulfato de amonio 0,05% y TEMED 0,005%) de 40 X 35 cm usando un gradiente de *buffer* 0,5-1 x TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1mM). La electroforesis se realizó a una potencia constante de 50 W, y los geles se fijaron en una solución de metanol 5%, ácido acético 5% y secaron bajo vacío a 80°C. Se obtuvieron las autorradiografías exponiendo los geles a películas autorradiográficas X-O-Mat (Kodak) por 24-48 hs a temperatura ambiente.

7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida de concentraciones 10%, 12% y 15%, dependiendo del tamaño de la proteína de interés a ser visualizada. El grado de entrecruzamiento acrilamida:bisacrilamida utilizado fue 29:1. En general se utilizaron minigeles (6 x 9 cm, Miniprotean III, Biorad), los que se corrieron a una corriente constante de 100V en buffer Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25mM pH 8,8, glicina 190mM, SDS 0,1%).

Una vez finalizada la corrida electroforética, se desmontaron los geles y las proteínas se tiñeron con el colorante azul de Coomasie o se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa para experimentos de *Western blot*.

8. Tinción con el colorante azul de Coomasie

Se incubaron los geles en una solución de azul de Coomasie 0,05% (Coomasie Brilliant Blue R250 0,05%, metanol 50%, ácido acético 10%) por 1 a 2h con agitación suave. Se retiró la solución de tinción y se decoloró el exceso de

colorante mediante incubación, con agitación suave, con solución de lavado (metanol 50%, ácido acético 10%) que se reemplazó periódicamente.

9. Identificación de proteínas mediante *Western blot*

9.1 Electrotransferencia

Luego de efectuada la electroforesis, los geles de poliacrilamida se equilibraron durante 2 min con buffer de transferencia (Tris-HCl 25mM pH8,8, glicina 190mM, metanol 20%). Entonces se cortó un rectángulo de nitrocelulosa (S&S BA 0,45µm, Schleicher & Schuell) de tamaño algo mayor que el del gel y se hidrató durante 5 minutos. Se dispuso sobre la cara del cassette de transferencia correspondiente al electrodo negativo (Bio-Rad): una esponja del tipo Scotch Brite (Bio-Rad), un papel de filtro Whatmann 3MM, el gel de poliacrilamida, el filtro de nitrocelulosa, un papel de filtro Whatmann 3MM y una esponja del tipo Scotch Brite. Se montó el cassette dentro de la cuba de transferencia (Bio-Rad), se llenó con buffer de transferencia y se transfirieron las proteínas del gel al filtro de nitrocelulosa aplicando una corriente constante de 200mA a 4°C por 1,5h.

9.2 Detección inmunológica de las proteínas

Luego de la transferencia, los filtros se incubaron toda la noche a 4°C en la solución de bloqueo TBS-Tween-leche 5% (Tris-HCl 50mM pH 7,4, NaCl 150mM, Tween 20 0,005%, leche descremada 5%). Luego del bloqueo, se lavaron con la solución de lavado TBS-Tween (Tris-HCl 50mM pH 7,4, NaCl 150mM, Tween 20 0,005%) y se incubaron con diluciones apropiadas de los anticuerpos específicos (1:500 para el suero de conejo anti-SA11, 1:5000 para el monoclonal anti-V5, Invitrogen) en buffer de dilución TBS-Tween-leche 3% (Tris-HCl 50mM pH 7,4, NaCl 150mM, Tween 20 0,005%, leche descremada 3%). Tras 1,5h de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, se recuperó la dilución del anticuerpo y se lavaron los filtros 3 veces con solución de lavado TBS-Tween por 10 minutos cada vez. Se incubaron entonces con una dilución del segundo anticuerpo apropiado en buffer de dilución (cabra anti-conejo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina 1:6000, AXELL; cabra anti-ratón conjugado con la

enzima fosfatasa alcalina 1:15000, SIGMA). Tras 1,5h de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, se descató la dilución del segundo anticuerpo y se lavaron los filtros 3 veces con solución de lavado por 10 minutos cada vez. Se realizó un último lavado de 10 min con el buffer de revelado de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100mM pH 9,5, NaCl 100mM, MgCl₂ 5mM) y se agregaron 10 ml de solución de revelado (10ml de buffer de revelado, 66µl de Nitro blue tetrazolium (NBT, 50mg/ml en dimetilformamida 70%, Promega) y 33 µl de bromo-cloro-indoil-fosfato (BCIP, 50mg/ml en dimetilformamida 100%, Promega). Se incubó con agitación suave por 3 a 15 minutos con luz tenue, hasta visualizar las bandas de interés. La reacción de revelado se detuvo por lavados con agua y los filtros se secaron al aire y se resguardaron de la luz.

10. Análisis y elección de posibles sitios de inserción en VP6

Mediante la utilización de algoritmos que permiten analizar la hidrofobicidad de una proteína (algoritmo Plot-Kyte-Doolittle) y los sitios expuestos al solvente (Plot-Emini), se seleccionaron cinco posibles sitios de inserción de epitopes foráneos. Ellos corresponden a las posiciones aminoacídicas 14, 101, 146, 235 y 382.

Se seleccionó también la posición Nterm ya que la fusión de este segmento con la secuencia señal de exportación de la proteína hemoaglutinina de influenza no afectó la capacidad de VP6 de formar trímeros (Reddy et al, 1992).

Finalmente, mediante el análisis de la estructura tridimensional de la proteína VP6 de rotavirus en base a datos cristalográficos (Mathieu et al, 2001) se seleccionaron nuevos sitios de inserción correspondientes a zonas denominadas *loops*. Ellos corresponden a las posiciones aminoacídicas: 171, 358 y 301/308. Este último consiste en el reemplazo de los ocho aminoácidos que forman parte de la región más expuesta del *loop* por el epitope foráneo.

11. Oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis de VP6

Se sintetizaron oligonucleótidos que permitieron la inserción de un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción XbaI en la secuencia de VP6, originando así las distintas versiones (VP6₁₄, VP6₁₀₁, VP6₁₄₆, VP6₁₇₁, VP6₂₃₅,

VP6_{301/308}, VP6₃₅₈, VP6₃₈₂). La versión VP6_{Nterm} requirió otra estrategia de clonado que se detalla más adelante.

Los oligonucleótidos diseñados se presentan en la tabla 1

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'
VP6N-for	a <u>acc</u> cggggatgtcctataactctttg
VP6N-rev	aat <u>ctag</u> atcatttaatgagcatgc
14-up	act <u>ctag</u> agacaaaattgtcgaa
14-low	t <u>cttag</u> agtcttaagagtctttga
101-up	tg <u>cttag</u> agaatcaciaaaggaacg
101-low	t <u>cttag</u> acatctcatccatgca
146-up	tt <u>ctaga</u> acagggtttcacttttcat
146-rev	tt <u>ctaga</u> tcttctattttgcaa
171-up	gg <u>cttag</u> acatgataatttgatgggc
171-rev	ttt <u>cttag</u> attgtgatctatttagtgt
235-up	aat <u>cttag</u> agtgatcaattcagct
235-rev	act <u>cttag</u> aaaaactaaacctttc
301 (-)	ttt <u>cttag</u> acatgtttggtggtctcag
308 (+)	c <u>cttag</u> accgaatgcacagccattc
358-up	ttt <u>cttag</u> agtctttccaccaggatg
358-rev	gg <u>cttag</u> aaactggtattgcgtactc
382-up	t <u>atctag</u> acgcgtatttacagtg
382-low	cg <u>cttag</u> aattgtcctccctaga
T3	aattaaccctcactaaaggg
T7	gtaatacgactcactatagggc

Tabla 1: Secuencia (5'® 3') de los oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis de la secuencia codificante para la proteína VP6 de rotavirus. Las bases subrayadas señalan los sitios blancos para las enzimas de restricción XbaI y XmaI.

12. Mutagénesis dirigida por PCR de VP6

Mediante PCR con pares de oligonucleótidos y usando como templado el plásmido pBS-VP6 (que contiene la secuencia codificante para la proteína VP6 de la cepa de referencia SA11, de rotavirus de simio, cedido gentilmente por el Dr. Jorge Blackhall) se amplificaron las diferentes porciones de VP6 mutagenizadas. Las condiciones en las que se realizaron las reacciones de PCR se detallan en la siguiente tabla:

Desnaturalización inicial		5 min, 94°C
30 ciclos	desnaturalización	30 seg, 94°C
	hibridación	30 seg, 52°C
	elongación	1 min, 72°C
Elongación final		5 min, 72°C

En la figura 1 se esquematiza la estrategia seguida en la mutagénesis dirigida por PCR de la secuencia codificante para la proteína VP6 de rotavirus.

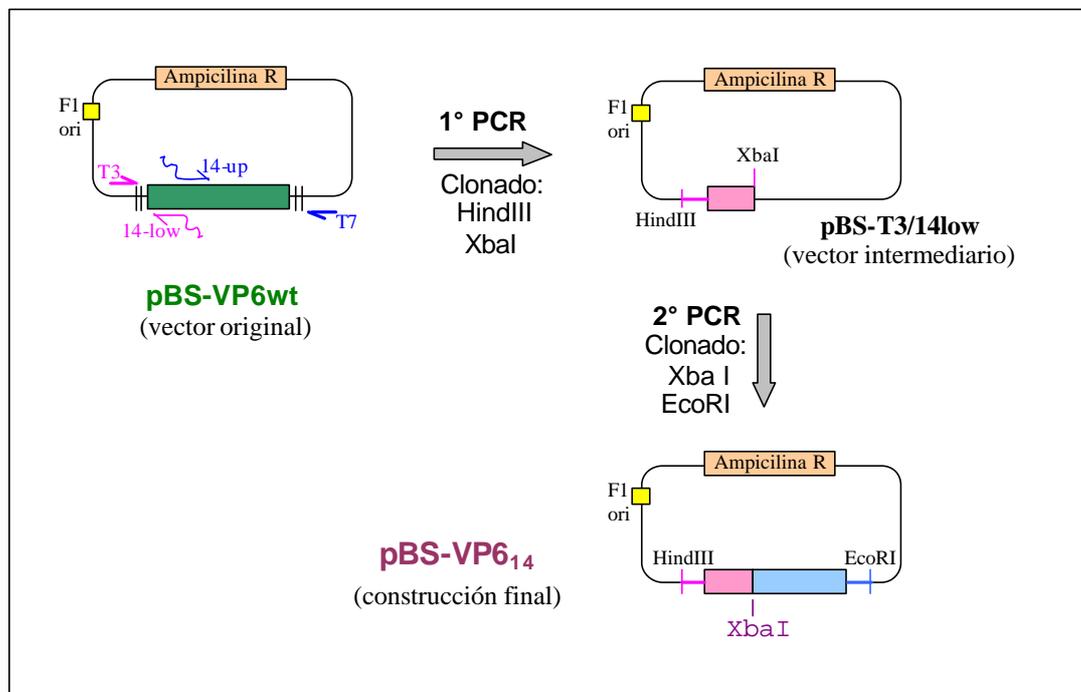


Figura 1: esquematización de la estrategia de mutagénesis dirigida por PCR

El producto de amplificación T3/14low se clonó en el plásmido pBluescribe (pBS) mediante digestión con las enzimas Hind III y XbaI, obteniéndose el vector intermediario pBS-T3/14low. En esta construcción se clonó luego el producto de amplificación 14up/T7 mediante digestión con las enzimas XbaI y EcoRI, dando origen al plásmido final pBS-VP6₁₄ (de esta manera, se cambió la secuencia codificante para la posición aminoacídica 14 por un sitio de reconocimiento para la enzima XbaI).

De idéntica manera se clonaron los diferentes productos de amplificación para obtener los plásmidos pBSVP6₁₀₁, pBSVP6₁₄₆, pBSVP6₁₇₁, pBSVP6₂₃₅, pBSVP6₃₅₈, pBSVP6_{301/308} y pBSVP6₃₈₂.

13. Construcción de las fusiones VP6-V5

13.1 Diseño de oligonucleótidos para la secuencia codificante del epítopo V5

Se sintetizaron dos oligonucleótidos complementarios en 12 bases, codificantes para el epítopo V5 del virus SV5 (paramyxovirus simian virus 5) y otro par de oligonucleótidos para la versión Nterm en cual se le otorga a la secuencia codificante para V5 un triplete iniciador de la traducción (ATG) y la secuencia consenso para una óptima traducción en el sistema baculovirus/células de insecto. Los oligonucleótidos se detallan en la siguiente tabla:

Oligonucleótidos	Secuencia 5'→3'
V5-for	aatctagaggtaagcctatccctaaccctctcctc
V5-rev	aatctagacgtagaatcgagaccgaggagaggggtt
V5N-for	tcccgggagtatggcctaagcctatccctaaccctctcctc
V5N-rev	tcccgggcgtagaatcgagaccgaggagaggggtt

Tabla 2: Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para obtener la secuencia codificante para el epítopo V5 y la versión V5Nterm. Las bases subrayadas señalan los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción XbaI y XmaI. Las letras en color bordó indican el triplete ATG. Las letras en color azul señalan la secuencia consenso para el sistema baculovirus/células de insecto (ANYATGNY).

13.2 Formación del dúplex codificante para el epítopo V5

Se incubaron 2 μ g de los oligonucleótidos V5-for y V5-rev en presencia de 1X *buffer* T7 DNA pol (0,4M Tris-HCl pH8, 1M MgCl₂, 0,1M CaCl, 50nM DTT, 0,5g/ml BSA), en un volumen final de 20 μ l, durante 5min a 70°C y 5min a 40°C.

Los segmentos simple cadena se rellenaron con 10U de la enzima T7 DNA pol (Sequenase) en presencia de 125 μ M de dNTPs por 30 min a 37°C. La enzima se inactivó incubando la reacción 10 min a 70°C y el dúplex se digirió con 20U de la enzima de restricción XbaI por 2h a 37°C en un volumen final de 100 μ l.

Transcurrido este tiempo, se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo y el dúplex se precipitó mediante el agregado de 0,1 volúmenes de acetato de amonio 7,5M y dos volúmenes de EtOH 100%.

Finalmente el dúplex fue resuspendido en 25 μ l de Tris-HCl 10mM pH8.

Con el fin de obtener una fuente constante de la secuencia codificante para el epítopo V5, el dúplex obtenido fue clonado en el vector pUC previamente digerido con la enzima XbaI. Los clones obtenidos, fueron secuenciados para verificar la correcta identidad de la secuencia.

De la misma manera se sintetizó la secuencia codificante para la versión Nterm del epítopo V5, sólo que en este caso se utilizó la enzima de restricción XmaI.

13.3 Clonado de la secuencia sintética V5 en los vectores pBS-VP6_{XbaI}

Se digirieron los distintos vectores pBS-VP6_{XbaI} con la enzima de restricción XbaI, se removieron los grupos 5'fosfato, se separó por electroforesis y se purificó una banda de ADN del peso molecular esperado. Estos vectores y el dúplex sintético codificante para el epítopo V5 preparado y digerido como se describe en el punto anterior se ligaron molecularmente en una relación molar de 1:1 y con 5 μ l de la reacción se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α y se seleccionaron las bacterias transformadas mediante plaqueo en medio LB-agar conteniendo el antibiótico ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml.

13.4 Construcción de la versión VP6-Nterm

Utilizando los oligonucleótidos VP6N-for y VP6N-rev (tabla 1) se amplificó la versión Nterm de VP6 carente del codón de iniciación ATG. Este producto de PCR se ligó con el vector pGEMT-easy (Promega) y se transformaron bacterias DH5 α que fueron plaqueadas en medio LB agarizado en presencia de Ampicilina 100 μ g/ml, IPTG y X-Gal. Se seleccionaron las colonias blancas y se analizó mediante digestión con enzimas de restricción la identidad de las mismas.

Como la secuencia de reconocimiento para la enzima XbaI en esta versión de VP6 resultó ser sensible a metilación, con 1 μ l de ADN del clon pGEMT-VP6N seleccionado se transformaron bacterias *E. coli* dam⁽⁻⁾.

Entonces se digirió el clon pGEMT-VP6N-dam(-) con las enzimas de restricción XbaI y XmaI y el inserto de interés se ligó al vector pVL1393 previamente digerido con las mismas enzimas y removidos los extremos 5'fosfatos, dando origen a la construcción pVL-VP6N.

Por otro lado, se digirió el vector pUC-V5N con la enzima XmaI y se purificó el inserto de 60pb mediante el uso de geles de poliacrilamida. El fragmento así obtenido se ligó al vector pVL-VP6N previamente digerido con la enzima XmaI y removidos los extremos fosfatos. Con 5 μ l de esta ligación se transformaron bacterias DH5 α en medio LB agarizado + ampicilina. Se analizaron varios clones en primer lugar por digestión con enzimas de restricción y posteriormente por secuenciación. Se obtuvo así el vector final pVL-VP6/V5N.

14. Construcción del vector de transferencia

Una vez confirmadas la integridad y orientación de las diferentes construcciones mediante análisis de restricción y secuenciación, las diferentes fusiones VP6-V5 fueron subclonadas en el plásmido de transferencia pVL1393 (PharMingen).

Los vectores pBS-VP6/V5 fueron digeridos con la enzima Sal I durante 2h a 37°C y luego se rellenaron los extremos cohesivos mediante el agregado de 5U de I fragmento Klenow de la enzima ADN polimerasa I de *E. coli* y dNTPs durante 15min a temperatura ambiente. Después de inactivar el fragmento Klenow, se

realizó una segunda digestión con la enzima EcoRI durante 2h a 37°C. Finalmente, se sembró esta digestión en un gel de agarosa 1% y se escindió con un bisturí la banda correspondiente al fragmento VP6/V5.

El vector pVL1393 se digirió con la enzima SmaI durante 2h a 25°C y luego se realizó una segunda digestión con la enzima EcoRI por 2h a 37°C. Durante los últimos 15 min de la segunda digestión, se agregaron 5U de la enzima CIP para desfosforilar los extremos 5'. Finalmente, se sembró en un gel de agarosa 1% y se escindió con un bisturí la banda correspondiente al vector linealizado.

Luego de la purificación de las distintas moléculas de ADN (el vector linealizado y los distintos insertos VP6/V5) se realizaron ligaciones en una relación vector:inserto de 1:3 y se transformaron bacterias DH5 α . Se analizaron varios clones mediante digestión con enzimas de restricción y se confirmó la integridad de la construcción mediante secuenciación.

De esta manera se obtuvieron los vectores finales pVL-VP6/V5. El ADN de los clones seleccionados se purificó utilizando columnas QIAGEN (QIAprep spin miniprep) que aseguran la calidad y cantidad de ADN necesaria para transfectar células y se cuantificó mediante espectrofotómetro (DU-65 Beckman) para su posterior utilización.

15. Producción de baculovirus recombinantes

Se obtuvieron baculovirus recombinantes mediante el método de cotransfección mediada por fosfato de Calcio. Brevemente, se mezclaron 0,5 μ g de ADN viral (BaculoGold™ DNA, PharMingen) con 2,5 μ g de ADN plasmídico de transferencia en un tubo de microcentrífuga. La mezcla se incubó 5 min. a temperatura ambiente, y se agregó 1 ml de *buffer* de transfección B (125 mM Hepes pH 7,1, 125 mM CaCl₂, 140 mM NaCl).

Sobre monocapas de células Sf9 crecidas en frascos de 25 cm² a una densidad de 1 x 10⁶ y a las que se les removió el medio de cultivo, se agregó 1 ml de *buffer* A (medio de cultivo Grace's, GIBCO). Sobre su superficie se agregó gota a gota la mezcla ADN-buffer B. Los frascos se incubaron por 4 hs a 27°C, luego se removió

el medio de transfección y se agregaron 4 ml de medio TNM-FH-10% SFB. Tras 5 días de incubación a 27°C se colectaron los sobrenadantes en forma estéril, se clarificaron por centrifugación a 1000 g a 4°C y se mantuvieron refrigerados hasta su uso.

16. Clonado viral

Se realizó mediante el método de dilución a punto final. Brevemente, se agregaron 100 µl de diluciones desde tal cual a 10⁻⁵ de los sobrenadantes de transfección sobre monocapas de células Sf9 crecidas en placas de 96 pocillos a una densidad de 10⁴ células/pocillo, empleando 12 pocillos por dilución, y dejando de 10 a 11 pocillos sin infectar (control negativo). Tras 5 días de incubación a 27°C, se retiraron los sobrenadantes de cada pocillo y se guardaron a 4° C en placas de 96 pocillos. Sobre 1 pocillo de la placa original se agregaron 50 ng de ADN plasmídico conteniendo el inserto correspondiente (control positivo). Las células adheridas a los pocillos se lisaron agregando 100 µl de NaOH 0,5M por 5 min a temperatura ambiente y se neutralizó agregando 100 µl de acetato de amonio 1,2M. El ADN obtenido se inmovilizó mediante vacío a filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) y se fijó el ADN sobre la nitrocelulosa mediante radiación U.V. 0.12J/cm², luego los filtros se calentaron por 2 hs a 80°C bajo vacío.

17. Dot-blot de ADN

17.1 Prehibridación

Se prehibridaron los filtros de nitrocelulosa con 10 ml de buffer de prehibridación (formamida deionizada 50%, solución DENHARTS 5X, *buffer* SSC 5X, ADN de esperma de salmón 500µg/ml) por 3h a 42°C con agitación rotatoria.

17.2 Marcación de la sonda radioactiva

Se utilizó el kit "RadPrime DNA Labelling System" (Gibco). Brevemente, se

utilizaron 50ng de ADN previamente desnaturalizado a 100°C durante 5 minutos al que se le agregó el *buffer* de reacción (Tris-HCl 125mM pH6,8, MgCl₂ 12,5mM, *random octamers* 150µg/ml), dATP, dGTP, dTTP, 5U de la enzima Klenow y H₂O hasta un volumen final de 25µl. Se agregaron luego el isótopo (α -³²P)dCTP y se incubó la reacción a 37°C durante 30min. Luego se agregó 5µl de solución de frenado (EDTA 0,5M pH 8) y 30µl de NaOH 0,5N para desnaturalizar la sonda ya marcada.

17.3 Hibridación

Se mezcló la sonda marcada y desnaturalizada con 10 ml de buffer de hibridación (formamida 50%, solución DENHARTS 1X, buffer SSC 5X, ADN de esperma de salmón 100µg/ml) y esta mezcla se agregó sobre los filtros de nitrocelulosa. De esta manera, quedaron toda la noche a 42°C con agitación rotatoria.

17.4 Revelado

Se lavaron los filtros tres veces con 2X SSC-0,1% SDS a temperatura ambiente, tres veces a 65°C con la misma solución y se expusieron por 5 a 16 h a -70°C a películas autorradiográficas X-O-Mat (Kodak) con pantalla intensificadora.

18. Amplificación de *stocks* virales

Se infectaron 1 x 10⁶ células Sf9 crecidas en frascos de 25 cm² con 100 µl de los sobrenadantes de transfección. Luego de 1 h de adsorción, se agregaron 4 ml de medio de cultivo TNM-FH 10%SFB y se incubaron las células por 5 días a 27°C.

Con 100 µl del sobrenadante, se realizó una segunda infección, incubando 5 días a 27°C. Los sobrenadantes de esta última infección se colectaron de forma estéril, se clarificaron por centrifugación a 1000 X g a 4°C y se mantuvieron refrigerados hasta su uso.

19. Titulación de *stocks* virales

Se infectaron monocapas de células Sf9 crecidas en placas de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo con 0,5 ml de diluciones seriadas de *stocks* virales en medio de cultivo. Tras 1 h. de adsorción, se agregaron 3 ml por pocillo de un *overlay* formado por medio de cultivo + 10% SFB + 0,5% agarosa SeaKem (FMC) y se incubaron las células por 5 días a 27°C. Sobre la primera capa de medio con agar se agregaron 3 ml de medio con agar conteniendo el colorante vital rojo neutro a una concentración final de 50 µg/ml. Tras dos días de incubación a 27°C, se contaron las placas de lisis y se calculó el título viral, expresado en unidades formadoras de placa por unidad de volumen de stock viral (ufp/ml).

20. Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes

Se ensayó la expresión de las distintas versiones de VP6-V5 en el citoplasma de células Sf9 infectadas y en el sobrenadante de infección. Para esto, se infectaron monocapas de células Sf9 con los distintos baculovirus recombinantes a una multiplicidad de infección (moi) de 10, y tras 5 días de incubación a 27°C se cosecharon los sobrenadantes y las células se despegaron por suaves golpes, se lavaron en *buffer* PBS frío (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 6,2) y se extrajeron las proteínas mediante la utilización del solvente Vertrel (1,1,1,2,3,4,4,5,5,5-Decafluoropentane, Fluka).

Tras una clarificación de 10 min a 5000 x g se mezclaron 50 µl de cada muestra (extractos celulares y proteínas presentes en el sobrenadante de infección) con 50 µl de *buffer* de siembra 2 x (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,02%, β-mercaptoetanol 1,8%, glicerol 20%). Se hirvió por 5 min y con 20 µl se sembraron geles de poliacrilamida (12%). Las proteínas resueltas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se detectaron las proteínas de interés mediante experimentos de *Western blot* con un anticuerpo monoclonal anti-V5 y con un suero policlonal anti-rotavirus SA11 y un segundo anticuerpo conjugado con la enzima fosfasa alcalina.

21. Caracterización de la quimera 14/V5

Se utilizó como antígeno en un ensayo de *Western blot*, un extracto proteico de células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante para la quimera 14/V5. La membrana de nitrocelulosa se cortó en varias tiras y con cada una se evaluó la reactividad de esta versión a distintos sueros policlonales anti-rotavirus: suero de conejo anti-rotavirus cepa NCVD, suero de caballo anti-rotavirus cepa H2 (naturalmente infectado), suero de cobayo anti-rotavirus cepa INDIANA, todos en una dilución 1:1000. Se utilizaron como segundos anticuerpos sueros de cabra anti-especie conjugados con la enzima peroxidasa y se reveló la reacción mediante el agregado del sustrato 4-cloronaftol.

22. Evaluación de la capacidad de las proteínas quiméricas VP6-V5 de formar trímeros

Los extractos proteicos de las células Sf9 infectadas con los distintos baculovirus recombinantes, obtenidos mediante el solvente Vertrel, fueron mezclados en una relación 1:1 con un *buffer* de siembra que no contiene β -mercaptoetanol. Estas muestras fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos y de esta manera fueron sembradas en geles de poliacrilamida 10% en condiciones no reductoras. Las proteínas resueltas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se detectó el estado de agregación de las proteínas de interés (monómeros o trímeros) por estimación de su peso molecular aparente mediante experimentos de *Western blot* con un anticuerpo monoclonal anti-V5 y con un suero policlonal anti-rotavirus y un segundo anticuerpo conjugado con la enzima fosfasa alcalina. Como sustrato de ésta enzima se utilizó NBT/BCIP (Promega).

23. Evaluación de la capacidad de las proteínas recombinantes para formar VLPs

El protocolo se puso a punto coinfectando $2,5 \times 10^7$ células Sf9 crecidas en forma de monocapa con los baculovirus recombinantes AcVP6_{SA11wt} y AcVP2_{SA11wt},

con una multiplicidad de infección igual a 2,5 y 8 respectivamente. En el caso de las quimeras VP6/V5, se co-infectaron 5×10^7 células Sf9 utilizando una moi igual a 5 para cada uno de los baculovirus quiméricos y una moi igual a 8 para el baculovirus AcVP2_{SA11}wt. Tras 5 días de incubación a 27°C se cosecharon los sobrenadantes de infección y se clarificaron por centrifugación a baja velocidad (3.000g durante 20 minutos).

Las VLPs se sedimentaron por ultracentrifugación en colchón de sacarosa 35% p/p en *buffer* TNMC (Tris-HCl 10mM pH 7, NaCl 150mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 10mM), ultracentrífuga KONTRON rotor TFT 45-94, 24.000rpm durante 90 min.

El *pellet* se resuspendió en *buffer* TNMC pH:7 y se sembró sobre una solución de CsCl en TNMC con una densidad de 1,32 g/ml. Este gradiente se ultracentrifugó a 39.000rpm durante 18 h (rotor TST 60.4, KONTRON). El gradiente de desarmó con la utilización de una bomba peristáltica a una velocidad de 0,4ml/min. Cada fracción fue dializada contra 1L de *buffer* TNMC pH:7 durante toda la noche a 4°C en agitación constante y luego concentrada por ultracentrifugación (rotor TST 41.14 Kontron, 24.000rpm durante 90 min). Las fracciones concentradas de esta manera se analizaron mediante ensayos de *Western blot* y se identificó la fracción reactiva para las proteínas VP2 y VP6.

Finalmente, las muestras positivas fueron analizadas por microscopía electrónica.

24. Microscopía electrónica

Las VLPs obtenidas en las fracciones del gradiente de CsCl se analizaron sobre grillas de cobre de 200 *mesh* cubiertas con *formvar*. Las muestras fueron adsorbidas a las grillas por contacto durante 5 minutos; luego se procedió a la tinción con acetato de uranilo al 2% durante 30 segundos. La potencia utilizada en el microscopio electrónico (JEOL modelo SVC) fue de 80kV y el aumento utilizado fue de X50K.

25. Ensayo de inmunización con las quimeras VP6-V5 en su forma monómerica

25.1 Obtención del antígeno

Se resolvieron extractos de células Sf9 infectadas con los baculovirus recombinantes para las quimeras VP6/V5 fueron resueltos en geles de poliacrilamida 12% y se tiñeron con el colorante azul de Coomasie hasta visualizar la banda correspondiente a la proteína recombinante. La misma se escindió del gel con un bisturí y se electroeluyó en 2ml de buffer Tri-Glicina-SDS en membranas de diálisis (Spectra/Por). La proteína así recuperada se conservó a – 20°C hasta su uso.

Con una alícuota de las proteínas electroeluidas se realizó una cuantificación en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomasie junto con una curva patrón de BSA (desde 1g hasta 300ng por calle). Se estimó la cantidad de proteína en cada muestra mediante la utilización de un programa de análisis de intensidad de bandas (NIH para Macintosh).

Con la misma alícuota se sembró un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes. Luego de transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa se realizó un ensayo de *Western blot* para verificar el estado de agregación de las proteínas electroeluidas.

25.2 Inmunización de ratones

Se realizaron formulaciones oleosas (agua en aceite) en adyuvante incompleto de Freund con las distintas quimeras VP6/V5 y la versión VP6_{SA11}wt. Se inmunizaron ratones hembra BalbC de 2 meses de edad por vía intraperitoneal con 5µg de proteína por ratón. A los 30 días de la primera inmunización se administró una dosis refuerzo de igual carga antigénica.

25.3 Efecto de anticuerpos pre-existentes contra la proteína *carrier*

Los animales involucrados en esta experiencia fueron divididos en dos grupos. Uno de ellos fue inmunizado con una formulación de rotavirus bovino cepa NCDV

y el otro grupo recibió una inoculación con proteína VP6_{SA11}wt purificada. A los 21 días se tomaron muestras de suero y se evaluó la presencia de anticuerpos anti-VP6 mediante un ensayo de ELISA.

Una vez confirmada la existencia de una respuesta humoral contra la proteína *carrier* en todos los ratones, se realizó una segunda inmunización con 5µg de proteína quimérica VP6/V5 (desnaturalizada y purificada). A los 21 días se tomaron muestras de suero para evaluar la respuesta contra el epítopo V5.

26. Ensayo de inmunización con VLPs

Se vacunaron ratones hembra de la cepa BalbC con 30ng de proteína quimérica obtenida por ultracentrifugación a través de colchón de sacarosa 30% p/p, administrado por vía i.p. en una formulación oleosa (adyuvante incompleto de Freund). Los animales recibieron una dosis refuerzo a los 21 días de igual carga antigénica.

27. Evaluación de la respuesta inmune inducida

A distintos tiempos, se recolectaron muestras de sangre (procedente de las venas radiales de la cola del ratón) en tubos con heparina. Se separó el plasma por centrifugación a 4.000 rpm por 10 min y se determinaron los niveles de anticuerpos anti-V5 mediante ensayos de ELISA.

28. Ensayo de ELISA para detectar anticuerpos anti-epítopoV5

28.1 Expresión y Producción de la proteína CAT-V5

Para evaluar la respuesta inmune humoral inducida por la inmunización con las quimeras VP6/V5, fue necesario contar con un antígeno no relacionado que expresara también el epítopo V5.

Utilizando como templado el vector pIB/V5-CAT-His (Invitrogen) se amplificó por PCR la región codificante para la enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT) fusionada transcripcionalmente al epítopo V5 y a un tag de 6 histidinas. Se utilizaron los oligonucleótidos comerciales OpIE2-forward y OpIE2-reverse (Invitrogen).

El producto de amplificación de 987pb denominado CAT/V5-His se purificó mediante escisión de un gel de agarosa y se ligó al vector TOPO-2.1 (Invitrogen). Con esta ligación se transformaron bacterias DH5 α que se plaquearon en medio LB agarizado en presencia de ampicilina + IPTG + X-Gal. Se seleccionaron las colonias blancas y se analizó la presencia del fragmento CTA-V5-His por digestión con enzimas de restricción.

El clon seleccionado fue digerido con la enzima SmaI, se purificó el inserto mediante la escisión de un gel de agarosa y se ligó al vector pRSET-B previamente digerido con SmaI y removidos los extremos 5'fosfatos. Con esta ligación se transformaron nuevamente bacterias DH5 α que se plaquearon en medio LB agarizado + ampicilina. Se seleccionaron varias colonias que fueron analizadas mediante digestión con la enzima de restricción EcoRI para identificar los clones que poseían el inserto en la orientación correcta.

Se seleccionó un clon pRSET-CAT/V5 con el cual se transformaron bacterias *Escherichia coli* BL21 para analizar la expresión de la proteína de interés.

Como control, se transformaron bacterias BL21 con un clon pRSET-CAT/V5 que poseía el inserto en orientación invertida.

28.2 Expresión de los clones pRSET-CAT/V5

A partir de 5ml de cultivo de bacterias BL21 (clones pRSET-CAT/V5 con el inserto en la orientación correcta) crecidas hasta una densidad óptica (O.D. _{600nm}) de 0,5 se incubaron durante 2 horas a 37°C con agitación constante en presencia del inductor IPTG a una concentración final de 1mM. El control sin inducir fue incubado el mismo tiempo que el cultivo inducido.

De igual manera se trabajó con el control negativo de expresión (clon pRSET-CAT/V5 con el inserto en orientación invertida).

Tras 2hs de inducción, las bacterias se concentraron mediante centrifugación a 10.000 x g durante 5 min. El *pellet* fue resuspendido en 200µl de *cracking buffer*. Los extractos proteicos así obtenidos fueron resueltos en geles de pliacrilamida 15% y analizados mediante ensayos de *Western blot* utilizando distintos anticuerpos para evaluar la expresión de la proteína recombinante CAT/V5. Se utilizaron un monoclonal anti-V5, un monoclonal anti-His y un suero de conejo anti-CAT.

Mediante comparación visual de las intensidades de las bandas reactivas se seleccionó el clon de mayor expresión.

28.3 Producción y purificación del antígeno CAT-V5

100ml de cultivo de bacterias BL21/pRSET-CAT/V5 crecidas hasta una densidad óptica (O.D. _{600nm}) de 0.5, se incubaron durante 2 horas a 37°C con agitación constante en presencia del inductor IPTG a concentración final de 1mM.

Finalizadas las 2hs de inducción, las bacterias se concentraron mediante centrifugación a 5.000 x g durante 20 min. El *pellet* fue resuspendido en 8ml de *buffer* de lisis desnaturizante (NaH₂PO₄ 100mM, Tris-HCl 10mM, cloruro de guanidinio 6M, pH8) en agitación constante durante 30 min a temperatura ambiente. Se sonicó la muestra con cinco pulsos de intensidad media y se agregó 8ml de *buffer* de pegado desnaturizante (NaH₂PO₄ 100mM, Tris-HCl 10mM, Urea 8M, pH8) mezclando durante otros 30 min.

Se agregaron al extracto proteico 2ml de resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) previamente equilibrada con *buffer* de pegado desnaturizante y se mezcló con agitación constante durante 1h a temperatura ambiente. Luego se empaquetó la muestra en una columna cromatográfica (Biorad) y se recolectó el percolado. Se realizaron 4 lavados de 3ml c/u con *denaturing binding buffer* pH8 y 4 lavados de 3ml c/u con *buffer* de lavado desnaturizante pH6,3 (NaH₂PO₄ 100mM, Tris-HCl 10mM, Urea 8M, pH6,3). Finalmente, se realizaron 5 eluciones de 1ml cada una, con *buffer* de elución pH4,5 (NaH₂PO₄ 100mM, Tris-HCl 10mM, Urea 8M, pH 4,5). Se sembraron muestras de cada uno de los eluidos en un gel de poliacrilmida y se analizó mediante un ensayo de *Western blot* en qué fracción eluye la proteína

CAT/V5 y mediante tinción con azul de Coomasie el grado de pureza de esa fracción.

28.4 Puesta a punto del ensayo de ELISA

Se realizaron ensayos para poner a punto las condiciones del ELISA teniendo en cuenta concentración del antígeno en placa, bloqueo de los sitios inespecíficos, dilución del suero control positivo, dilución del anticuerpo conjugado con peroxidasa y tiempo de lectura de la reacción sustrato-peroxidasa.

Finalmente, el ensayo se estableció de la siguiente manera:

Se sensibilizaron placas de poliestireno (NUNC Maxisorp) con una dilución 1:200 del *stock* del antígeno CAT/V5 (la concentración del *stock* es 300ng/ μ l) en *buffer* carbonato/bicarbonato (Na_2CO_3 15mM, NaHCO_3 35mM, pH 9,6) 50 μ l por pocillo.

Luego de la adsorción a 4°C durante toda la noche, las placas se lavaron una vez con solución de lavado (PBS 1X, 0,05%Tween20), se agregaron 80 μ l por pocillo de *buffer* de bloqueo [PBS 1X, 0,05%Tween20, 5% de suero normal equino (SNE) y 4% de leche descremada] y se incubaron con agitación constante durante 1h a 37°C.

Finalizado el bloqueo, se lavaron las placas una vez con la solución de lavado y se agregaron 50 μ l por pocillo de las diluciones de los sueros incógnitas, realizadas en *buffer* de dilución (PBS 1x, 0,05%Tween20, 5% SNE), desde 1:50 hasta 1:52.000, sembradas por duplicado.

Las diluciones de los sueros se incubaron en agitación constante durante 1h a 37°C. Luego, las placas se lavaron 5 veces con solución de lavado y se incubaron con un segundo anticuerpo (cabra anti-ratón conjugado con la enzima peroxidasa) diluído 1:2.000 en *buffer* de dilución, 50 μ l por pocillo, durante 1h a 37°C.

Finalmente se lavaron las placas exhaustivamente y se reveló la reacción mediante el agregado del cromógeno ABTS [2,2'-Azino-bis(3-etilbentiazolina-6-ácido sulfónico)] y H_2O_2 como sustrato en *buffer* citrato de sodio (ácido cítrico 46mM, pH 5). Luego de incubar la reacción durante 20 minutos a 37°C en oscuridad, se midió la absorbancia a 405nm.

Se determinó el título de anticuerpos anti-epitopeV5 en los sueros incógnita, considerando como positiva aquella dilución que supera el valor promedio de los sueros control negativo más dos desvíos estándar ($X_{neg} + 2s$).

29. ELISA para detectar anticuerpos anti-VP6

Se sensibilizaron placas de poliestireno (NUNC Maxisorp) de 96 pocillos con una dilución 1:2000 de un suero de conejo anti-rotavirus cepa NCDV, en *buffer* carbonato/bicarbonato pH9,6, 50µl por pocillo.

Luego de la adsorción a 4°C durante toda la noche, las placas se lavaron una vez con solución de lavado (PBS 1X, 0,05%Tween20), se agregaron 80µl por pocillo de *buffer* de bloqueo [PBS 1X, 0,05%Tween20, 5% de suero normal equino (SNE), 5% de suero normal de conejo (SNC) y 4% de leche descremada] y se incubaron con agitación constante durante 1h a 37°C.

Finalizado el bloqueo, se lavaron las placas una vez con la solución de lavado y se agregó el antígeno, una dilución de rotavirus cepa NCDV en *buffer* de dilución (PBS 1x, 0,05%Tween20, 5% SNE), 50µl por pocillo, durante 1h a 37°C.

Luego se realizaron tres lavados y se agragaron 50µl por pocillo de las diluciones de los sueros incógnitas, realizadas en *buffer* de dilución, sembradas por duplicado.

Las diluciones de los sueros se incubaron en agitación constante durante 1h a 37°C. Luego las placas se lavaron 5 veces con solución de lavado y se incubaron con un segundo anticuerpo (cabra anti-ratón conjugado con la enzima peroxidasa) diluído 1:2.000 en *buffer* de dilución, 50µl por pocillo, durante 1h a 37°C.

Finalmente se lavaron las placas exhaustivamente y se reveló la reacción mediante el agregado del cromógeno ABTS y H₂O₂ como sustrato en *buffer* citrato de sodio pH 5. Luego de incubar la reacción durante 20 minutos a 37°C en oscuridad, se midió la absorbancia a 405nm.

Se determinó como punto de corte, el promedio de los sueros controles (pre-inmunes) mas dos desvíos estandar ($X_{neg} + 2s$).

30. Caracterización de la accesibilidad del epítopo V5 en los diferentes multímeros mediante ensayos de ELISA

Se sensibilizaron placas de poliestireno (NUNC Maxisorp) de 96 pocillos con una dilución 1:2000 de un suero de conejo anti-rotavirus cepa SA11, en *buffer* carbonato/bicarbonato pH 9.6, 50µl por pocillo.

Luego de la adsorción a 4°C durante toda la noche, las placas se lavaron una vez con solución de lavado (PBS 1X, 0,05%Tween20), se agregaron 80µl por pocillo de *buffer* de bloqueo (PBS 1X, 0,05%Tween20, 5% SNE, 5% SNC y 4% de leche descremada) y se incubaron con agitación constante durante 1h a 37°C.

Finalizado el bloqueo, se lavaron las placas una vez con la solución de lavado y se agregó el antígeno (multímeros mixtos VP6/V5 + VP2) correspondiente a una fracción del *pellet* obtenido tras la ultracentrifugación sobre colchón de sacarosa, diluido en *buffer* TNMC pH:7 (50µl por pocillo) durante 1,30 h a 37°C.

Luego se realizaron tres lavados. Cada antígeno se evaluó en paralelo frente a tres sueros de referencia. Se agregaron 50µl por pocillo de los sueros: a) *pool* de sueros normales de ratón, b) suero monoclonal anti-epítopo V5 y c) *pool* de sueros de ratón anti-rotavirus, realizadas en *buffer* de dilución, sembradas por duplicado.

Las diluciones de los sueros se incubaron en agitación constante durante 1,30h a 37°C. Luego las placas se lavaron 5 veces con solución de lavado y se incubaron con un segundo anticuerpo (cabra anti-ratón conjugado con la enzima peroxidasa) diluido 1:2.000 en *buffer* de dilución, 50µl por pocillo, durante 1h a 37°C.

Finalmente se lavaron las placas exhaustivamente y se reveló la reacción mediante el agregado del cromógeno ABTS y H₂O₂ como sustrato de la enzima, en *buffer* citrato de sodio pH 5. Luego de incubar la reacción durante 20 minutos a 37°C en oscuridad, se midió la absorbancia a 405nm.

Se consideró reacción positiva si la D.O. alcanzada por el suero supera el promedio de D.O. del pool de SNR más dos desvíos estándar ($X_{neg} + 2\sigma$).

31. Análisis estadísticos

Los títulos de anticuerpos obtenidos en los ensayos de ELISA fueron sometidos a análisis estadístico con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre los distintos grupos. Una vez confirmados los supuestos de normalidad y homocedacia, los datos se analizaron mediante la utilización del programa Statistix versión 0.7. Se realizaron ANOVAs de un factor y análisis de medias por el método de Bonferroni.

32. Análisis *in silico* de estructura de proteínas

La estructura terciaria de la proteína VP6 se obtuvo en base a los datos cristalográficos publicados (Mathieu et al., 2001) y la utilización del programa *spdbv* (Swiss-PdbViewer, versión 3.7). La estructura terciaria de las quimeras VP6/V5 es una predicción del programa *spdbv* en base a la secuencia aminoacídica de la proteína recombinante, comparándola con la secuencia depositada en el banco de datos.

1. Análisis y elección de sitios de inserción de secuencias heterólogas en la proteína VP6 de rotavirus

Mediante la utilización de algoritmos que permiten analizar la hidrofiliidad, antigenicidad y los sitios expuestos al solvente de una proteína, se seleccionaron cuatro posibles sitios de inserción de epitopes foráneos, que corresponden a las posiciones aminoacídicas 14, 101, 235 y 382 de la proteína VP6 por poseer altos índices de hidrofiliidad, exposición al solvente o de antigenicidad (Figura 1).

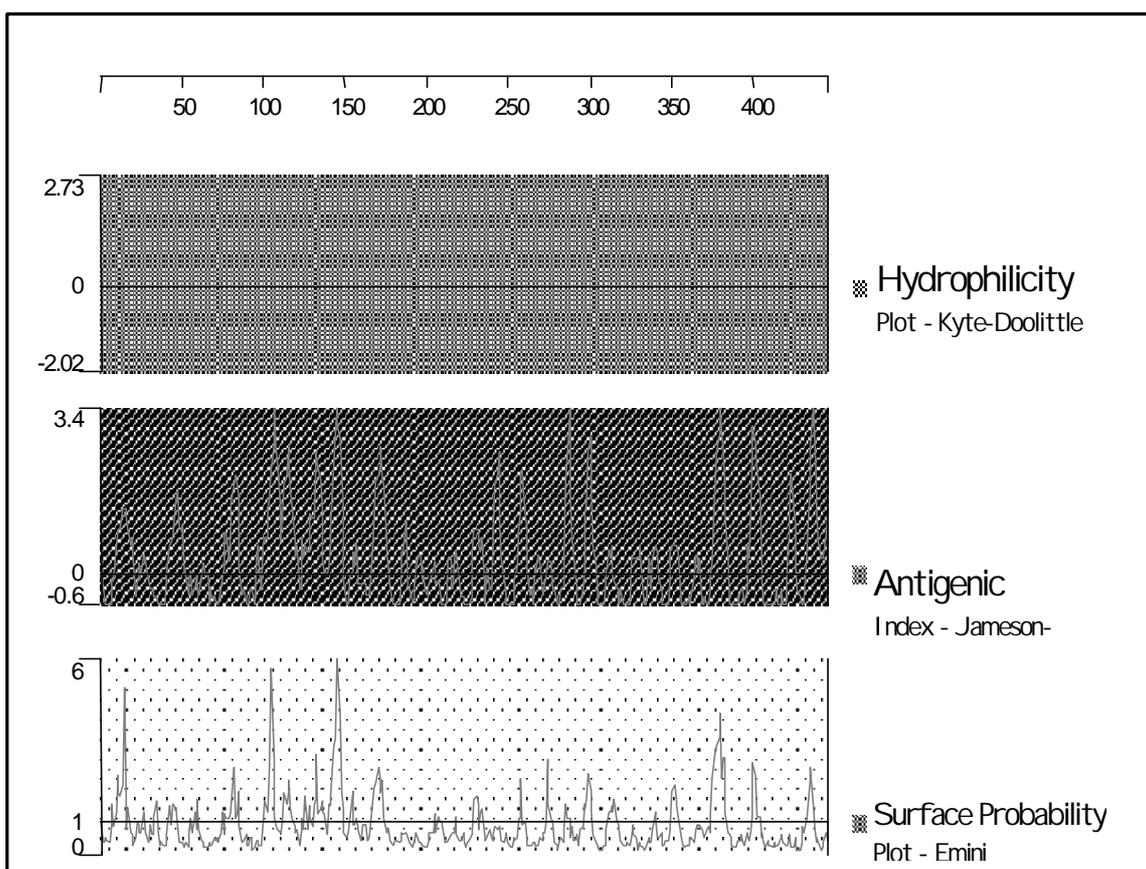


Figura 1: Perfiles de hidrofiliidad y sitios expuestos al solvente de la proteína VP6 de rotavirus. A la derecha de cada gráfico se indica los algoritmos utilizados para la predicción de los sitios hidrofílicos o expuestos al solvente de la proteína VP6.

Se seleccionó además la posición aminoacídica amino-terminal, ya que por resultados previos publicados, se sabe que la manipulación de este dominio de la proteína no afecta la capacidad de formar trímeros ni la antigenicidad de VP6 (Reddy et al, 1992).

Con la cristalización de la proteína VP6 (Petitpas *et al.*, 1998) se realizaron los primeros análisis de difracción de rayos X, que llevaron a determinar en el año 2001 la estructura atómica de esta proteína (Mathieu *et al.*, 2001). Con esta información y el análisis bioinformático con el programa *spdbv* se representó la estructura terciaria de VP6 en el espacio, lo que permitió seleccionar tres sitios adicionales de inserción de secuencias heterólogas correspondientes a zonas denominadas *loops* o lazos (Figura 2). Estas son las posiciones aminoacídicas 171, 358 y 301/308. Esta última consiste en el reemplazo de los 8 aa del loop 301/308 por la secuencia codificante para el epítipo heterólogo.

Los aminoácidos 32, 65 y 70 se mantuvieron intactos (Figura 4) ya que mediante análisis por sustitución aminoacídica de la proteína VP6 se determinaron que los mismos están involucrados en la interacción de VP6 con la proteína VP2 (Charpilliene *et al.*, 2002).

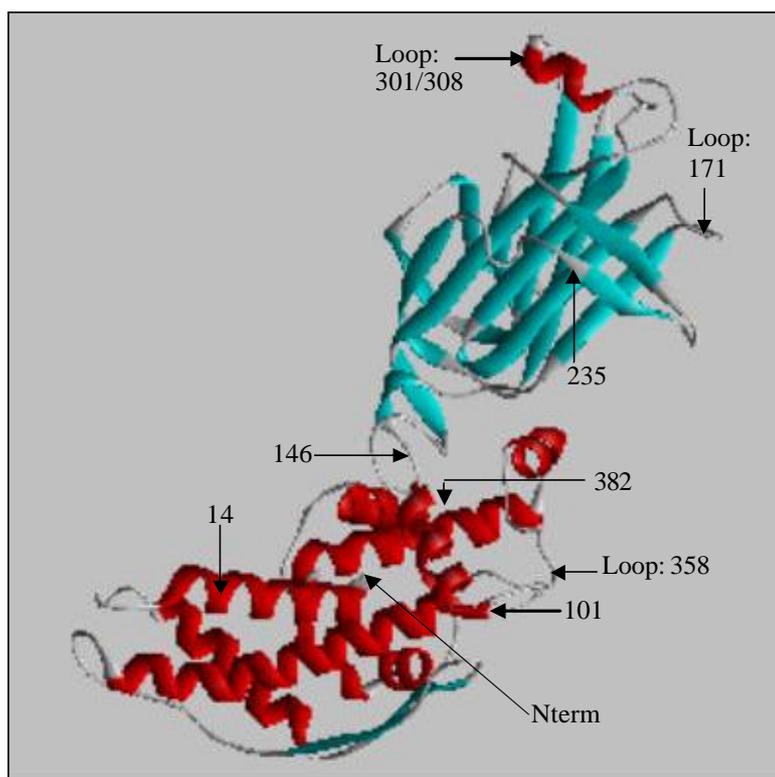


Figura 2: estructura tridimensional de la proteína VP6 de rotavirus cepa SA11. Análisis realizado con el programa *spdbv* en base a los datos cristalógraficos (Mathieu *et al.*, 2001). Los números señalan las posiciones aminoacídicas seleccionadas para producir la inserción del epítipo foráneo V5.

Con el fin de determinar si la inserción de una secuencia heteróloga como el péptido V5 (formado por 14 aminoácidos) altera de una manera drástica la estructura terciaria de la proteína VP6, se analizó la secuencia aminoacídica resultante en las distintas fusiones VP6/V5 mediante la utilización del programa *spdbv* (Figura 3).

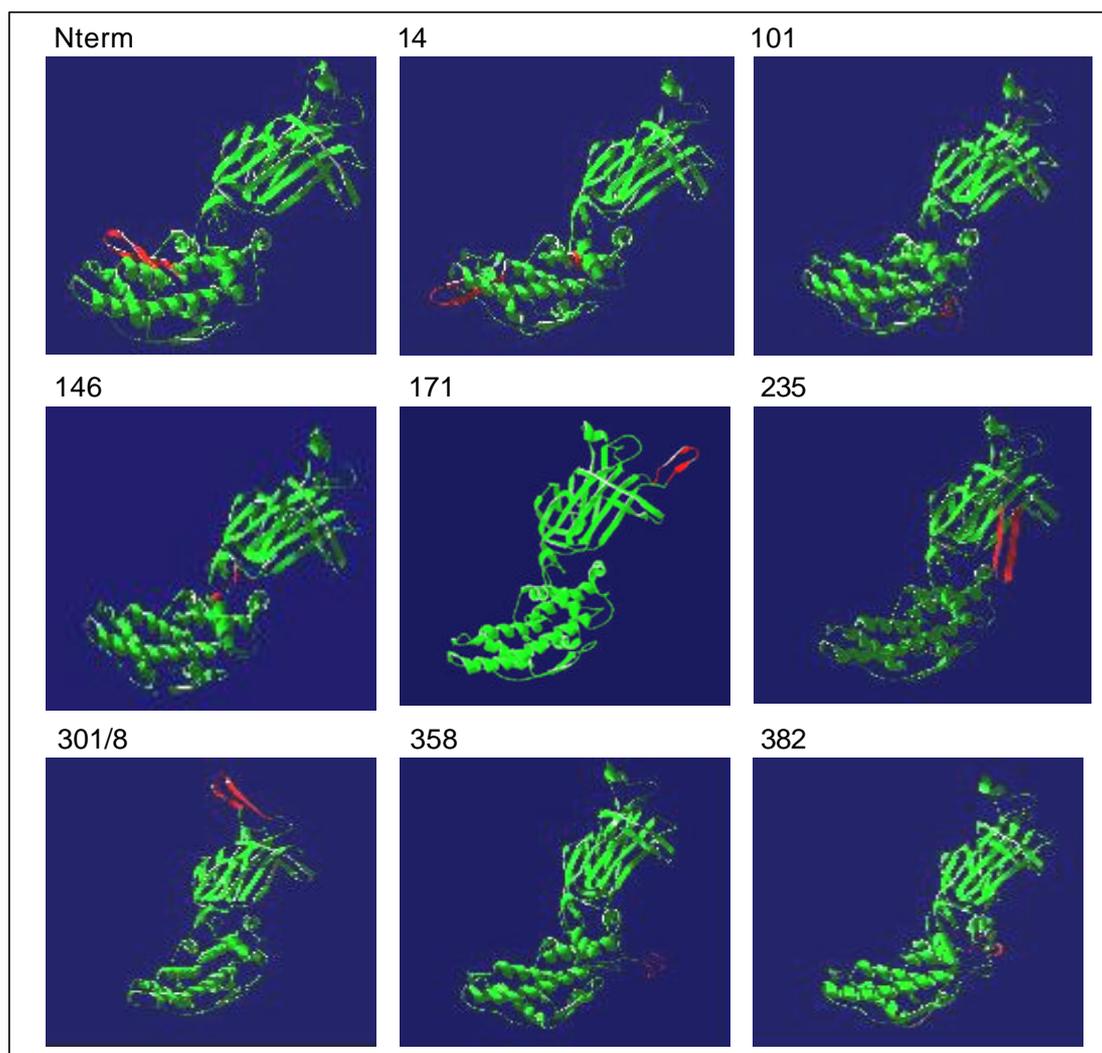


Figura 3. Análisis predictivo de la estructura terciaria de las distintas quimeras VP6/V5. En verde se muestra la proteína VP6 y en rojo se marca los aminoácidos correspondientes al péptido heterólogo V5.

Como se puede apreciar en la Figura 3, el análisis informático predice que la inserción del péptido V5 en las posiciones aminoacídicas seleccionadas de la proteína VP6 no altera su estructura terciaria.

2. Construcción de baculovirus recombinantes para distintas versiones de VP6/V5

2.a) Mutagénesis dirigida por PCR y clonado en el vector intermediario pBS

Con el objeto de generar versiones de VP6 que faciliten la inserción de secuencias heterólogas en distintas posiciones aminoacídicas, se empleó la técnica de mutagénesis dirigida por PCR para introducir sitios de reconocimiento para la enzima XbaI. Una vez seleccionadas las regiones adecuadas, la posición exacta a mutar fue elegida de manera tal de cambiar la menor cantidad posible de aminoácidos en la secuencia primaria de VP6, cuando el sitio XbaI es introducido. Así, en la posición 14 se cambia un aminoácido (A_{14} por S_{14}), mientras que en la posición 146 se cambian dos aminoácidos ($I_{146}E_{147}$ por $S_{146}R_{147}$) (Figura 4).

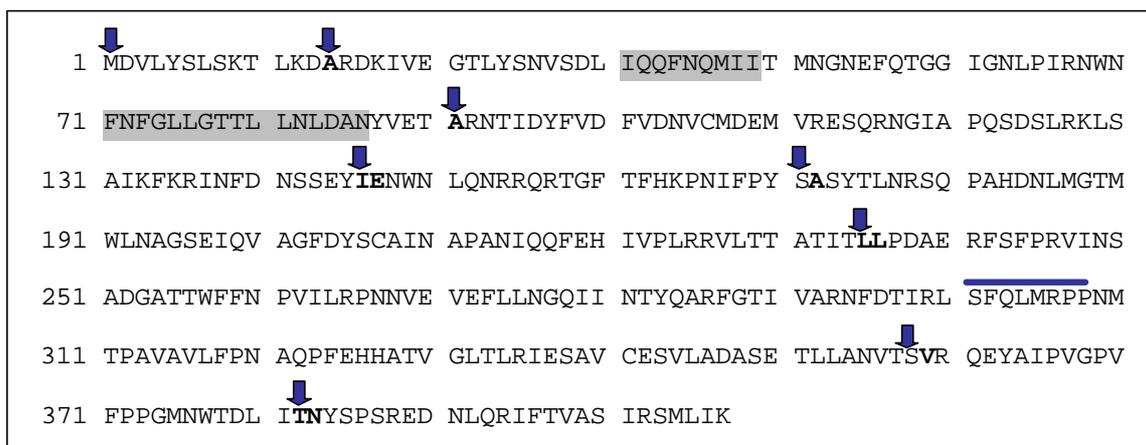


Figura 4: Posiciones de las mutaciones sitio dirigidas en la secuencia de VP6. Las posiciones Nterm, 14, 101, 146, 171, 235, 358 y 382 corresponden a inserciones (flechas), mientras que la posición 301 a 308 corresponde a un reemplazo aminoacídico (barra horizontal). Los dominios involucrados en la interacción VP6-VP2 están marcados en gris. En negrita se señalan los aminoácidos que son reemplazados al introducir la secuencia para la enzima de restricción Xba I.

Mediante PCR con los pares de oligonucleótidos adecuados y usando como templado el plásmido pBS-VP6 (que contiene la secuencia codificante para la proteína VP6 de la cepa SA11 de rotavirus de simio, cedido gentilmente por el Dr.

J. Blackhall) se amplificaron las diferentes porciones mutagenizadas de VP6 siguiendo la estrategia que se detalla en la Figura 5.

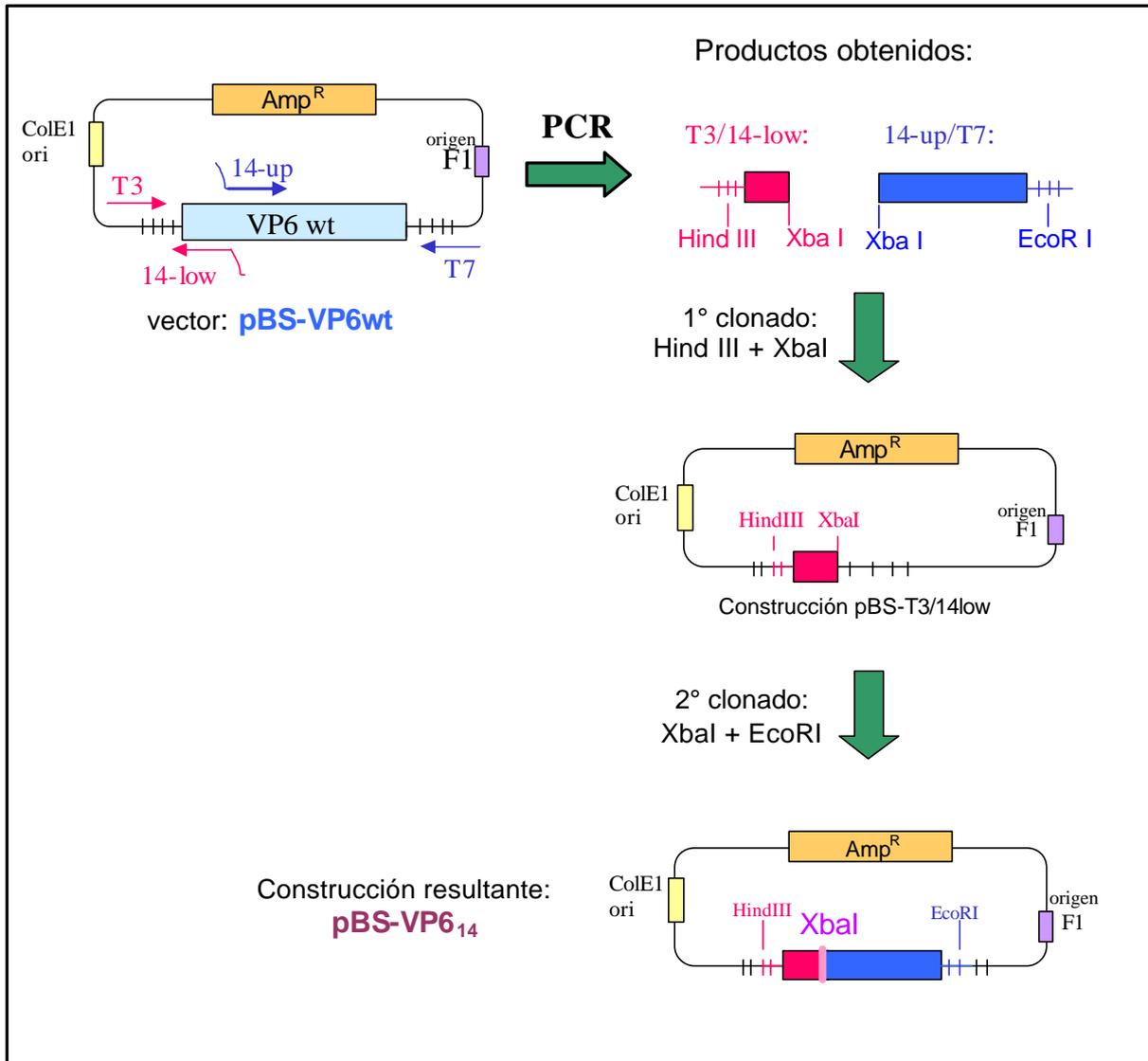


Figura 5: esquema de la estrategia utilizada para mutagenizar la proteína VP6 por PCR y clonado posterior de los productos amplificados en el vector pBS. El producto de amplificación T3/14low se clonó en el vector pBluescribe mediante digestión con las enzimas HindIII y XbaI, dando origen a la construcción pBS-T3/14Low. Subsecuentemente se clonó el producto de amplificación 14up/T7 mediante digestión con las enzimas XbaI y EcoRI dando origen a la construcción pBS-VP6₁₄.

Como se detalla en la Figura 5, el producto de amplificación T3/14low se clonó en el plásmido pBluescribe (pBS), en el que subsiguientemente se clonó el producto de amplificación 14up/T7, para dar origen al plásmido pBS-VP6₁₄. Así, la versión de la secuencia de VP6 clonada en este plásmido lleva en la región codificante para la posición aminoacídica 14 un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción XbaI.

De igual manera se clonaron los diferentes productos de amplificación para obtener los plásmidos pBS-VP6₁₀₁, pBS-VP6₁₄₆, pBS-VP6₁₇₁, pBS-VP6₂₃₅, pBS-VP6₃₅₈, pBSV-P6₃₈₂, pBSV-P6_{301/308}, que contienen un sitio XbaI en las posiciones codificantes para las regiones aminoacídicas 101, 146, 171, 235, 358, 382 y 301/308, respectivamente.

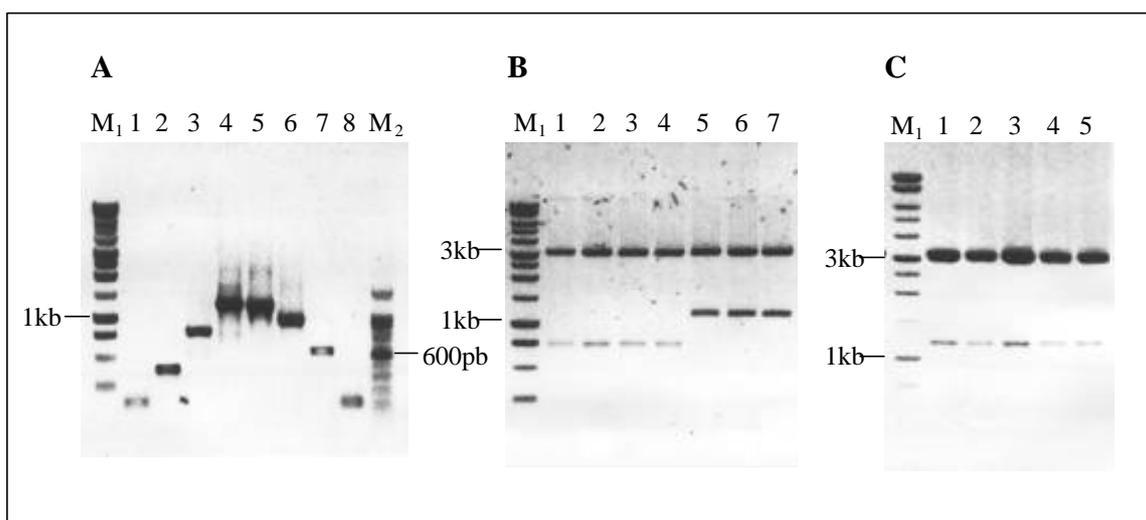


Figura 6: Ejemplos de la construcción de las versiones pBS-VP6_{Xba}. (A): Fragmentos amplificados por PCR, calle1: T3/14low, calle2: T3/101low, calle3: T3/235low, calle4: T3/382low, calle 5: 14up/T7, calle6: 101up/T7, calle7: 235up/T7, calle8: 382up/T7, M₁: 1kb leader Promega, M₂: 100pb Promega. (B): Análisis por digestión con enzimas de restricción de las construcciones intermedias, calle 1 a 4: clones pBS-T3/235, calle 5 a 7: clones pBS-T3/382. (C): Análisis por digestión con BamHI de las construcciones: calle 1 a 3: pBS-VP6₁₄, calle 4 y 5: clones pBS-VP6₁₀₁.

Todas las construcciones pBS-VP6_{Xba} fueron secuenciadas en su totalidad para verificar la integridad de las mismas.

2.b) Síntesis e inserción del epítopo V5

La secuencia codificante para el epítopo V5 derivado del virus SV5 se obtuvo por hibridación de dos oligonucleótidos sintéticos siguiendo la estrategia que se detalla en la Figura 7.

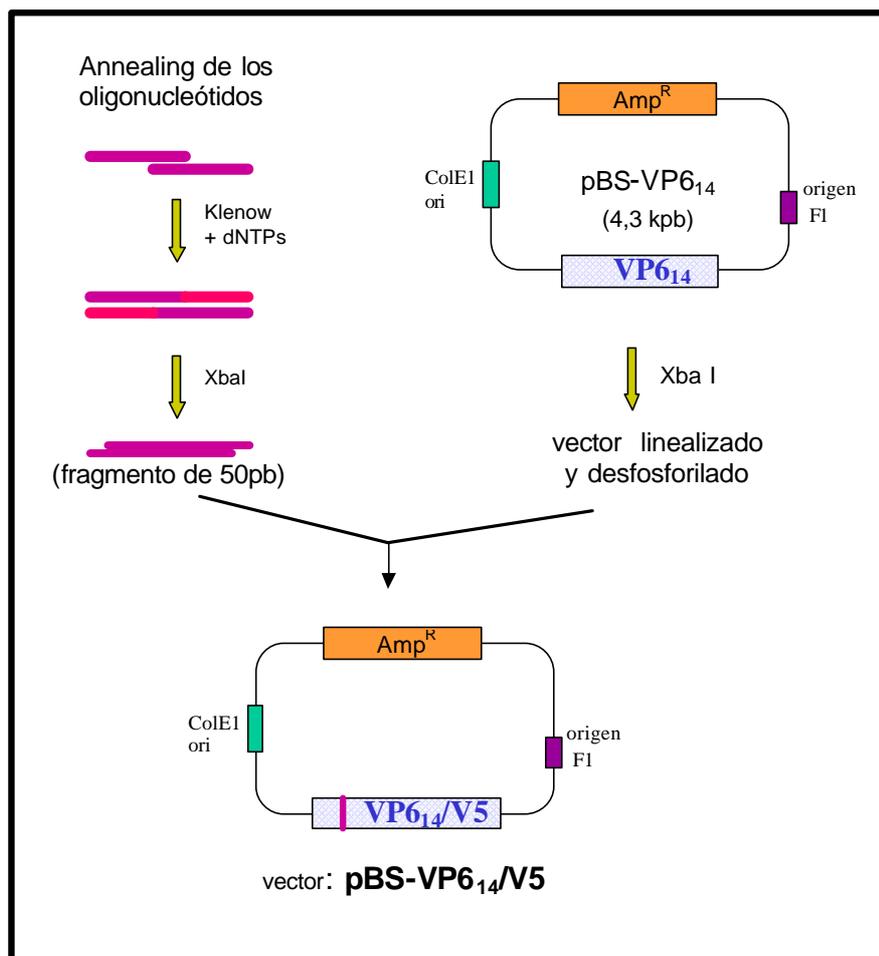


Figura 7: Síntesis de la región codificante para el epítopo V5 y clonado en los vectores pBS-VP6_{XbaI}. Se diseñaron dos oligonucleótidos complementarios en 12 bases, que fueron hibridados y los extremos de simple cadena se rellenaron con la enzima Klenow y dNTPs. El dúplex obtenido se digirió con la enzima XbaI y el fragmento resultante se clonó en marco de lectura en las distintas versiones de pBS-VP6_{XbaI}.

El dúplex obtenido se digirió con la enzima XbaI y el fragmento resultante se clonó en marco de lectura en las distintas versiones de pBS-VP6_{XbaI}, para originar los diferentes vectores pBS-VP6/V5.

Todas las construcciones fueron analizadas mediante digestión con enzimas de restricción para corroborar la presencia del inserto y el número de copias, como se muestra en la siguiente figura.

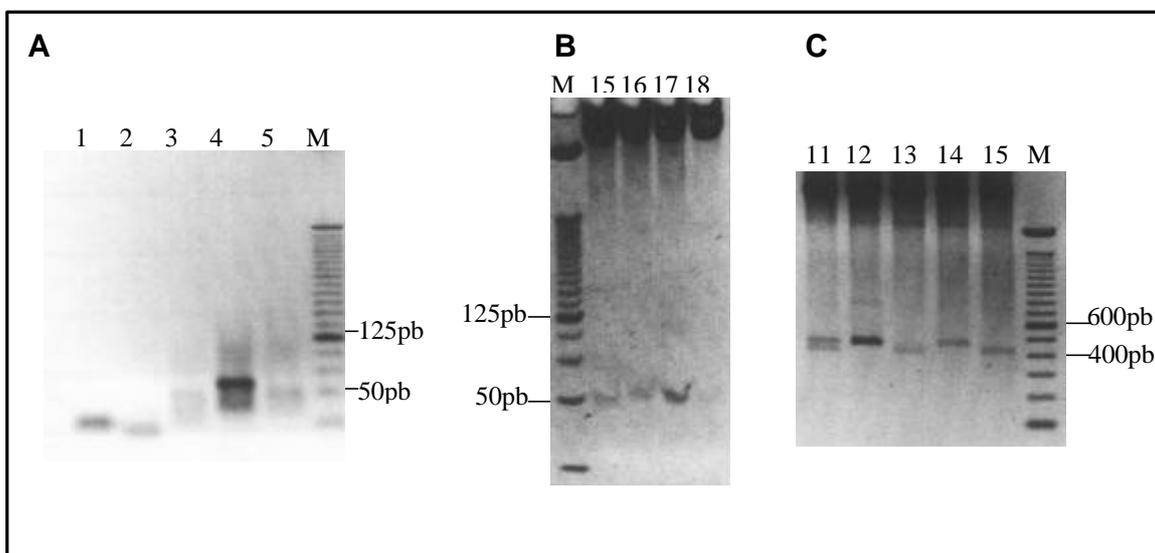


Figura 8: Síntesis de la secuencia codificante para el epítipo V5 y clonado en los vectores pBS-VP6_{XbaI} (A) Gel de agarosa *Seakem* 2,5% en *buffer* TBE. Calle 1: oligonucleótido V5for, calle 2: oligonucleótido V5rev, calle 3: *annealing* de los oligonucleótidos, calle 4: dúplex V5, calle 5: dúplex V5 digerido con la enzima XbaI, M: 25pb DNA ladder (Gibco). (B) Análisis de la presencia del fragmento V5 en los clones #15, 16, 17 y 18 de la construcción pBS-171: digestión con la enzima XbaI y electroforesis en gel de poliacrilamida 8%, M: 25pb (Gibco). (C) Análisis del número de copias del fragmento V5 incorporado en los distintos clones pBS-171: digestión con las enzimas *AccI* y *HpaI* presentes en la secuencia de VP6 y electroforesis en gel de agarosa 1,5%, M: 100pb DNA ladder (Gibco). Los clones con una sola copia del inserto V5 son #13 y 15 .

Los clones con una sola copia del inserto fueron secuenciados para verificar la orientación e integridad del inserto.

2.c) Construcción de los vectores de transferencia para baculovirus

Una vez confirmadas la integridad y orientación de las diferentes construcciones mediante análisis de restricción y secuenciación, las diferentes fusiones VP6/V5 se subclonaron en el plásmido de transferencia pVL1393 (Pharmingén).

En la Figura 9 se detalla la estrategia de clonado.

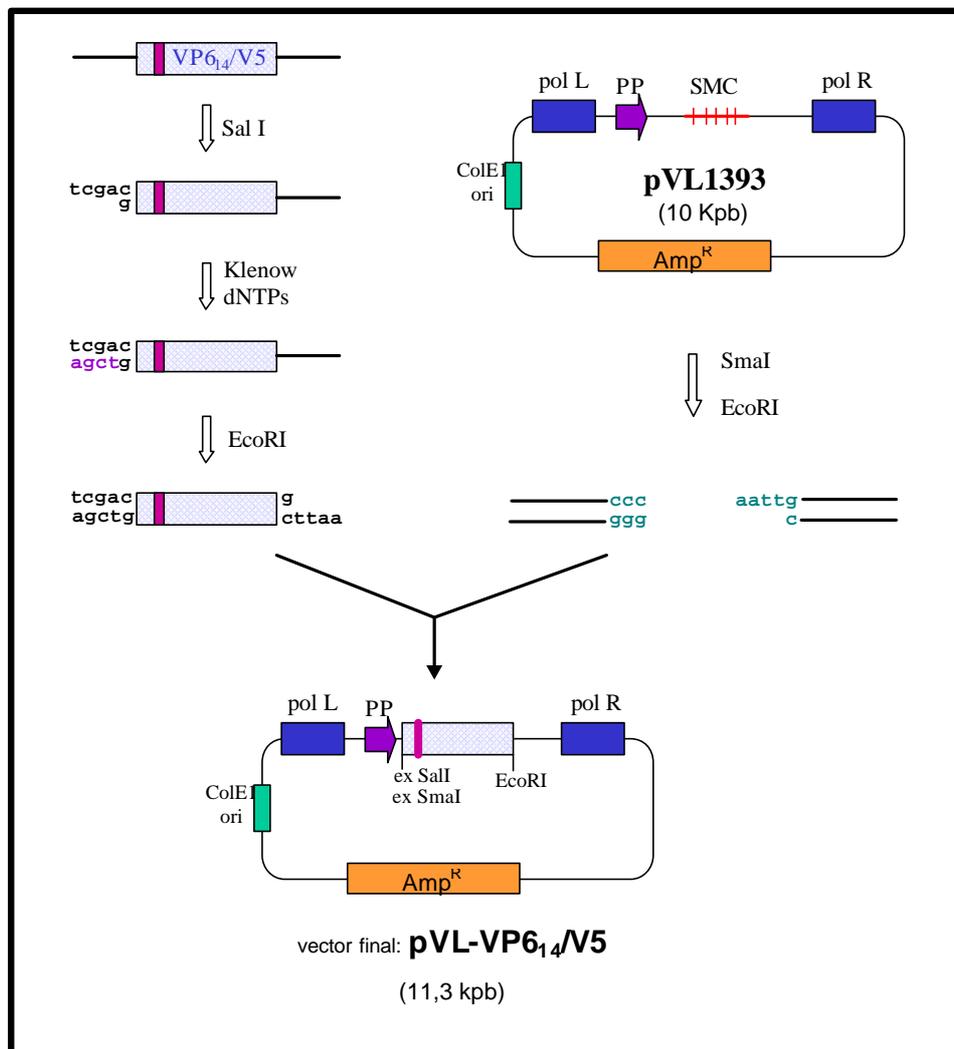


Figura 9: Estrategia de clonado del fragmento VP6/V5 en el vector pVL1393. Los vectores pBS-VP6/V5 fueron digeridos con la enzima Sal I y luego se rellenaron los extremos cohesivos mediante el agregado del fragmento Klenow y dNTPs. Después de inactivar el fragmento Klenow, se realizó una segunda digestión con la enzima de restricción EcoRI. Finalmente, se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa la banda correspondiente al fragmento VP6/V5. El vector pVL1393 se digirió con la enzima SmaI y luego se realizó una segunda digestión con la enzima EcoRI y la remoción de los extremos 5'fosfato. El vector linealizado se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa. (pol L y pol R: secuencias flanqueantes a la región de poliedrina, necesarias para la recombinación posterior con el genoma de baculovirus en ese locus; PP: promotor de poliedrina; Amp^R: gen que otorga resistencia al antibiótico Ampicilina, para la selección de bacterias transformadas con este vector; ColE1ori: origen de replicación bacteriano).

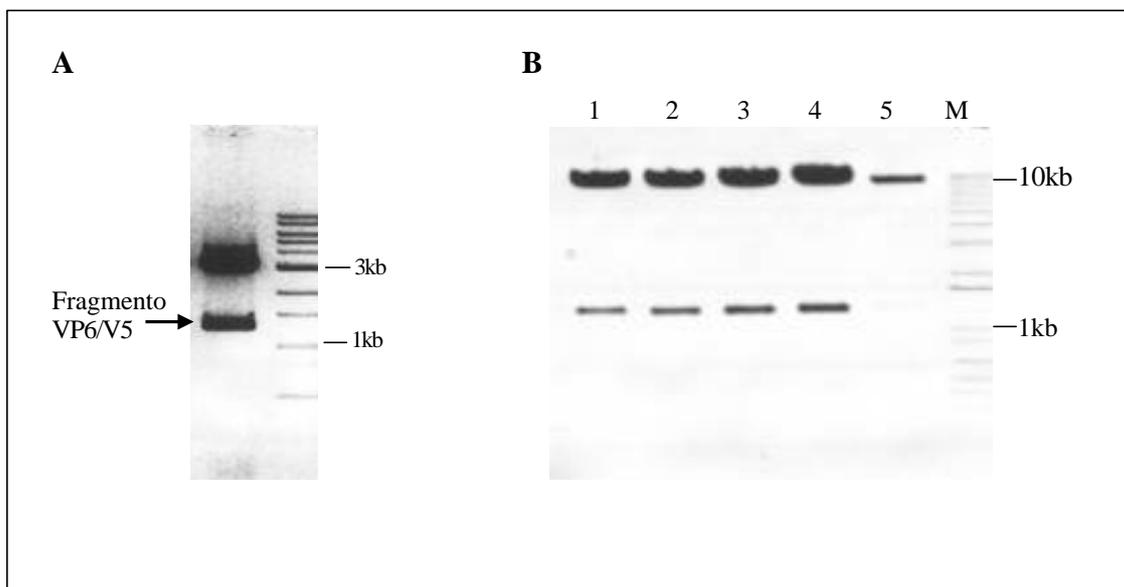


Figura 10: Clonado del fragmento VP6/V5 en el vector pVL1393. (A): Digestión de la construcción pBS-VP6/V5 con el objeto de purificar el fragmento VP6/V5. En este caso, se muestra la versión 235. (B): Análisis por digestión con enzimas de restricción. Calles 1 a 4: clones pVL-VP6₂₃₅/V5, calle 5: clon que no contiene el inserto VP6/V5. M: 1kb Plus, Gibco.

De esta manera se obtuvieron los vectores finales pVL-VP6/V5. El ADN de los clones seleccionados se purificó utilizando columnas comerciales (QIAGEN) que aseguran la calidad y cantidad de ADN necesaria para transfectar células y se cuantificó mediante espectrofotómetro para su posterior utilización.

2.d) Construcción de la versión mutada en la posición amino-terminal

Utilizando los oligonucleótidos VP6N-for y VP6N-rev (tabla 2 de Materiales y Métodos) se amplificó la versión Nterm de VP6 carente del codón de iniciación ATG. Este producto de PCR se ligó con el vector pGEMT-easy y se secuenció para corroborar su identidad.

Como la secuencia de reconocimiento para la enzima XbaI en esta versión de VP6 resultó ser sensible a metilación y por lo tanto resistente a la digestión enzimática, se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa dam⁽⁻⁾JM111.

En la Figura 11 se detalla la estrategia de clonado

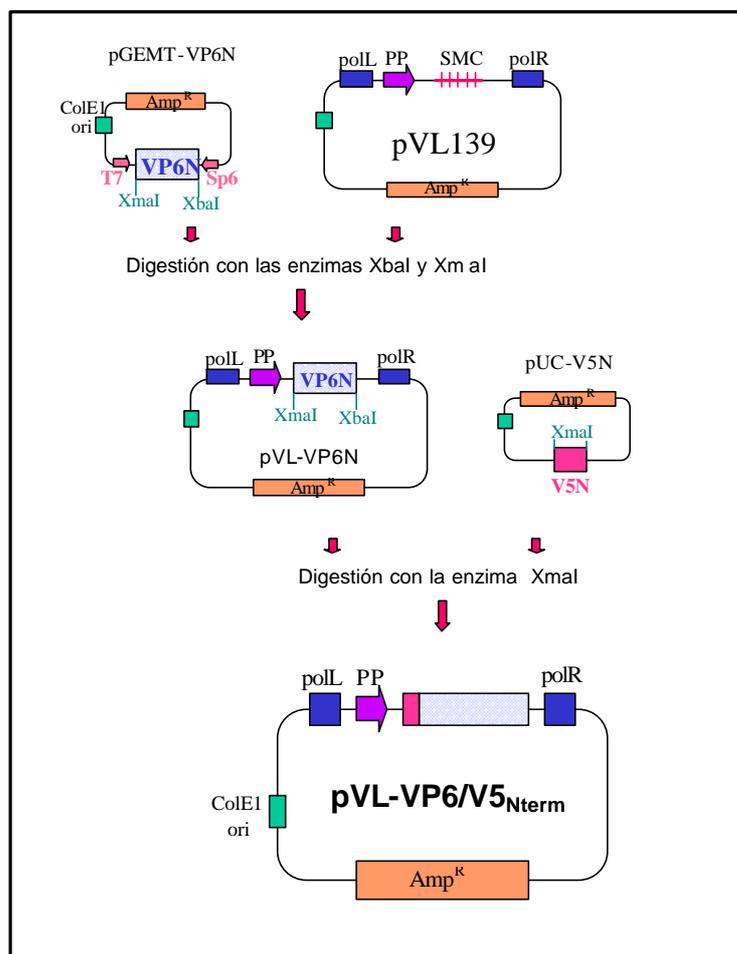


Figura 11: Construcción de la versión Nterm. Se digirió el plásmido pGEMT-VP6N-dam(-) con las enzimas de restricción XbaI y XmaI y el inserto de interés se ligó al vector pVL1393 previamente digerido con las mismas enzimas y removidos los extremos 5'fosfato, dando origen a la construcción pVL-VP6N. Por otro lado, se sintetizó la secuencia codificante para la versión amino terminal del epítipo V5 (como se describió en la sección 2.b) que posee el codón ATG de inicio de la traducción y el dúplex se clonó en el vector pUC18 para su secuenciación. Se digirió el vector pUC-V5N con la enzima XmaI y se purificó el inserto de 60pb mediante el uso de geles de poliácridamida. El fragmento así obtenido se ligó al vector pVL-VP6N previamente digerido con la enzima XmaI y removidos los extremos fosfato.

En la figura 12 se muestra paso a paso la obtención de la construcción pVL-VP6/V5Nterm.

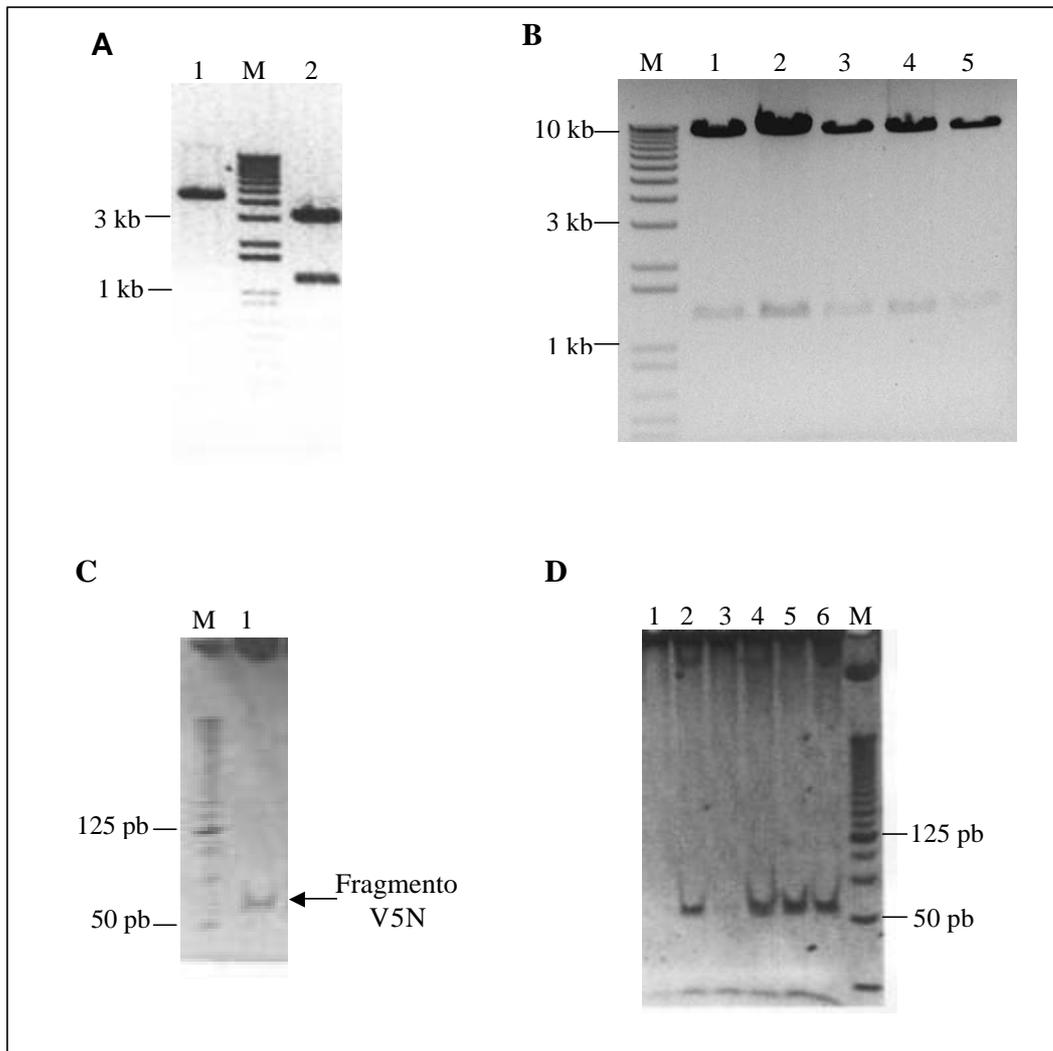


Figura 12: Construcción de la versión VP6/V5Nterm. (A): Digestión de la construcción pGEMT-VP6N con las enzimas XmaI y XbaI. Calle 1: ADN plasmídico proveniente de *E. coli* DH5 α . Calle 2: ADN plasmídico proveniente de *E. coli* JM111 dam(-). El fragmento VP6N se libera únicamente cuando el ADN plasmídico no sufre metilación dam. (B): Análisis por digestión con enzimas de restricción de varios clones pVL-VP6N (calles 1 a 5), M: 1kb Plus Gibco. (C): Digestión del vector pUC-V5N con la enzima XmaI y electroforesis en gel de poliacrilamida 8%. Se identifica el fragmento correspondiente a la secuencia V5N de 60pb. M: 25pb Gibco. (D): Análisis por digestión con la enzima XmaI y electroforesis en gel de poliacrilamida 8% de varios clones pVL-VP6/V5Nterm (calles 1 a 6). M: 25pb Gibco.

Se obtuvo así el vector final pVL-VP6/V5N. Este plásmido fue purificado y cuantificado para su posterior utilización.

3. Obtención de los baculovirus recombinantes

Se cotransfectaron células Sf9 con los plásmidos recombinantes derivados del vector pVL1393 y el genoma de AcNPV BaculoGold (Pharmingen).

A los 5 días post-transfección se cosechó el sobrenadante y se realizaron dos rondas de purificación de clones por dilución a punto final.

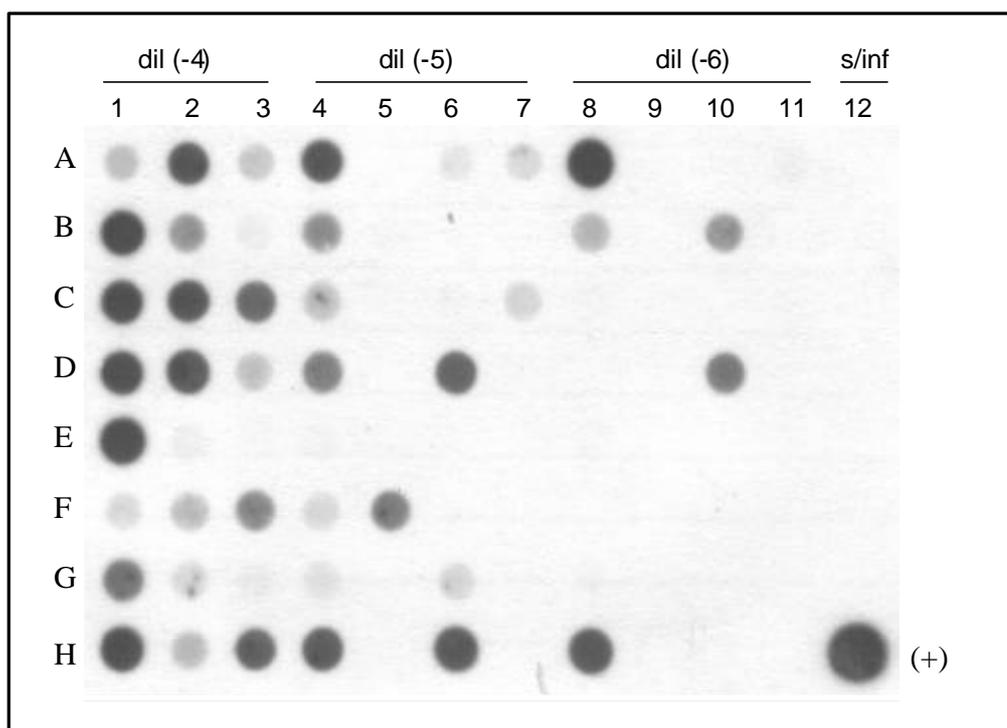


Figura 13: Aislamiento de baculovirus recombinantes por dilución a punto final. Dot-blot realizado sobre células infectadas con diluciones seriadas del sobrenadante de transfección, en placas de 96 pocillos. La sonda utilizada es la secuencia codificante para la proteína VP6 marcada con ^{32}P . En el pocillo positivo se colocaron 50ng del plásmido pBS-VP6wt.

Se seleccionaron los clones virales aislados para cada construcción. Por ejemplo, en el *dot-blot* que se muestra en la Figura 13, los clones seleccionados para su amplificación fueron: B10, D10 y H8.

Los baculovirus recombinantes obtenidos se denominaron: AcVP6₁₄/V5, AcVP6₁₀₁/V5, AcVP6₁₄₆/V5, AcVP6₁₇₁/V5, AcVP6₂₃₅/V5, AcVP6₃₅₈/V5, AcVP6₃₈₂/V5, AcVP6_{301/8}/V5 y AcVP6_{Nterm}/V5.

Con el propósito de aumentar el título viral, se realizaron dos amplificaciones sucesivas a baja multiplicidad de infección. De cada *stock* viral obtenido se calculó el título mediante ensayos de titulación en placas. Los títulos promedio obtenidos fueron de 1×10^8 ufp/ml, aproximadamente.

Cada uno de los *stocks* de trabajo se mantuvo refrigerado a 4°C hasta su uso, protegido de la luz.

1. Expresión de las quimeras VP6/V5 a partir de los baculovirus recombinantes

La expresión de las quimeras VP6/V5 en células de insecto Sf9 infectadas con los baculovirus recombinantes se analizó en primera instancia mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Para ello, se infectaron células Sf9 crecidas en monocapas con los distintos baculovirus recombinantes una moi igual a 10. A los 5 días post-infección, se cosecharon las células y se realizó una extracción de proteínas mediante *buffers* no desnaturizantes. Los extractos proteicos así obtenidos fueron resueltos en geles de poliacrilamida y teñidos con el colorante azul de Coomassie para evaluar la presencia de la proteína recombinante.

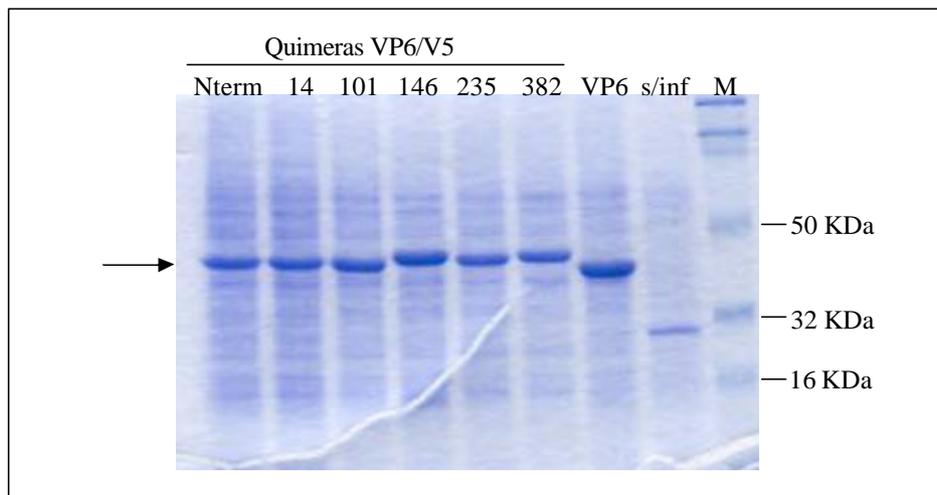


Figura 1: Extractos proteicos de células infectadas con los baculovirus recombinantes. Los extractos proteicos totales fueron resueltos en un gel de poliacrilamida 12% y teñidos con azul de Coomassie. En cada calle del gel se sembraron 10 μ l de una dilución 1/10 del extracto.

Se puede observar la presencia de una banda mayoritaria en las células infectadas con los baculovirus recombinantes (ausente en las células sin infectar) correspondiente a una peso molecular aparente de 45KDa, similar al esperado para la proteína VP6. Las quimeras VP6/V5 mostraron un retardo en la movilidad electroforética respecto a la proteína VP6wt.

Esta banda mayoritaria presente en todos los extractos celulares infectados con los baculovirus recombinantes corresponde a un 35 % de las proteínas totales, estimado por densitometría de los geles de poliacrilamida empleando el programa

2. Identidad de las quimeras VP6/V5

Con el fin de corroborar la identidad de las proteínas observadas en el gel teñido con Coomassie, los extractos proteicos totales fueron analizados mediante ensayos de *Western blot*.

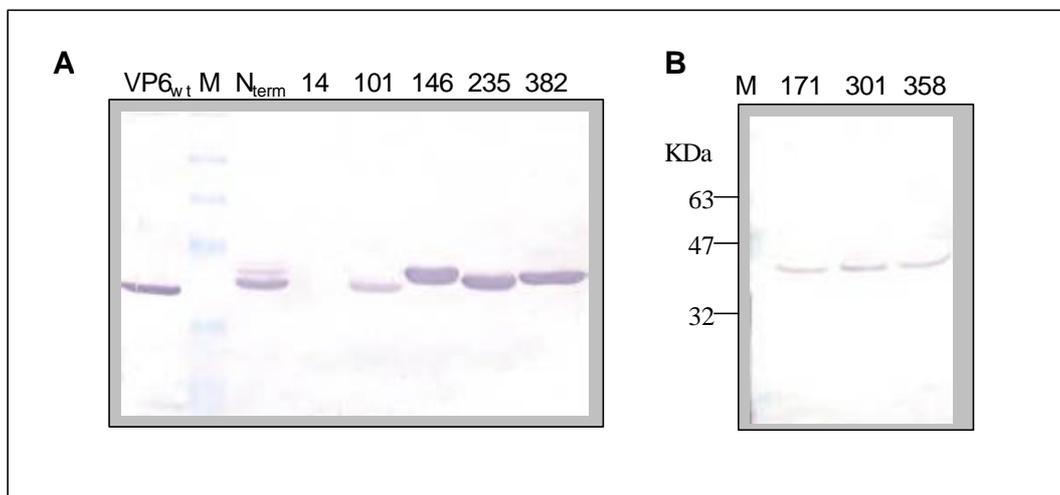


Figura 2: Identidad de las quimeras VP6/V5 frente al suero policlonal anti-SA11. Se analizó la expresión y la identidad de las quimeras VP6/V5 mediante ensayos de *Western blot* utilizando un suero policlonal anti-SA11. (A) Se muestra la reactividad de las quimeras Nterm, 14, 101, 146, 235 y 382. Se incluye como control la proteína VP6wt. (B) Se muestra la reactividad de las quimeras 171, 301/8 y 358. M: marcador de proteínas preteñido Broad Range (NEB).

Como se puede apreciar en la Figura 2, todas las quimeras VP6/V5 fueron reconocidas por el suero policlonal anti-SA11, corroborándose su identidad, con excepción de la quimera VP6/V5₁₄ que no es reconocida por este suero.

Como todas las construcciones fueron secuenciadas en su totalidad, verificando que el marco de lectura no había sido alterado al producir la inserción del epítopo V5, la falta de reactividad de la quimera VP6/V5₁₄ frente al suero policlonal anti-SA11 fue un resultado no esperado.

Estos mismos extractos proteicos fueron utilizados en otro ensayo de *Western blot* que se muestra en la Figura 3.

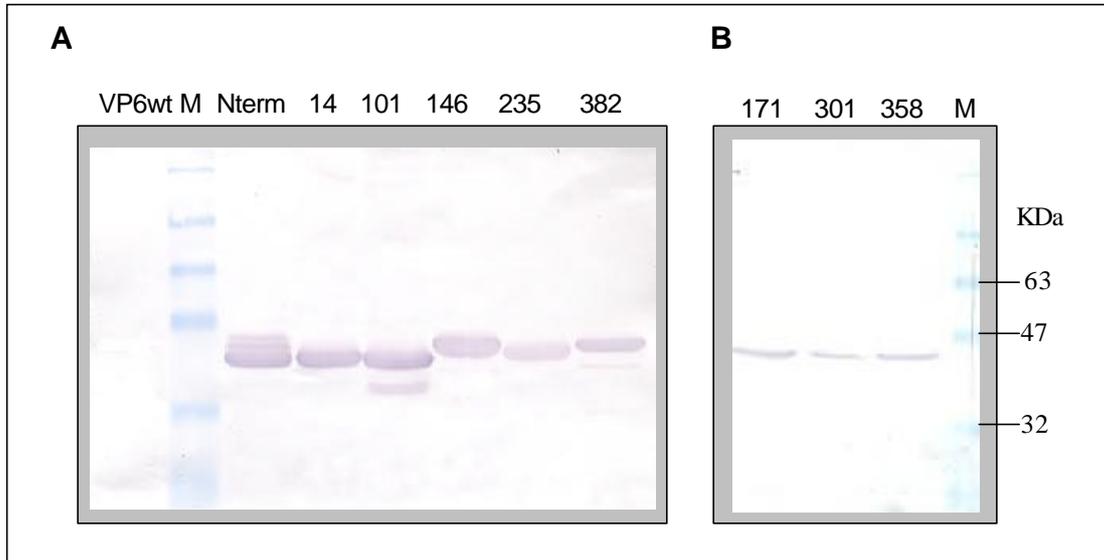


Figura 3: Identidad de las quimeras VP6/V5 frente al monoclonal anti-V5. Los extractos proteicos de células infectadas con los baculovirus recombinantes fueron resueltos en geles de poliacrilamida 12% y transferidos a membranas de nitrocelulosa para ser analizados mediante ensayos de *Western blot*. **(A)** Se muestra la reactividad de las quimeras Nterm, 14, 101, 146, 235 y 382. Se incluye como control la proteína VP6wt. **(B)** Se muestra la reactividad de las quimeras 171, 301/8 y 358. M: marcador de proteínas preteñido Broad Range (NEB).

Como se observa en la Figura 3, todas las quimeras son reconocidas por el suero monoclonal anti-V5, incluyendo la versión VP6/V5₁₄.

En conjunto, la versión VP6/V5₁₄ presentó un comportamiento diferencial con respecto a las otras quimeras. Esta versión no es reconocida por el suero policlonal anti-SA11, pero sí lo fue por el suero monoclonal anti-epitope V5.

Para evaluar si esta reactividad diferencial se debió a la posición del inserto en esta quimera o a una particularidad del suero policlonal utilizado, se analizó la reactividad de esta quimera frente a sueros de otras fuentes.

3. Caracterización antigénica de la quimera VP6/V5₁₄

Para una caracterización antigénica más exhaustiva de la quimera VP6/V5₁₄ se analizó su reactividad frente a sueros policlonales anti-rotavirus de distintos orígenes mediante ensayos de *Western blot*

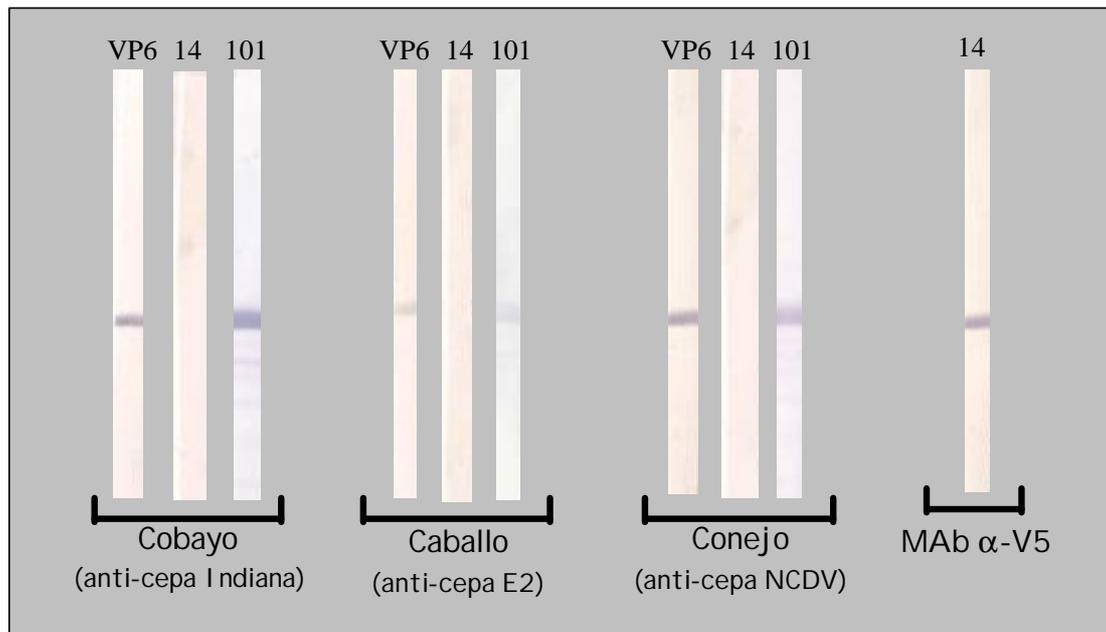


Figura 4: Caracterización de la quimera VP6/V5₁₄ con distintos sueros policlonales. Se analizó la reactividad de la versión VP6/V5₁₄ frente a distintos sueros policlonales anti-rotavirus en ensayos de *Western blot*. Para cada suero se muestra la reactividad de la proteína VP6wt y de una quimera correspondiente a la versión VP6/V5₁₀₁. Como control de la presencia de la quimera 14 se muestra el revelado con el monoclonal anti-V5.

Como se puede apreciar en la Figura 4, la versión VP6/V5₁₄ no es reconocida por sueros policlonales anti-rotavirus procedentes de distintas especies de animales (cobayo inmunizado con la cepa Indiana de rotavirus bovino, caballo naturalmente infectado con la cepa equina E2, conejo inmunizado con la cepa bovina NCDV), mientras que estos sueros sí pueden reconocer a la proteína VP6wt (derivada de la cepa de simio SA11, al igual que las quimeras) y al resto de las quimeras VP6/V5.

Esto señala que la inserción de una secuencia foránea en la posición aminoacídica 14 de la proteína VP6 interrumpe el sitio inmunodominante lineal de esta proteína.

4. Análisis de la capacidad de formar trímeros

La proteína VP6 que se encuentra formando parte del virión de rotavirus, está organizada en trímeros (cita). Una manera sencilla de evaluar la formación de trímeros por parte de la proteína VP6 es analizando los extractos proteicos incubandolos a 37°C, en condiciones no reductoras.

Se evaluó entonces, si la inserción del epítopo en cada una de las versiones VP6/V5 afectaba la capacidad de formar trímeros que tiene la proteína VP6.

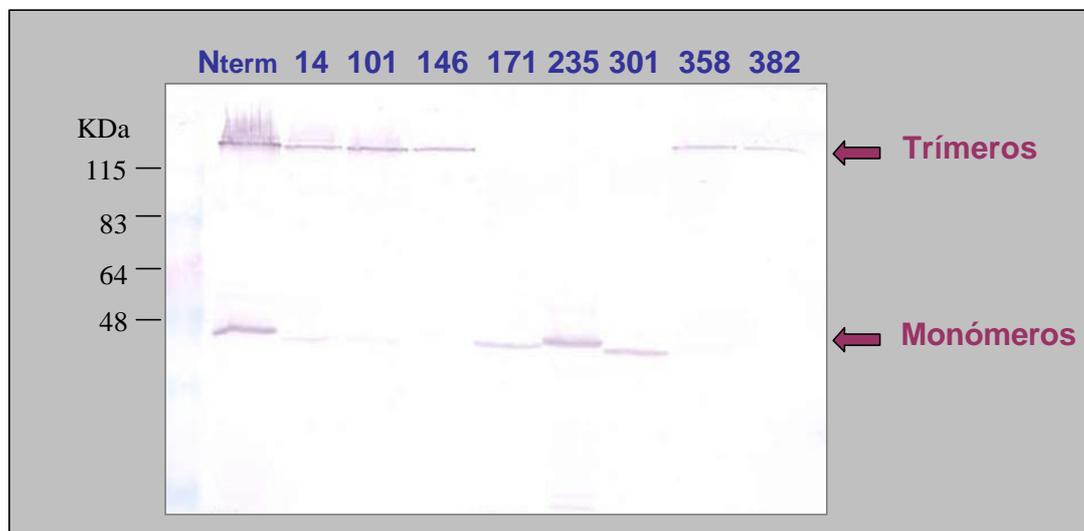


Figura 5: Evaluación de la capacidad de formar trímeros. Los extractos proteicos conteniendo las quimeras fueron incubados a 37°C durante 30min en presencia de *cracking buffer* sin β -mercaptoetanol. Luego se resolvieron en geles de poliacrilamida y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa para ser analizados mediante un ensayo de *Western blot* utilizando el anticuerpo monoclonal anti-V5. M: marcador de proteínas preteñido BenchMark (Invitrogen).

Como se puede apreciar en la Figura 5, todas las versiones VP6/V5 fueron capaces de formar trímeros, a excepción de las versiones VP6/V5₁₇₁, VP6/V5₂₃₅ y VP6/V5₃₀₁.

Para descartar que una posible trimerización de las versiones VP6/V5₁₇₁, VP6/V5₂₃₅ y VP6/V5₃₀₁ volviera al epítopo V5 inaccesible al anticuerpo monoclonal

anti-V5, se realizó un ensayo de *Western blot*, empleando esta vez el suero policlonal de conejo anti-SA11. Los resultados se muestran en la Figura 6.

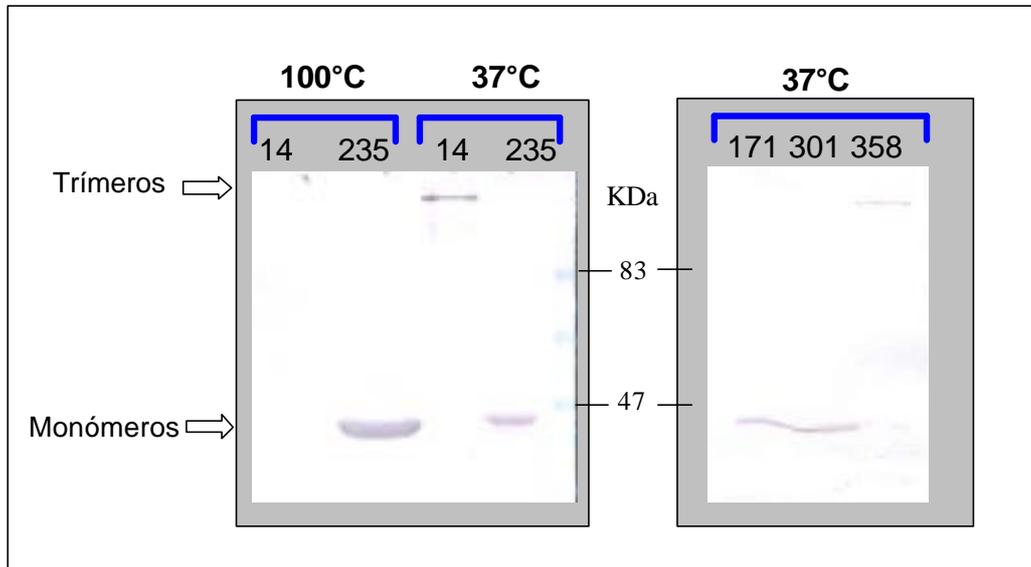


Figura 6: Reactividad de los trímeros frente al suero policlonal anti-SA11. Se analizó la reactividad de los trímeros de las quimeras 14, 171, 235, 301 y 358 frente al suero policlonal de conejo anti-SA11 mediante ensayos de *Western blot*. En el panel de la izquierda se corroboró además la reactividad de los monómeros (muestras tratadas a 100°C) de las versiones 14 y 235 frente al mismo suero.

Del análisis de estos ensayos de *Western blot* pueden desprenderse dos conclusiones. En primer lugar, se confirmó la incapacidad de las quimeras VP6/V5₁₇₁, VP6/V5₂₃₅ y VP6/V5₃₀₁ de trimerizar, ya que ni un anticuerpo monoclonal dirigido contra el epítopo V5 ni un suero policlonal de conejo anti-SA11 pudieron revelar la presencia de una banda a la altura esperada para una estructura trimérica. En condiciones no reductoras, el suero policlonal detectó solamente la banda correspondiente al monómero.

En segundo lugar, que aunque el monómero de la versión VP6/V5₁₄ no pudo ser reconocido por sueros policlonales anti rotavirus de distintas especies (ver Figura 4), su forma trimérica sí fue reconocida por el suero policlonal de conejo. Esto puede ser explicado por el hecho de que a pesar de haberse interrumpido el sitio inmunodominante en la secuencia lineal de la proteína VP6 por la inserción del epítopo V5 en la posición aminoacídica 14, en el trímero existen epítopos de

naturaleza conformacional o discontinua que son reconocidos por un suero policlonal anti rotavirus.

5. Análisis de la capacidad de formar multímeros

El siguiente paso consistió en evaluar la capacidad de las distintas quimeras de formar multímeros como lo hace la proteína VP6wt.

Con este fin, se infectaron células Sf9 con los distintos baculovirus recombinantes con una moi igual a 10. A los 5 días post-infección, se cosecharon las células y los sobrenadantes de infección, que fueron clarificados. Las proteínas de las células infectadas fueron extraídas con el solvente *Vertrel* en presencia del *buffer* TNMC (Tris-HCl 10mM, NaCl 150mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 10mM) que otorga la concentración de Ca²⁺ necesaria para estabilizar la formación de VLPs.

El sobrenadante de infección clarificado y la extracción de *Vertrel* fueron analizados por ultracentrifugación en colchones de sacarosa. De esta manera, las proteínas particuladas adquieren un coeficiente de sedimentación capaz de atravesar un colchón de sacarosa, mientras que los monómeros u oligómeros no tiene esta capacidad (Rosenberg, 1996).

Se desarrolló entonces, un protocolo de ultracentrifugación, utilizando para ello la proteína VP6wt. Se tomaron muestras en cada uno de los pasos para ser analizadas mediante ensayos de *Western blot*.

El resultado se muestra en la Figura 7.

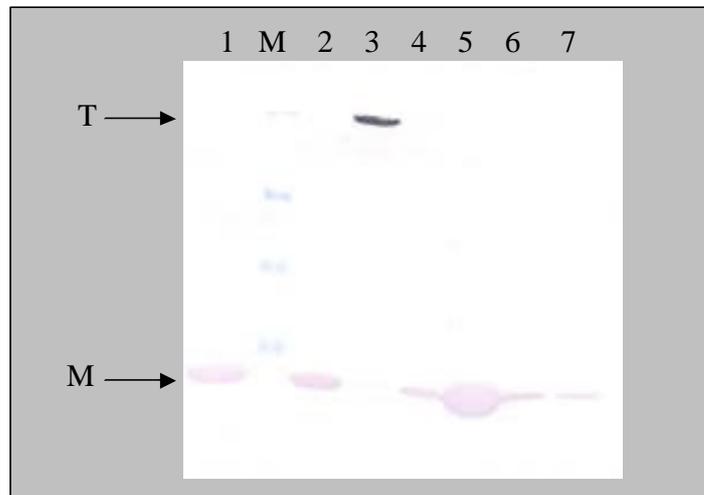


Figura 7: Análisis de la capacidad de formar multímeros. Puesta a punto de los pasos de ultracentrifugación con la proteína VP6wt. Calle 1: extracto proteico total, calle 2: extracción con *Vertrel* y desnaturalización a 100°C, calle 3: extracción con *vertel* incubada a 37°C, calle 4: sobrenadante de infección concentrado por ultracentrifugación, calle 5: extracción con *Vertrel* concentrada por ultracentrifugación, calle 6: concentrados anteriores disueltos en 10ml de buffer TNMC, calle 7: muestra del pellet de la ultracentrifugación a través de colchón de sacarosa 30% p/p. *Western blot* revelado con el suero de conejo anti-SA11.

Como se puede apreciar en la Figura 7, la proteína VP6 wt extraída de células infectadas con el solvente *Vertrel* así como la recuperada del sobrenadante de infección puede atravesar un colchón de sacarosa 30% p/p al ser sometidas a ultracentrifugación con una fuerza de 70.000g.

Como control, se utilizó la proteína VP6wt obtenida mediante extracción con *Vertrel* pero sometida a desnaturalización previa por calor durante 10 minutos a 100°C. Esta muestra no pudo atravesar el colchón de sacarosa, recuperándose del tope del colchón (resultados no mostrados).

Una vez establecido que esta metodología permite separar a la proteína VP6wt multimérica del resto de las proteínas que no multimerizan presentes en los sobrenadantes de infección o en los extractos de células infectadas, se analizó de la igual manera a las quimeras VP6/V5.

En la Figura 8 se muestra como ejemplo el análisis realizado a la quimera VP6/V5₁₄. (Los resultados obtenidos con el resto de las quimeras se informan en la Tabla 1).

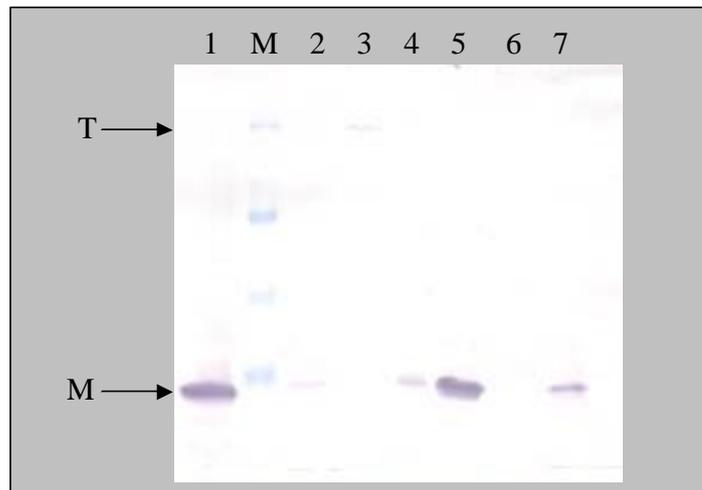


Figura 8: Análisis de la capacidad de formar multímeros de la quimera 14. Calle 1: extracto proteico total, calle 2: extracción con *Vertrel* y desnaturalizada por calor, calle 3: extracción con *Vertrel* incubada a 37°C, calle 4: sobrenadante de infección concentrado por ultracentrifugación, calle 5: extracción con *vertel* concentrada por ultracentrifugación, calle 6: concentrados anteriores disueltos en 10ml de *buffer* TNMC, calle 7: muestra del *pellet* de la ultracentrifugación a través de colchón de sacarosa 30% p/p. *Western blot* revelado con el suero monoclonal anti-V5.

Los resultados mostraron que todas las versiones pudieron atravesar el colchón de sacarosa, con excepción de dos versiones: VP6/V5₃₅₈, que estuvo en el límite de detección en el *pellet* de ultracentrifugación y VP6/V5₃₈₂, que no pudo ser detectada.

Estos resultados indican que la inserción de un epítopo foráneo en las posiciones aminoacídicas 358 y 382 de la proteína VP6 de rotavirus afecta de alguna forma su capacidad de formar multímeros.

Analizando en conjunto la capacidad de formar trímeros y la de formar multímeros, se puede deducir que el dominio de trimerización y el dominio de multimerización de la proteína VP6 son independientes.

Estos resultados indican además que la trimerización no parece ser un requisito previo indispensable a la multimerización de VP6, coincidiendo con lo reportado por Clapp y Patton en 1991.

6. Análisis de la interacción de las quimeras VP6/V5 con la proteína VP2

La proteína VP2 forma el *core* de los rotavirus y también es capaz de multimerizar y formar VLPs, aunque sin la presencia de VP6 se asocia a membranas y no puede ser extraída fácilmente ni ser detectada en el sobrenadante de infección. En 1999, Madore y colaboradores determinaron que las VLPs mixtas formadas por VP2 + VP6 eran mucho más estables que las VLPs simples, formadas sólo por VP6. Se decidió entonces evaluar la capacidad de las quimeras VP6/V5 de interactuar con la proteína VP2 de rotavirus.

Con este fin, se realizaron coinfecciones de células Sf9 con los baculovirus recombinantes que expresan las quimeras VP6/V5 y un baculovirus que expresa la proteína VP2 también derivada de la cepa SA11 de rotavirus (AcVP2_{SA11}wt), construido para tal fin en nuestro laboratorio, con una relación de moi igual a 5:8 (VP6:VP2).

A los 5 días post-infección se cosecharon los sobrenadantes de infección y las células. Los sobrenadantes fueron clarificados a 3.000g durante 20 minutos y luego ultracentrifugados sobre colchón de sacarosa 30% p/p. Los *pellets* obtenidos fueron resuspendidos en *buffer* TNMC.

Las muestras se analizaron mediante ensayos de *Western blot*, como se muestra en la Figura 9.

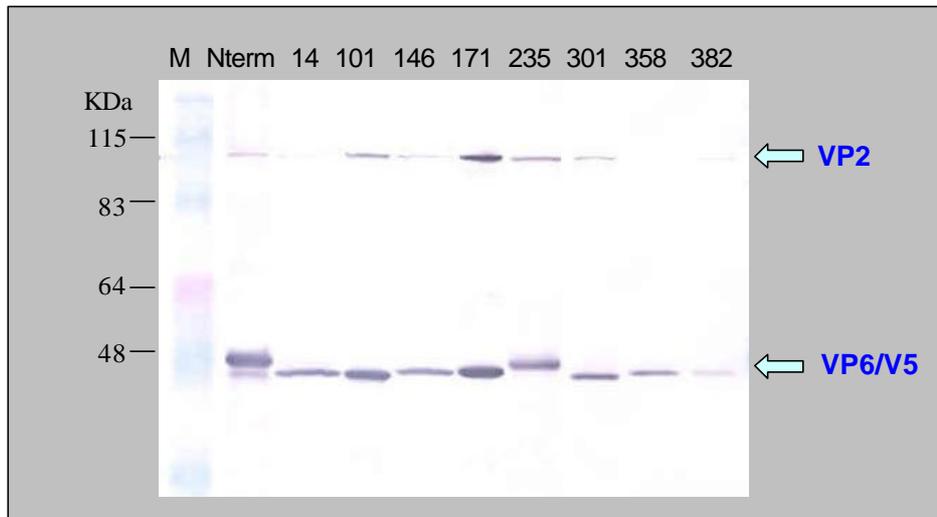


Figura 9: Análisis de la interacción de las quimeras VP6/V5 con la proteína VP2. Se realizaron coinfecciones de células Sf9 con los baculovirus codificantes para las distintas quimeras VP6/V5 y para VP2. Los sobrenadantes de infección fueron ultracentrifugados a través de colchón de sacarosa 30% p/p. M: marcador de proteínas Benchmark.

Como se aprecia en la Figura 9, las quimeras VP6/V5 son capaces de interactuar con la proteína del *core* de los rotavirus formando multímeros que son capaces de atravesar un colchón de sacarosa 30%, incluyendo las versiones VP6/V5₃₅₈ y VP6/V5₃₈₂ (que por sí solas no pueden atravesar colchones de sacarosa, como se demostró en el punto anterior), aunque con menor eficiencia.

Los resultados obtenidos en la caracterización de las quimeras VP6/V5 pueden resumirse en la siguiente tabla:

	N_{TERM}	14	101	146	171	235	301	358	382
Expresión	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reactividad con sueros policlonales anti-rotavirus	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Formación de trímeros	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Formación de multímeros (capacidad de atravesar colchones de sacarosa)	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-
Formación de multímeros mixtos con la proteína VP2	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-

Tabla 1: Resumen de la caracterización de las quimeras VP6/V5.

1. Producción de las quimeras VP6/V5 en su forma monomérica

Como se mencionó anteriormente, además de la unión de un determinado epítopo a un linfocito B virgen, la comunicación célula-célula entre linfocitos T-*helper* y linfocitos B o entre linfocitos T-*helper* y células presentadoras de antígeno determina la calidad de un inmunógeno. La degradación parcial de una molécula *carrier* que presenta un epítopo contra el que se desea montar una respuesta inmune humoral determina los fragmentos que han de migrar a la superficie celular y unir las proteínas receptoras clase II del complejo mayor de histocompatibilidad. Así, con el objeto de investigar de qué manera incide la posición de la inserción del epítopo V5 en la calidad de colaboración medida en términos de inmunogenicidad, independientemente del grado de multimerización, se evaluaron las distintas quimeras VP6/V5 en su forma monomérica como inmunógenos en el modelo murino.

Se infectaron monocapas de células Sf9 con los baculovirus recombinantes para las distintas quimeras VP6/V5, a una multiplicidad de infección igual a 10. A los 4 días postinfección, se cosecharon las células y se sonicaron con 5 pulsos de intensidad media. Luego se agregó *cracking buffer* e hirvió para asegurar la completa desnaturalización de las proteínas. Estas muestras fueron resueltas en geles preparativos de poliacrilamida que se tiñeron con azul de Comassie para identificar la proteína de interés. Se cortó el fragmento de gel que contenía a la quimera VP6/V5, que fue escindida del gel y electroeluida en membranas de diálisis en presencia del *buffer* Tris-Gli-SDS. Las muestras así obtenidas se conservaron a -20°C hasta su uso.

Para verificar que las quimeras producidas de esta manera no multimerizaran espontáneamente, se tomaron muestras de las proteínas electroeluidas y se resolvieron en geles de poliacrilamida previa incubación a 37°C (no fueron hervidas) para detectar la presencia de multímeros.

Como se puede apreciar en la Figura 1, las quimeras obtenidas como se describió anteriormente se conservan como monómeros.

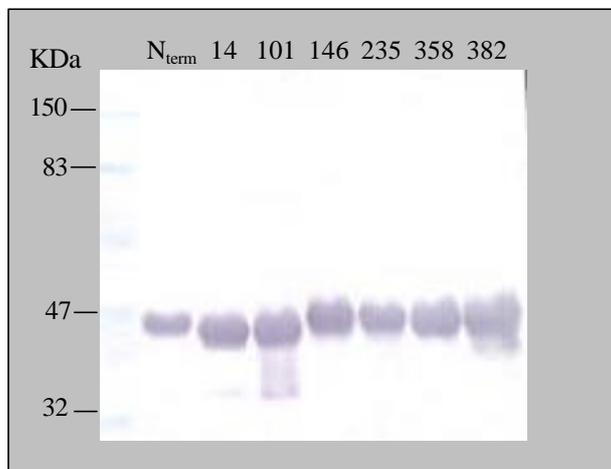


Figura 1: Western blot de las quimeras VP6/V5 para corroborar su forma monomérica. Se tomaron muestras de las quimeras electroeluidas y se incubaron 30 min a 37°C en *cracking buffer* sin 2-mercaptoetanol. Las proteínas se resolvieron en geles de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para visualizarlas en un ensayo de *Western blot* con el anticuerpo monoclonal anti-V5.

A continuación, se procedió a cuantificar la masa obtenida para cada una de las versiones electroeluidas. Para esto se sembraron 5µl de cada muestra en geles de poliacrilamida junto con una curva patrón de BSA. Las proteínas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie (Figura 2) y se detreminó su masa por densitometría.

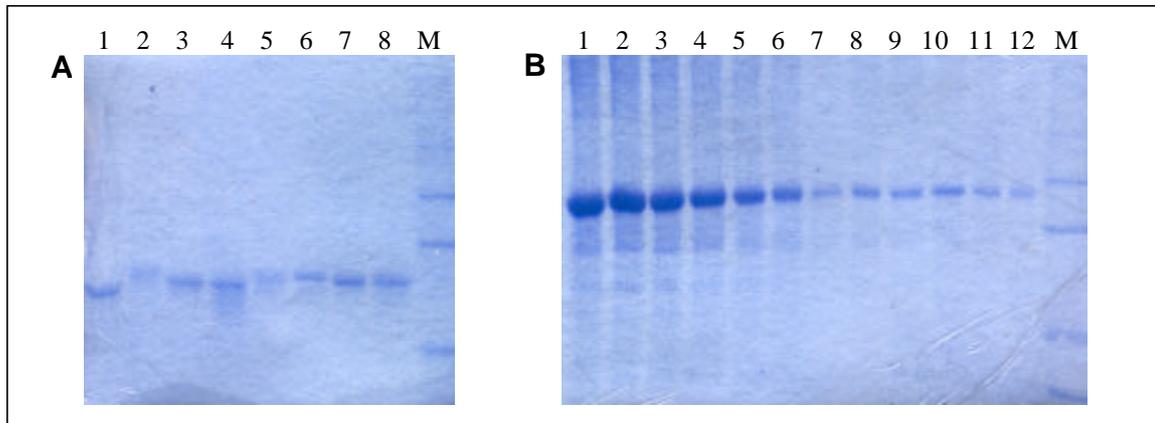


Figura 2: Cuantificación de las versiones VP6/V5 por comparación con una curva patrón de BSA y tinción con Coomassie. (A) Se sembraron 5µl de cada muestra, calle 1: VP6wt, calle 2: versión Nterm, calle 3: versión 14, calle 4: versión 101, calle 5: versión 146, calle 6: versión 235, calle 7: versión 358, calle 9: versión 382, M: marcador de proteínas, Mark12 unstained standard. (B) Curva patrón de BSA, se utilizaron las siguientes concentraciones en orden decreciente: 10µg a 500ng (calle 1 a 12).

Mediante esta metodología las distintas versiones de VP6/V5 se llevaron a la misma concentración.

2. Inmunización de ratones con la forma monomérica de las quimeras VP6/V5.

Se inmunizaron ratones hembras Balb/C con 5µg de cada proteína quimérica VP6/V5 por vía intraperitoneal, formulado en adyuvante incompleto de Freund (Gibco). Se incluyó un grupo de ratones inmunizados con 5µg de la proteína VP6wt, también en su forma monómerica.

En la siguiente figura se detalla el esquema de inmunización.

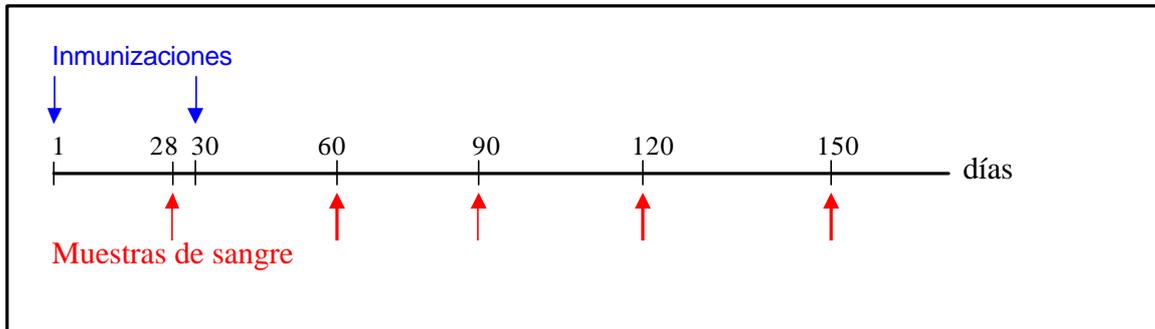


Figura 3: Esquema de inmunización con los monómeros de VP6/V5 y toma de muestras de suero. Con flechas azules se señalan los días en que los ratones fueron inmunizados con 5 μ g de proteína monomérica por vía intraperitoneal. Con flechas rojas se indican los días en que se tomaron muestras de sangre de las venas radiales de la cola del ratón, con el fin de obtener el suero.

3. Evaluación de la respuesta humoral inducida

3.1. Desarrollo de un ELISA para detectar anticuerpos anti-V5

Con el fin de evaluar la presencia de anticuerpos anti-epitope V5 en los sueros de los animales inmunizados con las quimeras VP6/V5, se desarrolló un ensayo de ELISA con una proteína no relacionada (CAT) fusionada al epitope V5.

La producción y purificación de la proteína recombinante CAT/V5 para ser utilizada como antígeno en un ensayo de ELISA, así como la puesta a punto del ensayo se describe en Materiales y Métodos, sección 28.

En la Figura 4 se esquematizan las condiciones finales en las que se utilizó este ensayo de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos anti-V5 en las muestras de suero de los animales inmunizados con las quimeras monoméricas.

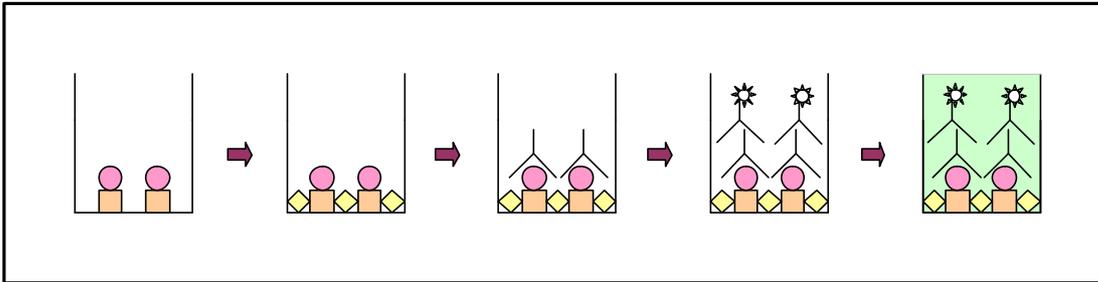


Figura 4: ELISA desarrollado para detectar anticuerpos anti-V5. Se sensibilizaron placas Maxisorp (NUNC) con 75ng/pocillo del antígeno CAT/V5 en *buffer* carbonato-bicarbonato pH9,6 toda la noche a 4°C. Se bloquearon durante 1h a 37°C con TBST-SNE-Leche. Las diluciones de los sueros a analizar se incubaron durante 1h a 37°C. Se agregó un anticuerpo anti-ratón conjugado con la enzima peroxidasa y se incubó de igual manera. Para revelar la reacción se empleó ABTS y H₂O₂ en *buffer* citrato pH5 y tras 20 minutos de incubación a 37°C se leyó la densidad óptica en un espectrofotómetro a 405nm.

Como se esquematiza en la Figura 4, las condiciones óptimas del test de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos anti-V5 resultaron ser las siguientes:

- 1) Sensibilización de placas de 96 pocillos NUNC Maxisorp con 75ng por pocillo del antígeno purificado CAT/V5 diluido en *buffer* carbonato-bicarbonato pH9,6 durante toda la noche a 4°C.
- 2) El bloqueo más eficiente consistió en el *buffer* TBS-Tween-SNE 5%-Leche 4% (80µl por pocillo), durante 1h a 37°C con agitación constante (100rpm).
- 3) Las diluciones de los sueros a analizar se realizaron en el *buffer* TBS-Tween-SNE y se sembraron por duplicado, 50µl por pocillo. Se incubaron durante 1h a 37°C con agitación constante.
- 4) La dilución de uso (1/2.000) del anticuerpo anti-ratón conjugado a la enzima peroxidasa, se preparó en TBS-Tween-SNE. Se sembraron 50µl por pocillo y se incubó durante 1h a 37°C con agitación constante.
- 5) Para revelar la reacción se empleó el cromógeno ABTS y H₂O₂ como sustrato de la enzima peroxidasa, preparados en *buffer* citrato pH5. La lectura de la densidad óptica se realizó a 405nm a los 20 minutos de agregado el sustrato.

3.2. Análisis de los sueros: 1°sangría

A los 28 días de la primera inmunización, se tomaron muestras de sangre de todos los animales y se analizó el suero mediante el test de ELISA antes mencionado para determinar la presencia de anticuerpos anti-V5.

En la Figura 5 se presentan los resultados obtenidos.

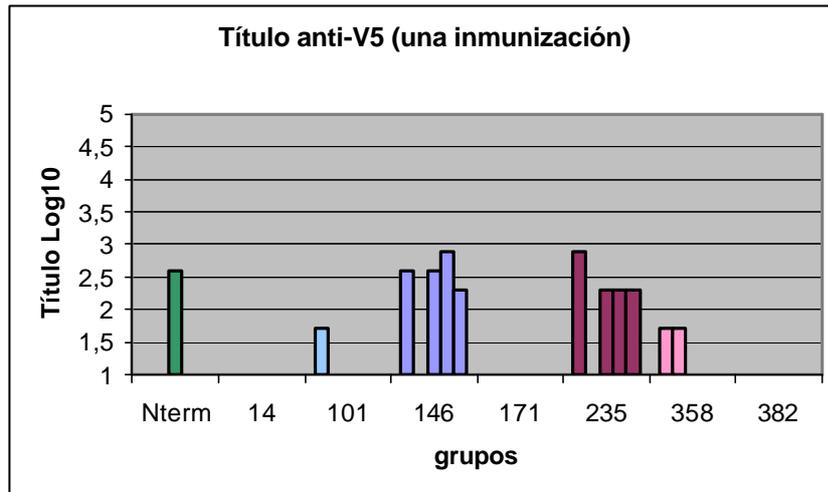


Figura 5: Título de anticuerpos anti-V5 en los sueros de animales que recibieron una inmunización con la forma monomérica de las quimeras VP6/V5. Cada grupo esta formado por 5 ratones. Cada barra del gráfico corresponde al título de anticuerpos anti-V5 de cada ratón. El título se expresa como el logaritmo en base 10 (log) de la inversa de la dilución que supera el promedio (\bar{X}) de los sueros controles (SC) más dos desvíos estandares ($\bar{X}_{SC} + 2\sigma$). Como sueros controles se utilizaron sueros de animales inmunizados con la proteína VP6wt.

Como se aprecia en la Figura 5, los grupos inmunizados con las versiones VP6/V5₁₄₆ y VP6/V5₂₃₅ de las quimeras VP6/V5 fueron los que mejor respondieron a una única inmunización con la forma monomérica de las quimeras y son significativamente distintos al resto ($p < 0,01$). En estos grupos, 4 de 5 ratones presentan anticuerpos anti-epitope V5, con un título promedio de 2 en el grupo inmunizado con la version VP6/V5₁₄₆ y un título de 1,9 para el grupo inmunizado con la versión VP6/V5₂₃₅.

Los grupos inmunizados con las versiones VP6/V5_{Nterm} y VP6/V5₁₀₁ presentan sólo un ratón con anticuerpos anti-V5. El grupo VP6/V5₃₅₈ presenta dos ratones con

anticuerpos anti-V5. Los grupos inmunizados con las versiones VP6/V5₁₄, VP6/V5₁₇₁ y VP6/V5₃₈₂ no respondieron.

3.3. Análisis de los sueros 2°sangría: efecto del *booster*

A los 30 días de la primera inmunización, los animales recibieron una dosis refuerzo de las quimeras VP6/V5 monoméricas. 30 días después de este *booster* se tomaron muestras de sangre de los animales para analizar el suero con el fin de determinar la presencia de anticuerpos anti-V5.

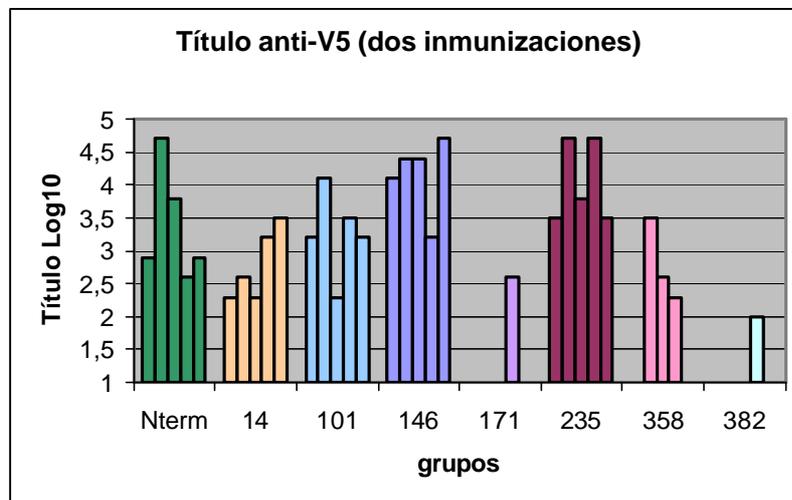


Figura 6: Título de anticuerpos anti-V5 en los sueros de animales que recibieron una dosis refuerzo. Las muestras de suero fueron tomadas a los 30 días de recibir la dosis refuerzo o *booster*. Cada barra corresponde al título de anticuerpos anti-V5 de cada ratón del grupo. El título se expresa como el logaritmo en base 10 (log) de la inversa de la dilución que supera el promedio (\bar{X}) de los sueros controles (SC) más dos desvíos estandares ($\bar{X}_{SC} + 2\sigma$). Como sueros controles se utilizaron sueros de animales inmunizados con la proteína VP6wt.

Al comparar los títulos anti-V5 obtenidos en la 1° sangría con los de la 2°sangría, se observa claramente un efecto de dosis-refuerzo.

En los grupos inmunizados con las versiones VP6/V5₁₄₆ y VP6/V5₂₃₅ aumenta el título de anticuerpos anti-V5. Estos dos grupos presentan diferencias significativas ($p < 0,01$) con respecto al resto de las versiones.

En los grupos VP6/V5_{Nterm}, VP6/V5₁₀₁ y VP6/V5₃₅₈, en los que con la primera inmunización sólo un ratón de cinco presentaba anticuerpos anti-V5, luego del *booster* aumentó el número de animales que respondieron: en el caso de las versiones VP6/V5_{Nterm} y VP6/V5₁₀₁, todos los integrantes del grupo presentaron anticuerpos anti-V5, mientras que para la versión VP6/V5₃₅₈ los animales respondedores fueron tres de cinco.

Los grupos VP6/V5₁₄, VP6/V5₁₇₁ y VP6/V5₃₈₂, que con una sola inmunización no habían presentado anticuerpos anti-V5, luego de la administración del *booster* sí lo hicieron, siendo notable el caso del grupo vacunado con la versión VP6/V5₁₄ en el que todos los animales del grupo tienen título de anticuerpos anti-V5. En las versiones VP6/V5₁₇₁ y VP6/V5₃₈₂, sólo un ratón del grupo respondió a la inmunización luego del *booster*.

3.4. Respuesta a la proteína *carrier*

Con el objeto de determinar si las diferencias en la respuesta humoral inducida por las distintas quimeras resultaba de la influencia que la posición de la inserción tenía en el reconocimiento del epítopo V5 por parte de células B, si era causa de diferencias en las formulaciones vacunales o si alguna de las inserciones interfería con el procesamiento de la quimera por parte de los linfocitos T colaboradores (por ejemplo, interrumpiendo un epítopo T fuerte), se evaluó la respuesta inmune humoral inducida contra la proteína VP6.

Con este fin, se analizó la reactividad de los sueros de los distintos grupos frente a la proteína VP6 mediante un ensayo de ELISA de captura contra DLPs derivadas de rotavirus.

Los resultados se muestran en la Figura 7.

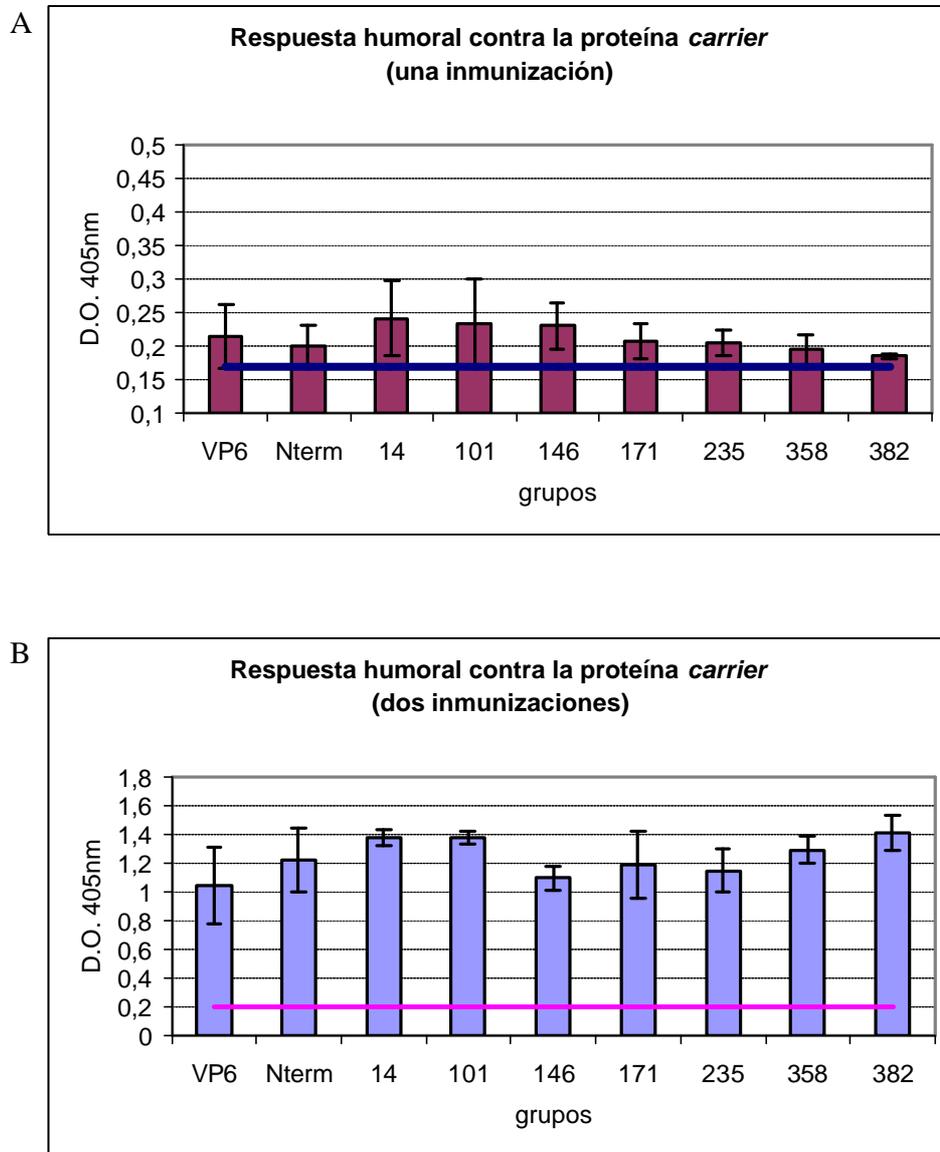


Figura 7: Respuesta humoral contra la proteína *carrier* VP6. Los sueros de los animales inmunizados con las quimeras VP6/V5 monoméricas fueron analizados mediante un ensayo de ELISA para detectar la presencia de anticuerpos anti-VP6. Cada barra corresponde al promedio de D.O. obtenida para cada grupo y su desvío estándar. La línea horizontal corresponde al punto de corte calculado como el promedio de los sueros controles, en este caso sueros preinmunes (SN), más dos desvíos estándar ($X_{SN} + 2\sigma$). (A) Analisis de la primera sangría. (B) Analisis de la segunda sangría.

Como se puede apreciar en la Figura 7, la respuesta humoral contra la proteína *carrier* VP6 es similar entre los distintos grupos y aumenta luego de administrar la dosis refuerzo. Este resultado señala que las formulaciones vacunales efectivamente fueron equivalentes, que los animales fueron correctamente inmunizados y que la diferencias entre los grupos en el título de anticuerpos anti-V5 se deben a la posición del epítopo en la proteína *carrier* y no a la interrupción de epítopos T-*helpers* dentro de la proteína VP6.

3.5. Cinética de anticuerpos en los animales inmunizados con las quimeras VP6/V5 en su forma monomérica

Los animales inmunizados con una dosis refuerzo de las quimeras VP6/V5 fueron sangrados cada 30 días durante 5 meses para analizar la cinética de los anticuerpos anti-V5.

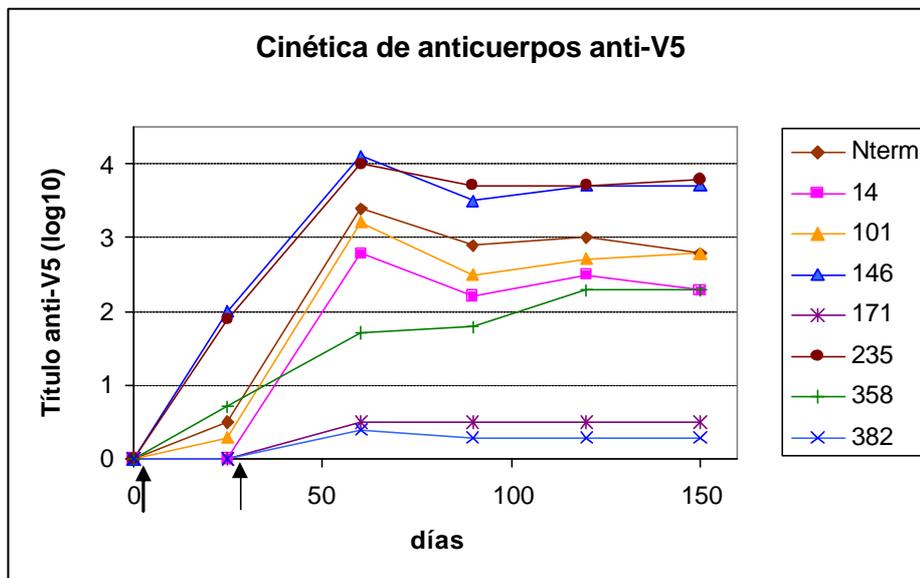


Figura 8: Cinética de anticuerpos anti-V5 en los animales inmunizados con las quimeras VP6/V5. Cada punto corresponde al promedio del título de anticuerpos anti-V5 de los animales que integran los distintos grupos. Las flechas señalan los días de inmunización.

Se puede observar que a los 150 días de iniciado el experimento (120 días post-dosis refuerzo) el título de anticuerpos anti-V5 se mantiene constante.

4. Efecto de la presencia de respuesta inmune contra el *carrier* previa a la inmunización con las quimeras VP6/V5

Dada la alta prevalencia de rotavirus a campo (77% en el ganado bovino argentino), se decidió analizar si la presencia de anticuerpos contra la proteína VP6 previos a la inmunización con las quimeras VP6/V5 podría afectar de alguna manera la inducción de una respuesta inmune contra el epítopo foráneo presentado en las quimeras.

Para este fin, se preinmunizaron grupos de ratones por un lado con la proteína VP6wt de la cepa SA11 (homóloga a las quimeras) y por otro, con rotavirus bovino de la cepa NCDV.

Una vez que se verificó la presencia de anticuerpos anti-VP6 en los dos grupos, los animales recibieron una dosis de las versiones Nterm, 14 y 235 de las quimeras VP6/V5 en su forma monomérica (5µg por ratón).

A los 25 días de la inoculación de las quimeras, se tomaron muestras de sangre y los sueros se analizaron mediante el test de ELISA desarrollado en el punto 3.1.

Los resultados se muestran en la Figura 9.

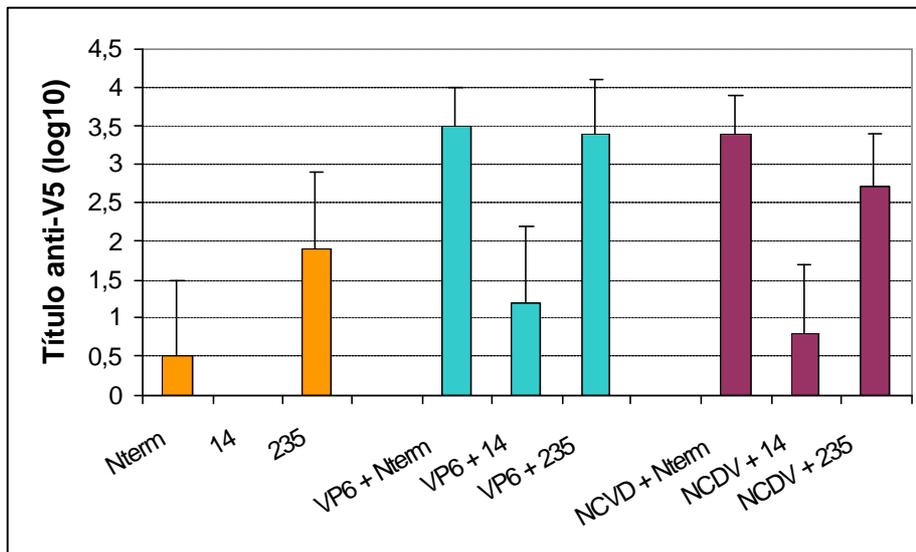


Figura 9: Respuesta inmune contra el epítotope V5 en animales pre-inmunizados con VP6wt o con rotavirus. Cada barra corresponde al título promedio de cada quimera analizada. Las barras de color naranja corresponden a los animales que sólo recibieron una inmunización con las quimeras. Las barras de color turquesa corresponden a los animales pre-inmunizados con la proteína VP6wt y luego inmunizados con las quimeras. Las barras de color bordó corresponden a los animales pre-inmunizados con el rotavirus bovino cepa NCDV y luego inmunizados con las quimeras.

Como se puede apreciar en la Figura 9, la existencia de una respuesta inmune contra la proteína *carrier* previa a la inmunización con las quimeras produce un efecto estimulante en la respuesta humoral contra el epítotope V5 presente en las quimeras.

Los animales que fueron preinmunizados con la proteína VP6wt de la cepa SA11 (homóloga al *carrier* de la quimera) presentan, en promedio, títulos más altos que los animales inmunizados con rotavirus cepa NCDV (heteróloga al *carrier* de la quimera), aunque no hay diferencias significativas ($p > 0,05$).

El efecto estimulante de la respuesta inmune contra la proteína *carrier* preexistente a la inmunización con las quimeras es sumamente notorio en las versiones VP6/V5_{Nterm} y VP6/V5₁₄. En el caso de la versión VP6/V5_{Nterm}, hay diferencias significativas ($p < 0,01$) entre el grupo que sólo recibe la quimera y los grupos pre-inmunizados con VP6 o rotavirus. En el caso de la versión VP6/V5₁₄, el grupo que sólo fue inmunizado con la quimera no presenta animales con una respuesta

humoral contra el epítotope V5, mientras que en los grupo pre-inmunizados sí hay animales que desarrollaron anticuerpos contra el epítotope V5. Por ejemplo, en aquellos grupos que recibieron una dosis de VP6wt antes de la inoculación con la quimera, 3 de 5 animales presentaron títulos de anticuerpos anti-V5 y en aquellos que recibieron rotavirus cepa NCDV antes de la inmunización con las quimeras, fueron 2 de 5 los animales respondedores.

1. Características antigénicas de los multímeros VP6/V5+VP2

1.1 Obtención de los multímeros mixtos

Con el objeto de caracterizar antigénica y estructuralmente las quimeras VP6-V5 en su forma multimérica, se realizaron coinfecciones de células Sf9 con los baculovirus recombinantes para las quimeras seleccionadas y el baculovirus AcVP2_{SA11}wt, con una relación de moi igual a 5:8 (VP6:VP2), con el fin de estabilizar las probables VLPs. A los 5 días postinfección, se cosecharon los sobrenantes de cultivo y se clarificaron. Los multímeros se concentraron por ultracentrifugación sobre colchón de sacarosa 30% p/p a 70.000g durante 90 min. Los *pellets* se resuspendieron en *buffer* TNMC pH 7 y se mantuvieron a 4°C hasta su uso. La presencia en el *pellet* de ambas proteínas (VP2 y las diferentes versiones de VP6) se confirmaron por Western blot (resultados no mostrados).

1.2 Accesibilidad del epítipo V5 e influencia de su inserción en la antigenicidad de los multímeros VP6-V5/VP2

Con el objeto de evaluar indirectamente la accesibilidad de la secuencia foránea a las moléculas efectoras de la respuesta inmune (inmunoglobulinas en la superficie de los linfocitos B) y de determinar de qué manera la inserción de una secuencia aminoacídica incide en la antigenicidad de VP6 en su conformación multimérica, se desarrollaron ensayos de ELISA *sandwich* empleando un suero policlonal de conejo anti rotavirus como anticuerpo de captura. El material particulado obtenido mediante ultracentrifugación sobre colchones de sacarosa de sobrenadantes de coinfección con los diferentes baculovirus codificantes para las quimeras VP6-V5 y para la proteína del *core* VP2 fue enfrentado, luego de la captura, con anticuerpos anti V5 o anti rotavirus de una especie diferente y su presencia revelada como se esquematiza en la Figura 1. Como control, se emplearon partículas VP6_{wt}/VP2.

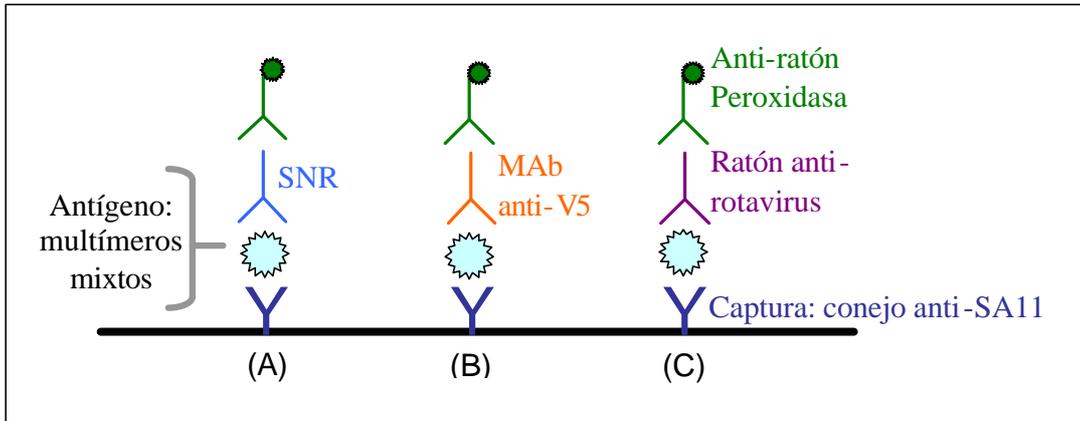


Figura 1: ELISA *sandwich* para caracterizar los multímeros mixtos. Como captura se utilizó un suero de conejo anti-SA11 en una dilución 1:2000. Luego del bloqueo, se sembraron los multímeros mixtos obtenidos por ultracentrifugación a través de colchones de sacarosa. Cada quimera se evaluó en paralelo frente a tres sueros: (A) *pool* de suero normal de ratón (SNR), (B) anticuerpo monoclonal anti-epitope V5 y (C) *pool* de sueros de ratón anti-rotavirus. Finalmente, se agregó un suero anti-ratón conjugado con la enzima peroxidasa y se reveló la reacción por el agregado de ABTS + H₂O₂.

Los resultados del ensayo de ELISA *sandwich* se reumen en la Tabla 1.

Reactividad frente a:	VP6	Nterm	14	101	146	171	235	301	358	382
Monoclonal anti-V5	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Policlonal anti-rotavirus	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-

Tabla 1: Caracterización de los multímeros mixtos mediante ensayos de ELISA. Se indica como positivo (+) cuando la D.O. para esa reacción antígeno-anticuerpo supera la D.O. promedio obtenida con el SNR más dos desvíos estandar. Se indica resultado negativo (-) cuando la D.O. no supera el punto de corte establecido.

Los resultados obtenidos muestran que las partículas obtenidas mediante la coexpresión de VP2 con las quimeras VP6-V5₁₄₆ y VP6-V5₁₇₁ exponen el epitope V5 al exterior, ya que fueron específicamente reconocidas por el anticuerpo monoclonal anti V5, mientras que los otros multímeros VP6/V5 no reaccionan con este anticuerpo, al igual que el multímero VP6_{wt}.

Los resultados mostraron, además, que no todas las estructuras multiméricas pudieron ser reconocidas por el *pool* de sueros policlonales anti rotavirus, sugiriendo que la inserción de la secuencia V5 en algunas de las posiciones aminoacídicas de VP6 altera el patrón de epitopes conformacionales o discontinuos que VP6 presenta en su habitual interacción con VP2 cuando forma parte del virión o de DLPs (partículas de doble cápside). Debido a esta alteración en el patrón de epitopes, no puede demostrarse la exposición del péptido V5 en el resto de las versiones.

2. Inmunogenicidad de los multímeros VP6/V5+VP2

Con el fin de evaluar la inmunogenicidad de los multímeros mixtos (VP6/V5 + VP2) obtenidos por ultracentrifugación a través de colchón de sacarosa, tal como se mencionó en la sección 1.1 de este capítulo, se realizó un ensayo de inmunización en el modelo murino.

Para el ensayo de inmunización se seleccionaron las quimeras VP6/V5₁₄, VP6/V5₁₄₆, VP6/V5₁₇₁, VP6/V5₂₃₅ y VP6/V5₃₀₁. Estas quimeras fueron seleccionadas tomando distintas consideraciones. Por ejemplo, VP6/V5₁₄₆ y VP6/V5₂₃₅ fueron elegidas por ser las mejores inductoras de anticuerpos anti V5 en su forma monomérica. Además, la versión VP6/V5₁₄₆ como multímero, expone el epitope V5 (Tabla 1 de este capítulo). La quimera VP6/V5₁₄ junto con VP6/V5₂₃₅, en sus formas multimérica no son reconocidas por distintos *pools* de sueros policlonales anti rotavirus (Tabla 1 de este capítulo) y por lo tanto resultaron interesantes para evaluar a la proteína VP6 como *carrier* en distintas conformaciones. Por último, las versiones VP6/V5₁₇₁ y VP6/V5₃₀₁ fueron seleccionadas por presentar el epitope V5 en *loops* de la proteína VP6, donde la quimera VP6/V5₁₇₁ expone el epitope volviéndolo accesible al reconocimiento de un anticuerpo monoclonal anti V5 mientras que la versión VP6/V5₃₀₁ no muestra reactividad frente al mismo anticuerpo monoclonal (Tabla 1).

Se inmunizaron ratones hembra Balb/c con los multímeros mixtos seleccionados conteniendo 30ng de proteína VP6 quimérica, lo que corresponde a aproximadamente 0,9ng de péptido.

Se realizaron formulaciones oleosas en adyuvante incompleto de Freund y los animales fueron inoculados por vía i.p. en los días 0 y 21. Se tomaron muestras de suero en los días 20 y 41, con el fin de evaluar la respuesta humoral inducida mediante ensayos de ELISA.

2.1 Respuesta inmune humoral contra el epítotope V5

En primer término, se evaluó la respuesta humoral inducida contra el epítotope V5 mediante la inmunización con multímeros mixtos, utilizando para ello el test de ELISA desarrollado en el Capítulo III.

Los resultados se muestran en la Figura 2.

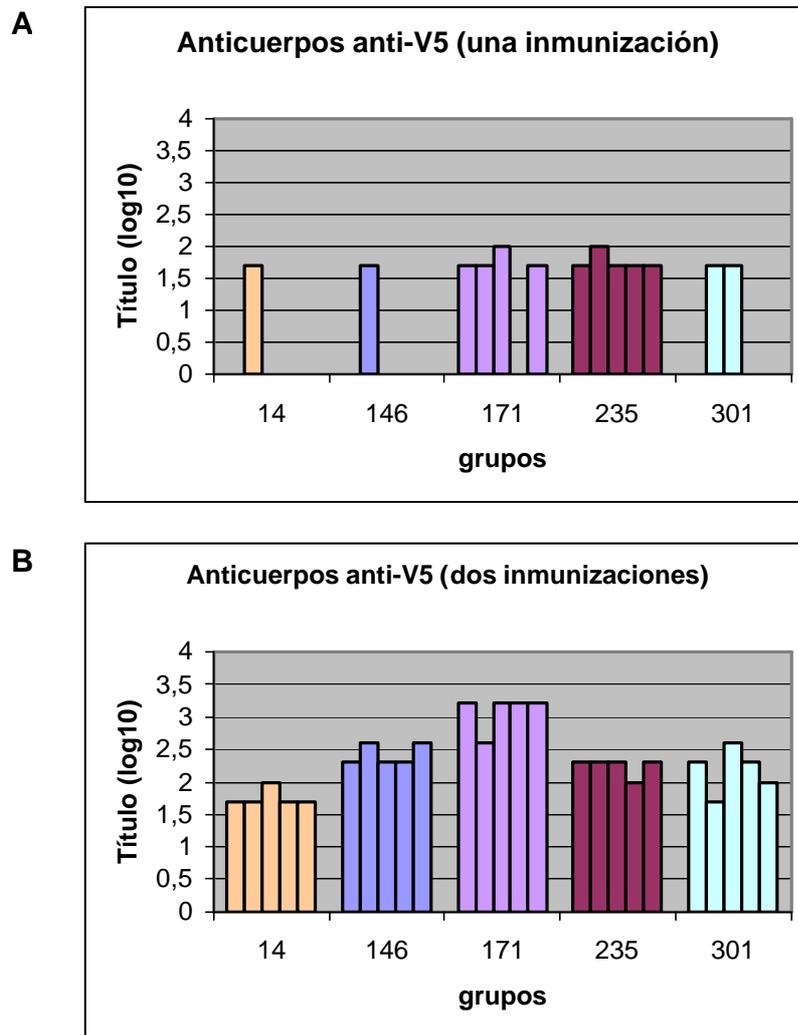


Figura 2: Título de anticuerpos anti-V5 en los sueros de animales inmunizados con los multímeros mixtos. (A) Las muestras de suero fueron tomadas a los 20 días de iniciado el experimento. (B) Las muestras de suero fueron tomadas a los 20 días de recibir el refuerzo (41 días de iniciado el experimento). Cada barra corresponde al título de anticuerpos anti-V5 de cada ratón del grupo. El título se expresa como el logaritmo en base 10 (log) de la inversa de la dilución que supera el promedio (X) de los sueros controles (SC) más dos desvíos estándares ($X_{SC} + 2\sigma$). Como sueros controles se utilizaron sueros de animales inmunizados con multímeros mixtos VP6wt + VP2.

Los grupos inmunizados con las versiones VP6/V5₁₇₁ y VP6/V5₂₃₅ fueron los que mejor respondieron a una única inmunización con la forma multimérica de las quimeras (Figura 2, panel A). Estos grupos presentan anticuerpos anti-V5 con un título promedio de 1,76 para el grupo inmunizado con la quimera VP6/V5₂₃₅ y un título de 1,42 para el grupo inmunizado con la versión VP6/V5₁₇₁.

Al comparar los títulos anti-V5 obtenidos en la primera sangría con los de la segunda (Figura 2, panel A y B), se observa claramente un efecto de dosis-refuerzo: todos los animales fueron respondedores.

La quimera que resultó mejor inductora de anticuerpos anti V5 en su forma multimérica fue la versión VP6/V5₁₇₁ y fue significativamente distinta al resto ($p < 0,01$). Los títulos promedio obtenidos para cada grupo luego de la dosis refuerzo fueron: 1,76 (para la quimera VP6/V5₁₄); 2,42 (para la quimera VP6/V5₁₄₆); 3 (para la quimera VP6/V5₁₇₁); 2,24 (para la quimera VP6/V5₂₃₅) y 2,2 (para la quimera VP6/V5₃₀₁).

Es notable remarcar que estos anticuerpos se obtuvieron mediante la inmunización con sólo 30 ng de proteína recombinante (equivalente a 0,9ng de péptido V5), cuando habitualmente la dosis de péptido acoplado a un *carrier* necesaria para despertar una respuesta inmune en el modelo murino es entre 5 y 100µg de proteína recombinante (Harlow y Lane, 1988).

2.2 Respuesta inmune humoral contra la proteína *carrier*

Como los multímeros seleccionados para el ensayo de inmunización de ratones presentaban diferencias estructurales (Tabla 1 de este Capítulo) se decidió evaluar si esas diferencias tenían algún efecto en la inducción de una respuesta inmune humoral contra la proteína *carrier*.

Se evaluó la reactividad de los sueros de los animales inmunizados con los multímeros frente a un ensayo de ELISA de captura para DLPs derivadas de rotavirus, con el fin de evaluar la capacidad de los anticuerpos anti VP6 presentes en esos sueros de reconocer a la proteína VP6 nativa.

Los resultados se muestran en la Figura 3.

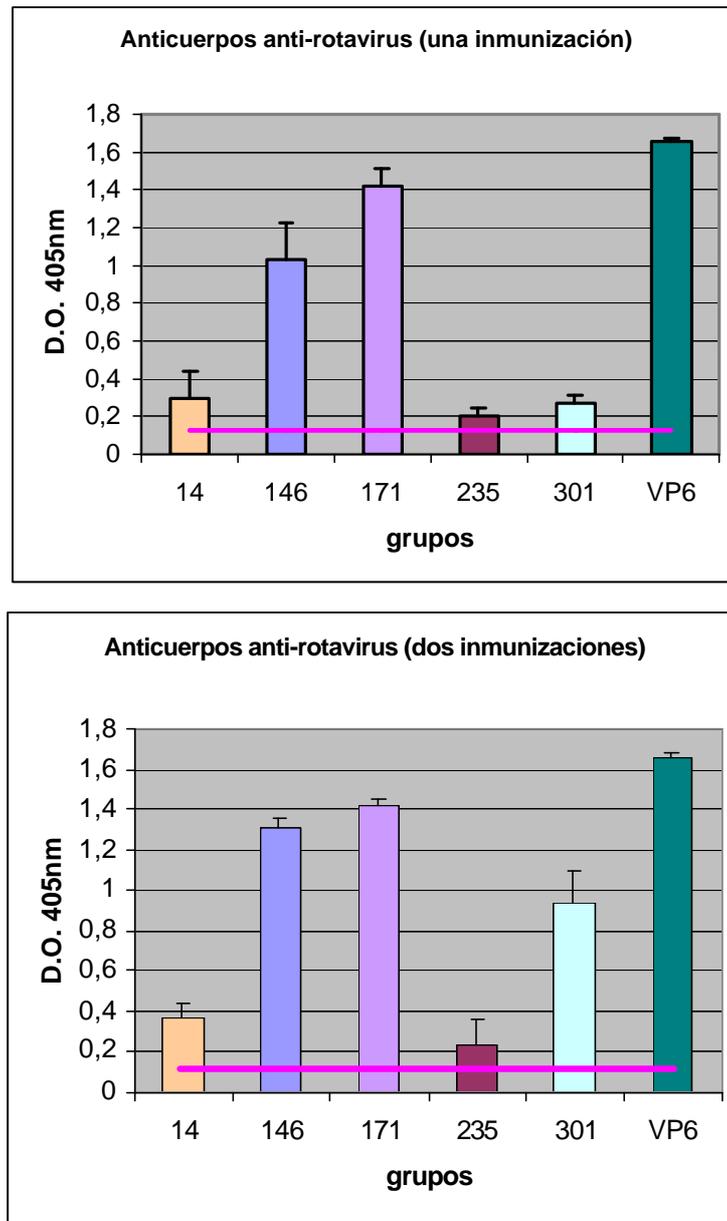


Figura 3: Respuesta humoral contra la proteína *carrier* VP6. Los sueros de los animales inmunizados con los multímeros mixtos VP6/V5 + VP2 fueron analizados mediante un ensayo de ELISA para detectar la presencia de anticuerpos anti-VP6. Cada barra corresponde al promedio de D.O. obtenido para cada grupo y su desvío estándar. La línea horizontal correspond el punto de corte calculado como el promedio de los sueros controles, en este caso sueros preinmunes (SN), más dos desvíos estándar ($X_{SN} + 2\sigma$). (A) Análisis de la primera sangría. (B) Análisis de la segunda sangría.

A diferencia de lo observado con las quimeras en su forma monomérica (ver Capítulo III, Figura 7), los multímeros inducen anticuerpos anti-VP6 que reconocen la proteína VP6 nativa con diferente afinidad.

Las quimeras VP6/V5₁₇₁ y VP6/V5₁₄₆ son las que mejor inducen anticuerpos que reconocen a la proteína VP6 presente en los viriones de rotavirus y son significativamente distintas del resto ($<0,01$), mientras que en la inmunización con las versiones VP6/V5₁₄ y VP6/V5₂₃₅, los ratones reconocen pobremente la proteína VP6 nativa.

El análisis de estos resultados junto a los obtenidos en el análisis estructural de los multímeros mediante un test de ELISA *sandwich* (Tabla 1 de este capítulo), donde las quimeras VP6/V5₁₇₁ y VP6/V5₁₄₆ son reconocidas por distintos *pools* de sueros anti rotavirus mientras que las quimeras VP6/V5₁₄ y VP6/V5₂₃₅ no fueron capturadas o reconocidas por esos mismo sueros, indica una vez más que las quimeras presentan diferencias estructurales en cuanto a los epitopes conformacionales que presentan.

Se evaluó además, la reactividad de estos sueros frente a la proteína VP6wt desnaturalizada en un ensayo de *Western blot* (Figura 4).

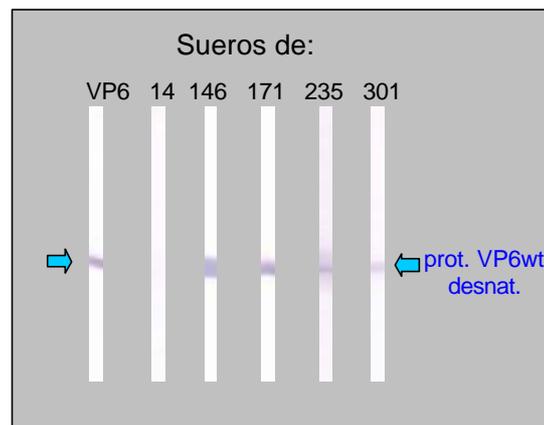


Figura 4: Reactividad contra la proteína VP6wt de los sueros inducidos en el ensayo de inmunización con los multímeros. Se realizaron pools de los sueros de cada grupo y se ensayó la reactividad frente a la proteína VP6wt en un ensayo de *Western blot*. Los pools fueron analizados en una dilución 1/100.

Como se puede apreciar en la Figura 4, los multímeros VP6/V5₁₄₆, VP6/V5₁₇₁, VP6/V5₂₃₅ y VP6/V5₃₀₁ inducen anticuerpos contra la proteína carrier capaces de reconocerla cuando es presentada en su forma desnaturalizada, mientras que la versión VP6/V5₁₄ no puede hacerlo. Esta quimera carece del sitio lineal inmunodominante de VP6 por la inserción del epítopo V5 (Capítulo II, Figuras 2 y 4) y si bien es capaz de inducir anticuerpos contra epítopos conformacionales que pueden reconocer en cierta medida a la proteína VP6 nativa, no puede inducir anticuerpos contra el epítopo lineal inmunodominante de VP6 por carecer de él y entonces no presenta reactividad alguna frente a la proteína VP6 desnaturalizada.

3. Análisis estructural de las VLPs

3.1 Efecto de la inserción del epítopo V5 en el ensamble de las DLPs

Como se describió anteriormente, cuando las proteínas VP2 y VP6 de rotavirus son coexpresadas, forman VLPs de dos capas fácilmente purificables mediante gradientes de densidad de CsCl. Cuando es expresada sola, VP2 forma agregados hidrofóbicos que en ausencia de detergentes permanecen asociados con membranas celulares y no es posible su detección como una banda en gradientes de densidad (Labbé et al., 1991).

Los *pellets* obtenidos mediante ultracentrifugación de sobrenadantes de coinfecciones con los baculovirus que expresan VP2 y los que expresan las diferentes versiones de VP6/V5 fueron resuspendidos y sometidos a ultracentrifugación en gradientes de densidad de CsCl.

La visualización de los gradientes mostró patrones característicos de bandas opacas, que fueron colectadas para su posterior análisis según se muestra en la Figura 2.

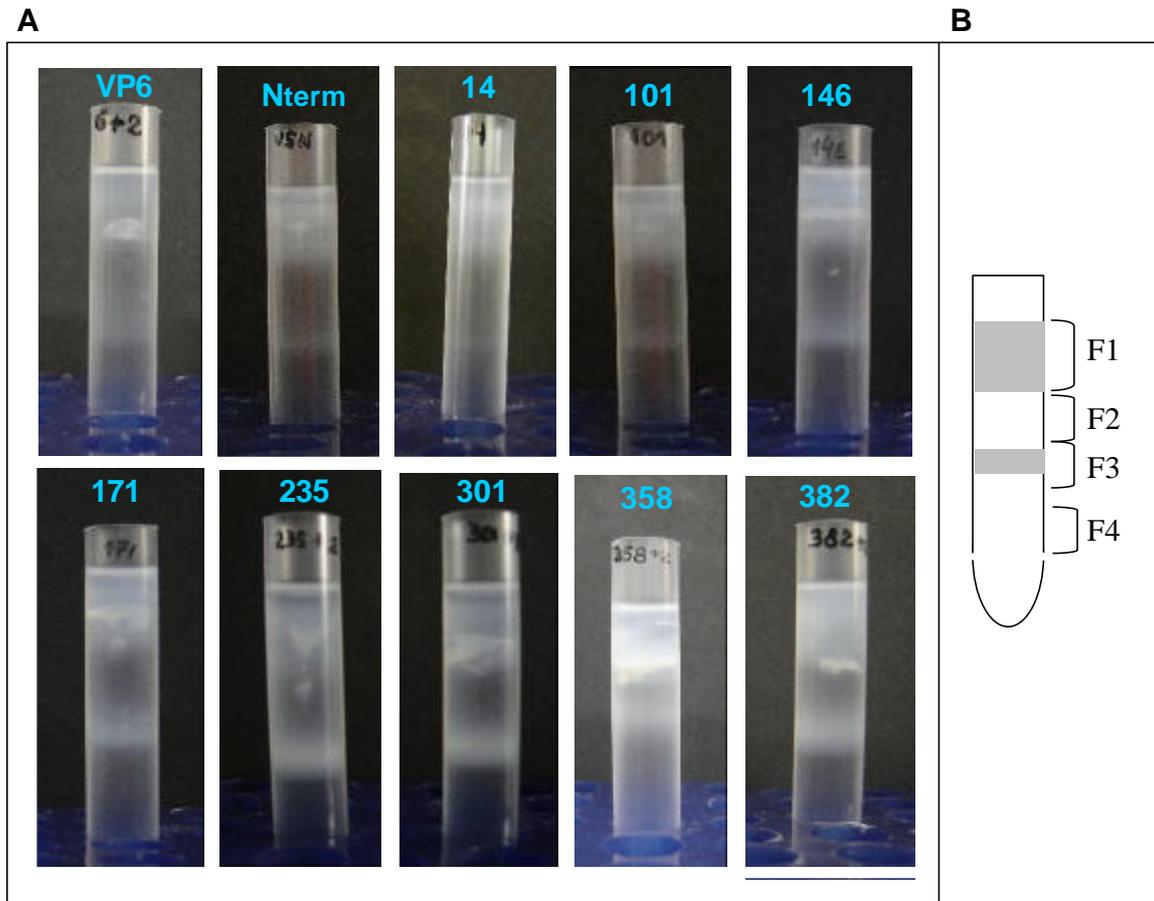


Figura 5. Gradientes de CsCl. (A) Fotografías de cada uno de los gradientes de CsCl. (B) Esquema de cosecha de las fracciones de los gradientes de CsCl.

En particular, dos bandas mayoritarias aparecieron en todos los gradientes: una superior (F1), de opacidad más conservada, con gran cantidad de material, presumiblemente compuesta por baculovirus presentes en los sobrenadantes de infección, capaces de atravesar los colchones de sacarosa y comigrar con los multímeros mixtos VP2-VP6 y una inferior (F3), de opacidad menos conservada y formada probablemente por VLPs.

Para determinar la composición de tales bandas, las diferentes fracciones fueron analizadas mediante ensayos de *Western blot* diseñados para detectar proteínas baculovirales, proteínas de rotavirus o el epítipo V5. Para ello, cada fracción del gradiente fue dializada contra *buffer* TNMC pH 7 y concentrada mediante ultracentrifugación. Los resultados se muestran en las Figuras 6 y 7.

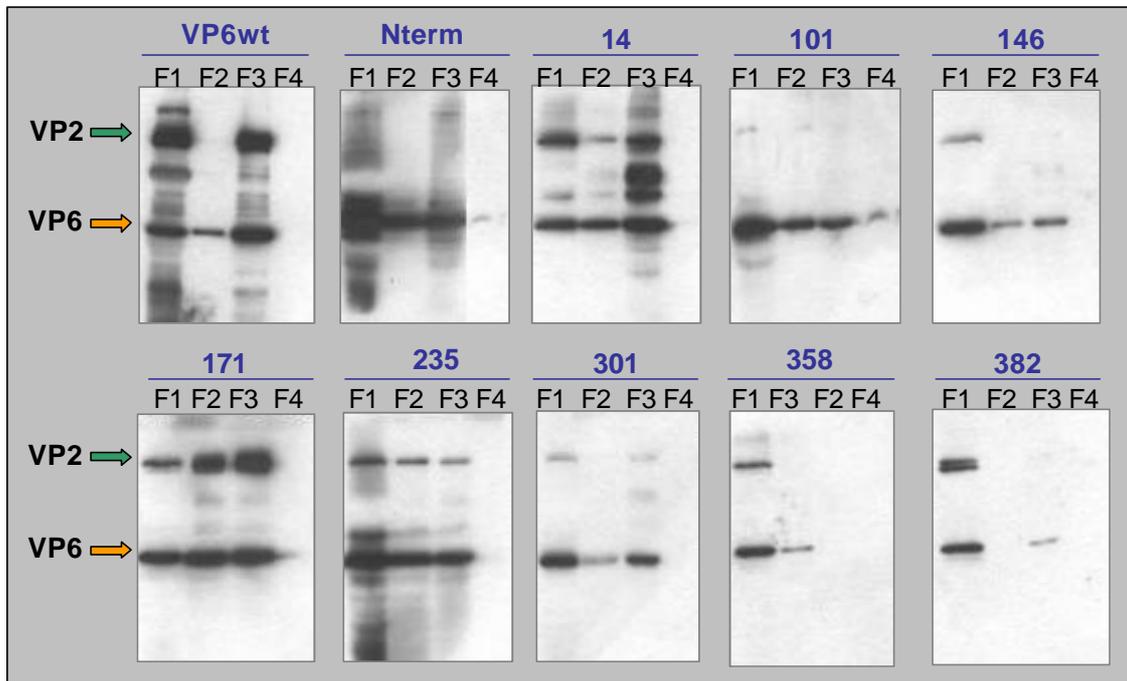


Figura 6. Análisis de las fracciones de los gradientes de CsCl mediante ensayos de Western blot. Se muestra la reactividad de las distintas fracciones, en el caso de la proteína VP6wt se utilizó un suero policlonal anti rotavirus, mientras que para las quimeras VP6/V5 se empleó una mezcla de anticuerpos monoclonales: anti V5 + anti VP2. Los *Western blots* se revelaron con quimioluminiscencia.

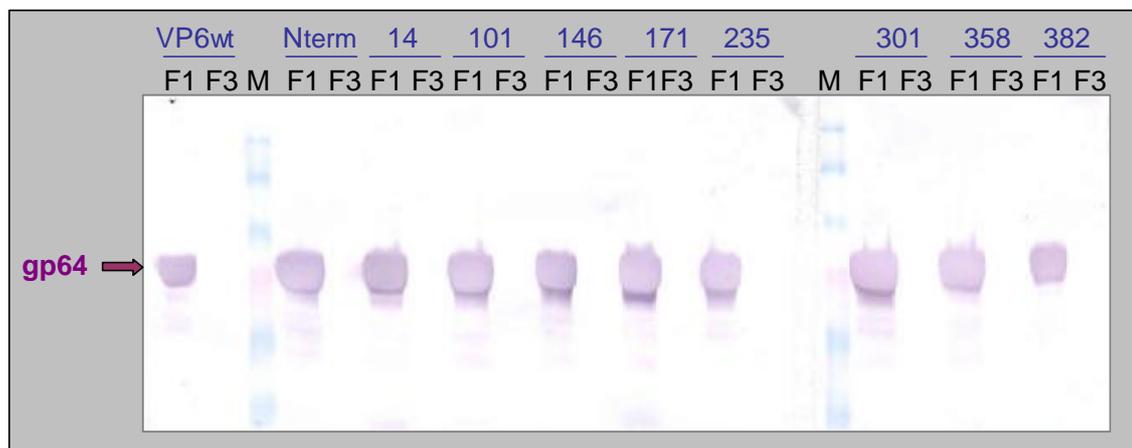


Figura 7. Análisis de las fracciones F1 y F3 de los gradientes de CsCl para revelar la presencia de baculovirus. Se muestra la reactividad de las fracciones F1 y F3 frente a un anticuerpo monoclonal que reconoce a la glicoproteína baculoviral gp64 en un ensayo de *Western blot*. M: marcador de proteínas preteñido BenchMark (Invitrogen).

Los ensayos de *Western blot* confirmaron que la banda superior en los gradientes de CsCl efectivamente estaba formada mayoritariamente por baculovirus brotados (Figura 7).

En cuanto a las características de los diferentes multimeros mixtos, la distribución de reactividad positiva para ambas proteínas (VP2 y VP6) en las distintas fracciones del gradiente mostró ser diferente para las distintas quimeras. Como patrón, se tomó la distribución de las VLPs formadas por VP2 y VP6_{wt}.

La Figura 6 muestra que en las versiones VP6/V5₁₄, VP6/V5₁₇₁, VP6/V5₂₃₅ y VP6/V5₃₀₁ fue posible detectar la presencia de las proteínas VP6/V5 y VP2 en la fracción F3. En el caso de las versiones VP6/V5_{Nterm}, VP6/V5₁₀₁ y VP6/V5₁₄₆, fue posible detectar la proteína quimérica VP6/V5 en F3 pero la proteína VP2 se encuentra en el límite de lo visible. Finalmente, en el caso de las versiones VP6/V5₃₅₈ y VP6/V5₃₈₂, si bien fue posible detectar proteína VP6/V5 en la fracción F3, la proteína VP2 no pudo ser detectada y la mayor parte de la proteína quimérica queda retenida en la fracción F1 junto con los baculovirus. Esto último también sucede con la versión VP6/V5₁₄₆.

3.2 Características morfológicas de las VLPs

Los patrones diferenciales de distribución en los gradientes de CsCl de las proteínas VP6/V5 y VP2 para cada una de las quimeras parece indicar una vez más, que los multímeros adoptan estructuras con conformaciones distintas, que afectan la densidad y el reconocimiento por distintos sueros policlonales (Figura 1 de este Capítulo).

Con el fin de evaluar la morfología del material particulado de la fracción 3 en las distintas quimeras, cada una de las fracciones F3 fue analizada mediante microscopía electrónica.

Los resultados de las micrografías electrónicas obtenidas se muestran en la Figura 6.

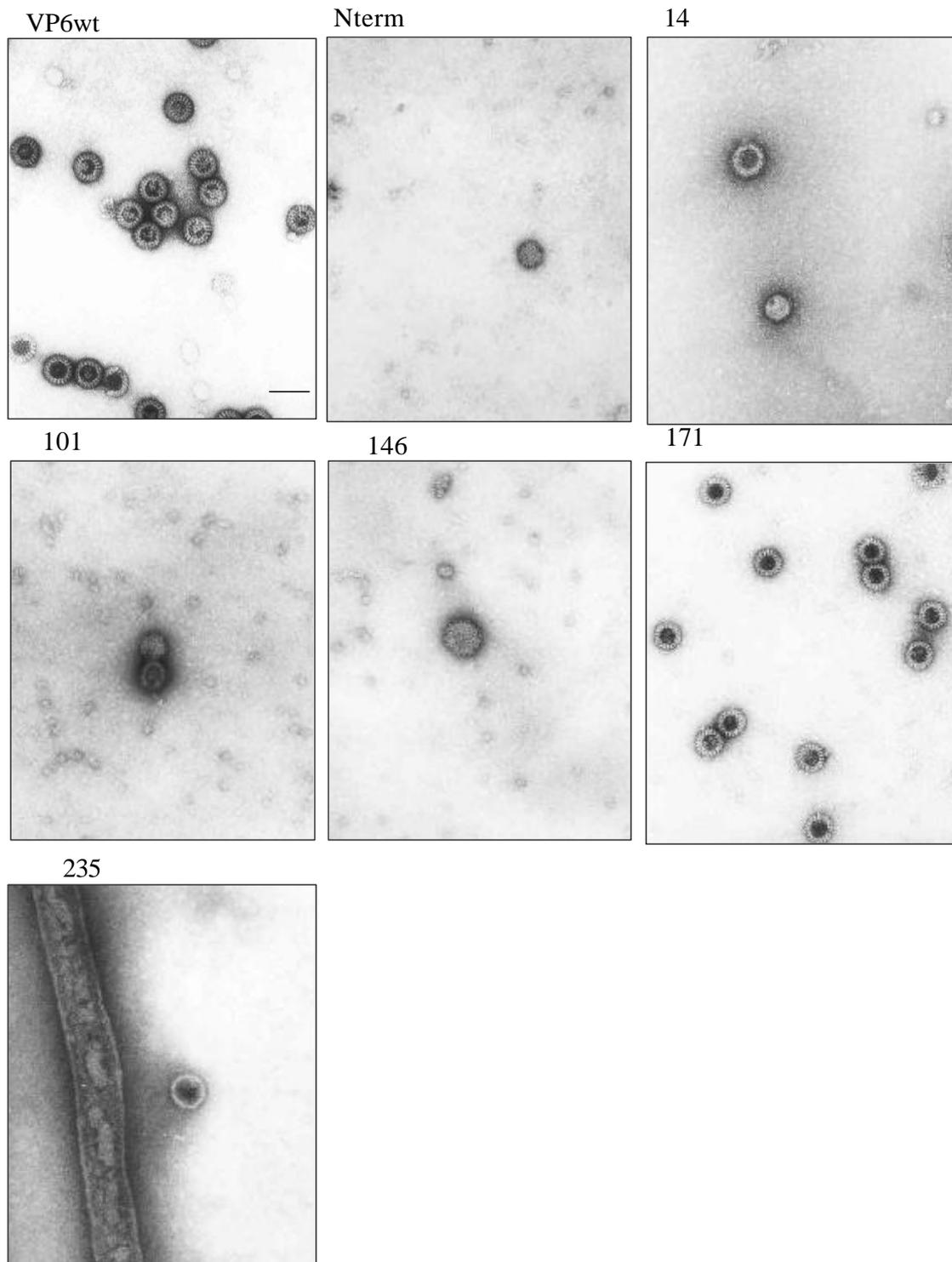


Figura 6: Observación de VLPs en las fracciones F3 de los gradientes de CsCl. Fotografías tomadas en el microscopio electrónico con X50K de aumento. La barra corresponde a 100nm.

Al observar las fotografías de la Figura 6, se puede apreciar que las VLPs basadas en la quimera VP6/V5₁₇₁ + VP2 son, a simple vista, las más parecidas a las VLPs formadas por las proteínas VP6wt + VP2. A diferencia de lo que sucede con el resto de las quimeras, las VLPs basadas en la versión VP6/V5₁₇₁ se obtienen en abundante cantidad, al igual que las VLPs basadas en la proteína VP6wt.

Un análisis con mayor detalle determinó para las VLPs formadas por la proteína VP6wt un radio promedio de 63nm. Este resultado coincide con los obtenidos por Crawford y col., en 1994 y por Charpillienne y col., en 2002.

El radio promedio obtenido para las VLPs basadas en las distintas quimeras VP6/V5 se resume en la siguiente tabla.

VLPs (6 + 2)	RADIO PROMEDIO
VP6wt	63 ± 2,6 nm
VP6/V5 _{Nterm}	78 ± 10 nm
VP6/V5 ₁₄	82 ± 7 nm
VP6/V5 ₁₀₁	78 ± 9,5 nm
VP6/V5 ₁₄₆	86 ± 9,3 nm
VP6/V5 ₁₇₁	69 ± 3,4 nm
VP6/V5 ₂₃₅	76 ± 9 nm

Tabla 2: Radio promedio de las VLPs quiméricas VP6/V5 + VP2. EL radio promedio de las VLPs VP6/V5 + VP2 se calculó mediante el análisis de al menos 10 VLPs para cada versión de las quimeras. Se indica entre paréntesis el desvío estándar.

Teniendo en cuenta el parámetro del radio promedio de las VLPs quiméricas se observa que las VLPs basadas en la quimera VP6/V5₁₇₁ son las más similares a las VLPs basadas en la proteína VP6wt (69 y 63 nm respectivamente, contra radios promedio mayores a 76 nm para el resto de las quimeras). Además, las VLPs de VP6/V5₁₇₁ presentan menor variabilidad en el tamaño promedio de las

DLPs que el resto de las quimeras. Esto puede ser un indicio de la estabilidad de las VLPs basadas en VP6/V5₁₇₁.

Teniendo en cuenta los distintos análisis a los que fueron sometidos los multímeros de las quimeras VP6/V5, se puede concluir que la inserción de un epítoto heterólogo en la posición aminoacídica 171 de la proteína VP6 no afecta la capacidad de formar VLPs estables, que exponen el epítoto en su superficie volviendolo accesible al reconocimiento por parte de linfocitos B y resulta el mejor multímero en inducir una respuesta inmune humoral contra el péptido heterólogo.

El desarrollo de vacunas no convencionales contra patógenos de interés veterinario estuvo basado en gran medida en el reconocimiento y la utilización de sitios antigénicos derivados de proteínas involucradas en la respuesta inmune protectora. Estos antígenos recombinantes, ya sea solos o formando parte de proteínas de fusión, producidos de manera monomérica y en forma soluble, resultaron en general pobres inmunógenos comparados con los mismos antígenos presentados por virus o bacterias en vacunas inactivadas o atenuadas (Ghiasi et al., 1992; Taboga et al., 1997; Baldwin et al., 1998). De hecho, a menudo se requiere la combinación de tales subunidades proteicas recombinantes con potentes adyuvantes para lograr despertar respuestas inmunes adecuadas contra el antígeno presentado. Para aumentar estas respuestas se recurrió en algunos casos al empleo de virus tales como vaccinia, adenovirus y herpesvirus (Dittmer et al., 1999; Elahi et al., 1999; Willemsse et al., 1996) y a bacterias como *Salmonella*, *Escherichia coli* o BCG (Honda et al., 1995; Wang et al., 1999) como vectores replicantes para la presentación al sistema inmune de antígenos protectores contra patógenos de interés.

Aunque este enfoque es atractivo para lograr simplificar esquemas de vacunación y aumentar la inmunogenicidad de antígenos solubles, los riesgos relacionados con el uso de esta clase de vacunas basadas en el uso de vectores vivos y la pobre confianza en los procesos de atenuación pueden atentar contra la aprobación de este tipo de vacunas, particularmente en poblaciones inmunocomprometidas. Esta consideración tiene indudablemente un impacto en la salud pública y es particularmente significativo en el caso de la medicina veterinaria, donde el costo de la vacuna debe ser comparado frente al costo de un animal vacunado.

Es por esto que resulta crucial el desarrollo de estrategias que aumenten la eficacia de las vacunas a subunidades o peptídicas.

Las partículas semejantes a virus (VLPs) son un tipo altamente eficiente de vacunas a subunidad que imitan la estructura de la partícula viral sin el requerimiento de contener el material genético infeccioso. Las VLPs están formadas por proteínas de origen viral que son capaces de autoensamblarse en

partículas similares estructural e inmunogénicamente a los auténticos virus, aún cuando son expresadas en sistemas heterólogos. Así, con la intención de aumentar la inmunogenicidad de acotados sitios antigénicos involucrados en la neutralización de distintos patógenos, se expresaron diversos péptidos genéticamente acoplados a VLPs. Debido a su estructura espacial, los sitios antigénicos son presentados al sistema inmune de manera multimérica, asociados a proteínas inmunogénicas, de manera que con muy pequeñas dosis pueden alcanzarse elevados niveles de respuesta inmune. Esto pudo ser demostrado claramente en VLPs quiméricas derivadas de la proteína core del HBV con la inserción de un péptido de rinovirus. El péptido presentado por la VLP fue diez veces más inmunogénico que el acoplado a la proteína KLH y cien veces más inmunogénico que el péptido libre (Francis et al, 1990). La desnaturalización deliberada de estas partículas quiméricas disminuyó marcadamente la inmunogenicidad de la proteína de fusión, demostrando la importancia de la multimerización en el impacto en el sistema inmunológico.

La proteína VP6 de rotavirus ofrece algunas características atractivas para ser considerada un buen candidato como transportador de epitopes. En primer lugar, es capaz de autoensamblarse en estructuras multiméricas tales como láminas, túbulos o esferas cuando se expresa en células de mamífero o insecto. Cuando la proteína VP2 es coexpresada con VP6, las VLPs de doble capa adquieren una morfología indistinguible de las partículas de dos capas naturales. Aunque VP6 es parte de la capa intermedia de las partículas maduras de rotavirus, luego de la infección natural se produce una fuerte respuesta inmune humoral contra esta proteína. Al menos un epítipo Th fuerte fue mapeado en la mayoría de los miembros del grupo A de rotavirus estudiados hasta ahora y se ha propuesto que las células Th específicas para epitopes de VP6 pueden constituir una importante proporción de la respuesta Th celular policlonal contra rotavirus porcinos entre las células del bazo. Además, VP6 fue capaz de “primar” respuestas inmunes contra proteínas de cápside externa, sugiriendo que las células Th específicas para VP6

pueden proveer de alguna manera una colaboración heterotípica a células B específicas para neutralizar epitopes de VP7 o VP4.

Como se mencionó, el primer reporte del empleo de VP6 como *carrier* de epitopes data del año 1990, cuando Redmond y colaboradores emplearon con éxito la metodología del acoplamiento químico de estas VLPs con diferentes epitopes heterólogos.

Sin embargo, a pesar de los alentadores resultados obtenidos, no hubo reportes posteriores en la utilización de VLPs basadas en la proteína VP6 de rotavirus como sistema de presentación de epitopes heterólogos. La razón principal parece deberse a que la metodología de acoplamiento químico es sumamente costosa y requiere de múltiples pasos de purificación para eliminar los químicos utilizados en la reacción.

Para solucionar estos inconvenientes, la estrategia más adecuada consiste en expresar la proteína VP6 como una fusión traduccional junto al epítopo heterólogo. Para lograr este objetivo, sin embargo, es necesario conocer previamente en qué sitios de la secuencia de VP6 es posible incorporar secuencias heterólogas sin interferir con su multimerización y de manera que el péptido incorporado esté expuesto al solvente, accesible a los distintos efectores del sistema inmune.

En el presente trabajo de tesis se empleó el sistema de expresión baculovirus-células de insecto para analizar el efecto de la inserción de un péptido foráneo en las propiedades antigénicas y estructurales de la proteína VP6. Se construyeron una serie de mutantes de inserción en fase dentro de la secuencia de VP6 de una cepa de rotavirus simio y, luego de la expresión de las distintas mutantes en células de insecto, se evaluó su capacidad de oligomerizar en trímeros, de multimerizar, de interactuar con la proteína VP2 de rotavirus en VLPs y se determinaron sus propiedades antigénicas e inmunogénicas. Los resultados que se discuten a continuación aportan una valiosa información sobre la caracterización de los dominios de trimerización y multimerización de la proteína

VP6, sobre sus propiedades antigénicas y sobre sus posibles usos en la presentación multimérica de sitios antigénicos heterólogos.

1. Elección del sistema de expresión.

Para que las VLPs sean posibles candidatos a vacuna, es necesario que su producción sea realizada en un sistema seguro y escalable. La mayoría de las VLPs han sido sintetizadas mediante baculovirus recombinantes. Este sistema basado en la expresión de proteínas en células de insecto resultó un gran avance en la producción y obtención de VLPs que originalmente se producían en levaduras o células de mamífero.

En primer lugar, es posible obtener grandes cantidades de proteína recombinante en un ambiente eucariota, lo que resulta en un correcto plegamiento espacial. Segundo, las células de insecto pueden ser cultivadas sin suplementos derivados de células de mamífero, por lo que el riesgo de contaminación con patógenos oportunistas está minimizado. Tercero, los baculovirus más utilizados en la expresión de proteínas recombinantes (*Autographa californica* y *Bombix mori*) sólo replican en pocas especies de lepidópteros, lo que garantiza su seguridad. Por último, en el sistema de baculovirus se puede realizar el salto de escala para una gran producción de antígeno vacunal, controlando muy finamente los parámetros de infección y cosecha (Alves et al.,), ya sea en reactores o ensayando su expresión en larvas de lepidóptero (López et al., 2005).

En el caso particular de la proteína VP6 de rotavirus, su expresión en sistemas bacterianos produjo bajos niveles de proteína recombinante debido a la alta frecuencia de codones “raros” para bacterias. Además, para recuperar la proteína recombinante fue necesario trabajar en condiciones desnaturalizantes, empleando concentraciones de hasta 8M de urea (Choi et al, 2004).

Existe una amplia bibliografía que documenta la expresión de VP6 sola o en conjunto con otras proteínas estructurales de rotavirus en el sistema baculovirus-células de insecto (Tosser et al. 1992; Crawford et al. 1994; Jiang et al. 1998). En todas las publicaciones quedan evidenciados los buenos niveles de expresión y la

relativa facilidad de purificación de las VLPs debido a su conformación multimérica.

Debido a las razones expuestas, el sistema de expresión seleccionado en este trabajo de tesis fue el sistema baculovirus-células de insecto.

2. Elección de los sitios de inserción

Diferentes grupos de investigación en el campo del desarrollo y producción de partículas semejantes a virus han empleado diversas estrategias para la selección de los posibles sitios de inserción de secuencias foráneas, como aprovechar sitios de restricción naturales, dirigir las inserciones a regiones con epitopes inmunodominantes en la partícula multimérica o hacer uso de los datos aportados por cristalografía. En este trabajo se empleó el análisis mediante algoritmos que predicen los sitios con mayor hidrofiliidad, mayor antigenicidad y mayor probabilidad de estar expuestos al solvente. Una vez publicada la estructura espacial de VP6 obtenida por cristalización, pudieron seleccionarse posiciones aminoacídicas adicionales correspondientes a zonas correspondientes a *loops* o lazos. Siguiendo esta estrategia, se seleccionaron las posiciones aminoacídicas: Nterm, 14, 101, 146, 171, 235, 301/8, 358 y 382.

Como péptido foráneo se seleccionó el epitope V5 que deriva del paramyxovirus SV5. El epitope V5 (formado por 14 aminoácidos) puede utilizarse como *tag* de proteínas manteniendo su antigenicidad y la de la proteína marcada (Randall y Young 1989, Randall y Young 1991, Hanke et al 1992, Randall et al 1993).

3. Caracterización de las quimeras VP6/V5.

3.a. Expresión e identidad de las quimeras VP6/V5

En primer término, se evaluó la influencia de la inserción del epitope V5 en la expresión de las quimeras VP6-V5. Los resultados mostraron que todas las quimeras se expresaron a niveles semejantes al de la proteína VP6wt: aproximadamente un 50% del total de la masa proteica corresponde a la expresión

de VP6 o de las quimeras VP6/V5, demostrando que la inserción de esta secuencia no convirtió a las proteínas quiméricas en tóxicas para el sistema de expresión ni alteró los niveles con los que normalmente VP6 se expresa en este sistema.

Cuando se confirmó la identidad de estas proteínas mediante ensayos de *Western blot*, se comprobó que todas las quimeras fueron reconocidas por los anticuerpos anti-V5 y anti-rotavirus SA11, con la excepción de la versión VP6/V5₁₄.

En esta quimera, el suero policlonal de conejo anti-SA11 no fue capaz de revelar la presencia de esta proteína, que si fue revelada por el anticuerpo monoclonal anti-V5, presentando una movilidad electroforética similar al del resto de las quimeras. Este hecho, junto con el resultado de la secuenciación completa de esta versión, descartó la posibilidad de un corrimiento en el marco de lectura de esta proteína recombinante.

Cuando se enfrentó la quimera VP6/V5₁₄ con otros sueros policlones anti-rotavirus procedentes de distintas especies de mamíferos (cobayos, equinos, conejos) inmunizados o naturalmente infectados con distintas cepas de rotavirus pertenecientes al grupo A (al igual que la cepa SA11), estos sueros tampoco pudieron reconocer a la quimera 14/V5, mientras que no tuvieron problemas en reconocer las otras quimeras.

Por otro lado, cuando se utilizó como inmunógeno la quimera VP6/V5₁₄ en su forma multimérica, los anticuerpos inducidos contra la proteína *carrier* fueron capaces de reconocer la proteína VP6 nativa pero no pudieron reconocer la proteína VP6 desnaturalizada.

Juntos, los resultados de estos análisis indican que la inserción de una secuencia foránea en la posición aminoacídica 14 de la proteína VP6 interrumpe el epitope lineal inmunodominante de esta proteína.

Esta caracterización no ha sido reportada hasta la fecha, siendo este trabajo de tesis el primero en describir esta propiedad.

3.b. Formación de trímeros y de multímeros

Mediante deleciones de grandes secciones de la región amino terminal y carboxilo terminal de la proteína VP6, Clapp y Patton en 1991 postularon que la capacidad de formar VLPs reside en el dominio C-terminal, comprendido entre los aminoácidos 251 y 397 y que el dominio de trimerización está ubicado en la zona media de VP6 (aminoácidos 105 a 328). Sin embargo, por la metodología utilizada, estos dominios no pudieron ser determinados con más precisión. En 1997, Afracchino y Gonzalez utilizaron la misma estrategia de análisis, pero trabajaron con deleciones pequeñas de VP6 y lograron acotar el dominio de trimerización. Estos autores determinaron que la deleción de los aminoácidos 122 a 147 no afectaba la formación de trímeros, mientras que la deleción de los aminoácidos 246 a 314 impedía la trimerización. Postularon además que probablemente el extremo N-terminal del dominio de trimerización se encuentre entre los aminoácidos 147 y 246.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis mediante el análisis por mutagénesis insercional de la proteína VP6 mostraron que la inserción de una secuencia heteróloga en la posición aminoacídica 146 no afecta la formación de trímeros, mientras que la inserción por reemplazo en la posición 301/8 impide la trimerización, coincidiendo con los resultados obtenidos por Afracchino y Gonzalez. La inserción del epítipo V5 en las posiciones 171 y 235 de VP6 también impidieron la formación de trímeros, apoyando la hipótesis presentada por estos autores respecto a la ubicación del extremo N-terminal del dominio de trimerización. Así, el dominio de trimerización puede ser extendido entre los aminoácidos 171 y 314.

El análisis de la estructura terciaria de la proteína VP6 basado en los datos cristalográficos señala que la región postulada como dominio de trimerización está dentro de un gran dominio con estructura de plegamiento de lámina beta. Este tipo de organización aminoacídica se caracteriza por su rigidez: cualquier inserción que afecte la estructura de láminas podría afectar también la formación de trímeros. Sin embargo, al análisis de las quimeras VP6/V5 mediante programas que analizan posibles estructuras terciarias de proteínas predijo que la inserción

del epítotope V5 no altera de una manera drástica la estructura que adopta en el espacio el monómero de VP6. Posiblemente, la inserción de la secuencia heteróloga afecta el contacto entre las láminas beta vecinas, desestabilizando o impidiendo la formación de trímeros.

Otra propiedad que se evaluó en las distintas quimeras VP6/V5 fue la capacidad de formar multímeros, medida como la capacidad de atravesar colchones de sacarosa mediante ultracentrifugación. Todas las quimeras VP6/V5 pudieron ser recuperadas en el *pellet* de ultracentrifugación, con excepción de las versiones VP6/V5₃₅₈ y VP6/V5₃₈₂.

Ha sido probado que la expresión conjunta de las proteínas VP6 y VP2 de rotavirus resulta en VLPs más estables que las formadas únicamente por VP6 (Madore *et al.*, 1999). La expresión conjunta de la proteína VP2 con las versiones 358 y 382 estabiliza en cierto grado estas quimeras, permitiendo detectar en el sobrenadante de infección algún tipo de estructura multimérica que es capaz de atravesar colchones de sacarosa, aunque en una proporción notoriamente inferior al de las otras quimeras.

El resultado de este análisis mostró que la inserción de un epítotope en las posiciones aminoacídicas 358 y 382 de la proteína VP6 afecta la capacidad de la proteína VP6 de formar multímeros. Esta zona aminoacídica de multimerización coincide con lo reportado por Clapp y Patton en 1991, quienes establecieron el dominio de multimerización en un gran fragmento de la región carboxi-terminal, entre los aminácidos 251 y 397.

Sin embargo, en este trabajo de tesis se determinó que la inserción del epítotope V5 en la posición aminoacídica 301/8 no afecta la capacidad de VP6 de multimerizar. En 1997, Affrachino y Gonzalez observaron que la delección entre los aminoácidos 308-314 no afectaba la capacidad de formar VLPs. Ambos resultados ayudan a acotar el dominio de multimerización establecido por Clapp y Patton, ubicandolo entre los aminoácidos 315 y 397.

Al analizar en conjunto los resultados de formación de trímeros y multímeros, se desprende que las funciones de trimerización y de multimerización son independientes. Esta caracterización coincide con los resultados obtenidos por otros grupos de trabajo, empleando distintas estrategias de análisis (Clapp y Patton, 1991; Tosser et al. 1992; Afracchino y Gonzalez, 1997). Además, la trimerización no es un requisito indispensable para la formación de multímeros o VLPs.

Como se mencionó anteriormente, la proteína VP6 está organizada en trímeros (Gorgoziglia *et al.*, 1985, Sabara *et al.*, 1987) y es posible detectar estos trímeros tanto en células infectadas como en el virión de rotavirus. Durante el ensamble de los rotavirus, el *core* adquiere la cápside media formada por 260 trímeros de VP6 (Fields *et al.*, 1996). Esto conduce a pensar que la trimerización es un proceso importante en la morfogénesis viral. De hecho, rotavirus de grupos diferentes son diferentes en sus secuencias aminoacídicas, aunque mantienen dominios concretos de trimerización (Shen *et al.*, 1994). Sin embargo, los resultados obtenidos por varios grupos de trabajo aplicando distintas metodologías sugieren la independencia entre los dominios de trimerización y de multimerización. ¿Es posible entonces que la incorporación de VP6 en VLPs en condiciones de cultivo celular sean diferentes a las requeridas en la morfogénesis natural?

Shen y colaboradores, mientras caracterizaban distintos clones de una cepa de rotavirus adaptada a cultivos de células por múltiple pasajes, encontraron dos clones virales particulares. En uno de ellos, un único cambio de aminoácidos en la posición 308 (de prolina a glutamina) impedía la formación de trímeros, mientras que en el otro clon viral, el cambio de valina a isoleucina en la posición aminoacídica 237 afectaba seriamente la estabilidad del trímero. Ninguno de estos clones virales presentaba diferencias en la tasa de replicación con respecto a la cepa parental; sólo se observó una sensibilidad mayor a la inactivación térmica (Shen *et al.*, 1994), demostrando que la trimerización no era un requisito indispensable tampoco para la formación de multímeros en la morfogénesis de rotavirus (al menos en la multiplicación de rotavirus en cultivo de tejidos).

Finalmente, se postuló que la trimerización puede tener importantes funciones promoviendo señales específicas de interacción proteína-proteína en la morfogénesis viral o probablemente ayudando a estabilizar la capa de VP6 alrededor del *core* de rotavirus.

3.c. Caracterización estructural de las quimeras VP6/V5

Con el fin de caracterizar los multímeros mixtos obtenidos por ultracentrifugación a través de colchones de sacarosa, fue necesario poder separar estas estructuras de los baculovirus presentes en esta preparación, ya que también éstos son capaces de atravesar colchones de sacarosa 30% y no fue posible separarlos empleando gradientes de sacarosa (resultados no mostrados).

Mediante gradientes de CsCl, fue posible separar los multímeros de los baculovirus en el caso de las quimeras Nterm, 14, 101, 171, 235 y 301. En el caso de las versiones 146, 358 y 382, la mayor parte de la proteína VP6/V5 migró junto con los baculovirus y sólo una pequeña fracción de la proteína quimérica se ubicó en la banda esperada para las VLPs.

Entonces, ¿cuál es la posible constitución de los multímeros de las versiones VP6/V5₁₄₆, VP6/V5₃₅₈ y VP6/V5₃₈₂ que se recuperan luego del colchón de sacarosa, si sólo una pequeña porción se recupera en la fracción esperada para las VLPs?. Está reportado que VP6 y VP2 pueden formar otras estructuras tales como láminas o túbulos (Ready *et al.*, 1988; Crawford *et al.*, 1994; Zeng *et al.*, 1994). Sin embargo, la observación bajo el microscopio electrónico de la fracción superior de los gradientes de CsCl (F1) sólo mostró la presencia de baculovirus, no siendo posible detectar la presencia de ningún otro tipo de estructura (resultados no mostrados).

Es posible entonces que la expresión de la proteína VP2 no sea suficiente para estabilizar eficientemente algunas de las quimeras VP6/V5 y sólo una fracción (mayor o menor, dependiendo de la quimera) se recupere como verdaderas VLPs, mientras que el resto, debido a su inestabilidad, rápidamente se desagrega y se recupera en formas monoméricas u oligoméricas.

Ya se había establecido en este trabajo que la inserción del epítotope V5 en las posiciones 358 y 382 de la proteína VP6 afectaba la capacidad de multimerizar. Sin embargo, en el caso de la versión VP6/V5₁₄₆, el hecho de obtener sólo una pequeña proporción de la proteína quimérica en la fracción esperada para las VLPs en un gradiente de CsCl fue un resultado no esperado, ya que esta región aminoacídica no se encuentra dentro del dominio de multimerización previamente establecido.

En concordancia con este resultado, Afracchino y Gonzalez encontraron que la deleción Δ 122-147 afectaba la formación de VLPs, recuperandose sólo un 20% de VLPs en comparación a lo obtenido con la proteína VP6wt (Afracchino y Gonzalez, 1997). Tal vez en esta zona aminoacídica de la proteína VP6 se encuentren el o los aminoácidos clave para estabilizar el dominio de multimerización, volviendolo funcional. La deleción Δ 122-147 o el reemplazo de aminoácidos en esta zona de VP6 afecta seriamente la capacidad de formar VLPs, a pesar de conservar intacto el dominio de multimerización (en este trabajo se reemplazaron los aminoácidos 146 y 147 isoleucina-ácido glutámico por serina-arginina con el fin de introducir una secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción mediante mutagenesis dirigida).

El análisis de la fracción F3 de los gradientes de CsCl mediante microscopía electrónica mostró que la inserción del epítotope V5 en la posición aminoacídica 171 de la proteína VP6 produce las VLPs que mejor reproducen la morfología de las VLPs basadas en VP6wt y en cantidades similares a las producidas por VP6wt.

Se sabe que las VLPs compuestas de VP6 + VP2 son sumamente estables, incluso en agua marina durante un mes a 20°C o en presencia de Cloro (1mg/l) (Caballero *et al.*, 2004; Loisy *et al.*, 2004).

Las VLPs basadas en la quimera VP6/V5₁₇₁ fueron conservadas durante dos meses a 4°C y mantuvieron su estructura multimérica. El gran número de VLPs obtenido, el radio promedio y la menor variabilidad en el tamaño observado respecto a las VLPs obtenidas con las otras versiones VP6/V5, son indicios de la estabilidad de las VLPs basadas en la quimera VP6/V5₁₇₁.

4. Las quimeras VP6/V5 como inmunógenos

4.a Las quimeras en estado monomérico.

En la respuesta inmune humoral contra epitopes presentados por estructuras multiméricas, no sólo cobra importancia el aumento de la inmunogenicidad directamente relacionada con las propiedades inmunogénicas de las estructuras *carrier* (aumento de la masa antigénica, repetición de epitopes, fagocitosis facilitada), sino también el hecho de que la inserción de la secuencia heteróloga no interrumpa epitopes T involucrados en la colaboración entre linfocitos B y T y no interfiera con el normal procesamiento y posterior carga de los péptidos en las moléculas de histocompatibilidad de clase II. Para evaluar entonces estos parámetros sin la interferencia de las posibles diferencias en la presentación multimérica del epitope V5 por parte de las diferentes quimeras, se evaluó la respuesta humoral inducida por las diferentes versiones en su conformación monomérica.

La inmunización de ratones con 5 µg de las quimeras VP6/V5 desnaturalizadas indujo una sólida respuesta inmune humoral contra el péptido V5, que resultó sensible a una dosis refuerzo y se mantuvo constante hasta los 150 días de iniciado el experimento.

Con una sola inmunización, sólo dos quimeras (VP6/V5₁₄₆ y VP6/V5₂₃₅) fueron capaces de inducir una respuesta humoral contra el epitope foráneo V5, obteniendo un título promedio anti-V5 igual a 2 para la versión 146 y un título promedio de 1,9 para la versión 235. Luego de la segunda inmunización, se pudo apreciar un claro efecto de dosis refuerzo. Los grupos inoculados con las versiones VP6/V5₁₄₆ y VP6/V5₂₃₅ aumentaron el título de anticuerpos anti-V5 (con títulos promedios igual a 4,1 y 4, respectivamente). Las otras versiones fueron capaces de inducir una respuesta humoral contra el epitope foráneo luego de recibir el *booster*, con excepción de las versiones VP6/V5₁₇₁ y VP6/V5₃₈₂.

Algunos autores han empleado la estrategia de reemplazar un sitio antigénico inmunodominante en la proteína *carrier* por el epitope heterólogo, basados en la hipótesis de que de esta manera la respuesta inmune se dirigirá hacia una región

hacia la que naturalmente está enfocada (Francis et al., 1993). Así, la inserción de secuencias heterólogas entre los aminoácidos 75 y 83 abolió el reconocimiento por parte de cinco anticuerpos monoclonales y disminuyó drásticamente el reconocimiento de sueros policlonales de humanos infectados por HBV. Esta versión de HbcAg quimérico fue la que indujo niveles más altos de anticuerpos contra el péptido heterólogo (Schödel *et al.*, 1992). Sin embargo, esta hipótesis no fue verdadera en nuestro modelo de VP6: la versión VP6/V5₁₄ en su forma monomérica requirió de dos inmunizaciones para inducir una respuesta humoral contra el péptido V5, mientras que las quimeras VP6/V5₁₄₆ y VP6/V5₂₃₅ despertaron una más sólida respuesta con sólo una inmunización.

Los resultados mostraron que existen diferencias entre las quimeras VP6/V5 respecto de la capacidad para inducir anticuerpos contra el epítipo foráneo, dependiendo de la posición de éste en la quimera. En particular, la quimera 171 mostró muy bajos títulos de anticuerpos, significativamente diferentes de los del resto de las versiones. Dos hipótesis pueden explicar este fenómeno: o bien la posición de V5 en la proteína monomérica afecta la conformación espacial en la que éste se presenta (y por lo tanto afecta la capacidad de los linfocitos B para reconocer el epítipo V5 en el contexto del *carrier*), o bien la inserción de V5 en la posición 171 afecta su degradabilidad o interrumpe algún epítipo Th fuerte. Para descartar alguna de estas hipótesis y eliminar la posibilidad de que las diferencias se debieran a preparaciones vacunales heterogéneas, se midió la respuesta humoral contra VP6.

Los resultados mostraron que tanto en la primera inmunización como en la segunda, no hay diferencias significativas entre las respuestas humorales contra la proteína *carrier* en todos los grupos y que el título anti-VP6 aumenta luego de la segunda inmunización. Con estos resultados se descarta haber afectado la degradación de la quimera o la interrupción de un epítipo Th con la inserción de la secuencia V5 en la posición 171 y se confirma que todos los ratones fueron correctamente inmunizados. Las diferencias en la inducción de una respuesta humoral contra el epítipo V5 probablemente se deben a la manera en que la

posición de éste en la proteína *carrier* determina su accesibilidad o su estructura secundaria, relevantes en el reconocimiento por parte de las células B. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Baños y colaboradores, quienes demostraron la existencia un fuerte epítopo Th en la región comprendida por los aminoácidos 289-302. Además, Benito y colaboradores mostraron que la posición en la que una secuencia heteróloga derivada del virus de la fiebre aftosa es insertada en la secuencia de la proteína *carrier* β -galactosidasa modula su reactividad frente a un panel de anticuerpos monoclonales mediante la influencia que las distintas posiciones del *carrier* tienen sobre la conformación espacial de la secuencia insertada (Benito *et al.*, 1995).

4.b. Las quimeras multiméricas como inmunógenos

En términos de la respuesta inmune humoral inducida por los multímeros mixtos VP6-V5/VP2, la inmunización con dosis muy bajas (conteniendo sólo 30 ng de VP6 quimérica, correspondientes a 0.9 ng de V5) despertó considerables títulos de anticuerpos.

En primer lugar, la versión VP6-V5₁₇₁ resultó ser la quimera que despertó los títulos de anticuerpos más altos, ya detectados tras la primera inmunización. Esta versión fue una de las dos en las que se pudo probar la exposición del epítopo V5 sobre la partícula multimérica. Sin embargo, esta versión quimérica como monómero probó ser pobremente inmunogénico respecto del epítopo V5. Así, puede concluirse que la exposición de V5 sobre la estructura multimérica formada por VP2 y VP6 es la responsable de la aumentada inmunogenicidad de la versión VP6-V5₁₇₁ respecto del resto de las quimeras. A pesar de no poder sido probada la exposición del epítopo V5 en las quimeras 14, 235 o 301, éstas mostraron ser capaces de despertar una respuesta inmune humoral, aunque menor a la de la versión VP6-V5₁₇₁. Si el epítopo V5 no está expuesto en la superficie de los multímeros, los resultados concuerdan con los obtenidos por Charpilienne y colaboradores, quienes mostraron que, al inmunizar conejos con quimeras VP2-GFP/VP6, se obtenían altos títulos de anticuerpos no sólo contra VP2, sino también contra la proteína verde fluorescente GFP (Charpilienne *et al.*, 2001).

Cabe recordar que VP2 forma el core interno de estas VLPs y que, en ese trabajo, los primeros 92 aminoácidos de VP2 están reemplazados por GFP, la que ha probado quedar interna en la estructura del core. Los autores hipotetizaron que tanto las VLPs naturales como las quiméricas son capaces de presentar sus componentes internos al sistema inmune luego de la degradación que ocurre tras la inoculación. Así, estas versiones deben su inmunogenicidad, en parte a que como monómeros resultaron buenos inmunógenos (en particular 146 y 235) y en parte a que la estructura multimérica que se mantiene favorece tanto la fagocitosis como el aumento de copias por molécula fagocitada, aumentando la probabilidad de interacción con linfocitos Th. Resulta difícil explicar la inmunogenicidad de estas versiones sólo por su componente monomérico, ya que habitualmente las dosis de proteína monomérica requerida para despertar respuestas humorales similares suele ser mucho mayor. Habitualmente, en el modelo murino se requieren entre 5 y 100 µg de proteína soluble utilizada como *carrier* de péptidos (Harlow y Lane, 1988) .

A diferencia de lo obtenido en la inmunización con las quimeras monoméricas, en la inmunización con los multímeros mixtos la respuesta humoral contra la proteína *carrier* VP6 fue diferente entre las quimeras analizadas. Las quimeras VP6/V5₁₇₁ y VP6/V5₁₄₆ fueron las mejores inductoras de anticuerpos que reconocen la proteína VP6 presente en los viriones de rotavirus, mientras que en la inmunización con las versiones VP6/V5₁₄ y VP6/V5₂₃₅, los ratones reconocieron pobremente la proteína VP6 nativa. Estos resultados, junto con el hecho de que estas últimas versiones no pudieron ser capturadas en un ensayo de ELISA sandwich con un suero policlonal de conejo, demuestran que la inserción de la secuencia V5 alteró el patrón de epitopes conformacionales o discontinuos que VP6 presenta en estas quimeras, por lo que los anticuerpos que se inducen contra la proteína VP6 son distintos para cada quimera.

4.c. Efecto de una respuesta inmune preexistente contra el *carrier*

Existe un fenómeno inmunológico conocido como “supresión inducida por el *carrier*” (Schutze et al. 1985) por el que los anticuerpos preexistentes contra la

proteína *carrier* pueden inhibir la respuesta inmune contra un epítopo presentado por ese mismo *carrier*. En los últimos años, el estudio de este fenómeno parece indicar que estaría más relacionado con la inducción de la respuesta T-celular contra el epítopo (Da Silva et al. 2001; Ruedl et al. 2005) que con la respuesta humoral. Se demostró además, que este efecto no deseado puede ser evitado utilizando en el *booster* VLPs heterólogas (Da Silva et al. 2005).

Con respecto a la inducción de una respuesta humoral contra el epítopo foráneo en presencia de una respuesta inmune preexistente contra el *carrier*, existen varios trabajos donde se reporta que no tiene efecto alguno (Ben-Yedidia et al. 1999; Netter et al. 2003; Geldmacher et al. 2005; Xiang et al. 2005) o incluso favorece (Shah et al. 1999) la respuesta de anticuerpos contra el epítopo.

Pensando en la posibilidad de utilizar este sistema de VLPs quiméricas basadas en la proteína VP6 de rotavirus para inmunizar al ganado bovino contra patógenos de interés pecuario y dada la alta seroprevalencia de rotavirus a campo (77% en el ganado bovino argentino, Constantini et al. 2002), se analizó en qué grado la presencia de una respuesta inmune contra la proteína VP6 previa a la inmunización con las quimeras VP6/V5 podría afectar la inducción de una respuesta inmune contra el epítopo foráneo presentado en las quimeras.

Los resultados mostraron que la presencia de una respuesta inmune contra el *carrier* previa a la inmunización con las quimeras produce algún efecto estimulador en la respuesta humoral contra el epítopo V5.

Este resultado coincide con los obtenidos por otros grupos de trabajo, en los que la presencia de una respuesta inmune preexistente contra la proteína VP6 indujo una rápida respuesta de anticuerpos contra el péptido heterólogo en comparación con el grupo no "primado" (Frenchik *et al.*, 1992) o indujo niveles más altos de anticuerpos neutralizantes frente al desafío con rotavirus (Esquivel *et al.*, 2000) que llevaron a una rápida eliminación de la infección con respecto al grupo control. Este efecto estimulador en la inducción de una respuesta humoral contra antígenos presentados por la proteína VP6 fue tanto homo como heterotípica y es particularmente notorio en las versiones Nterm y 14, donde hay diferencias

significativas entre el grupo que sólo recibe la quimera y los grupos pre-inmunizados con VP6 o rotavirus.

Aunque no existen diferencias significativas entre los animales que fueron preinmunizados con la proteína VP6wt de la cepa SA11 y los animales inmunizados con rotavirus cepa NCDV, el primer grupo presenta en promedio, títulos más altos que el segundo grupo. Como las dos cepas pertenecen al grupo A de rotavirus y por lo tanto presentan alta homología en la proteína VP6 (Tang *et al.*, 1997), es posible que esta leve diferencia se deba a que en un caso se utilizó proteína VP6 desnaturalizada y en el otro se utilizó proteína VP6 nativa (formando parte del virión).

5. Implicancias y perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que es posible la inserción de un epítipo heterólogo en la proteína VP6 y su utilización como *carrier* particulado para inducir una respuesta inmune humoral contra péptidos heterólogos.

Además, quedó en evidencia que la inserción en distintas posiciones de VP6 afecta no sólo la morfología y estabilidad de las VLPs quiméricas obtenidas sino también su reactividad frente a sueros policlonales anti-rotavirus, posiblemente al exponer epítopos conformacionales distintos.

Teniendo en cuenta la posibilidad de utilizar estas VLPs quiméricas como inmunógenos, los datos aportados ofrecen distintas opciones. Debido a que VP6 es altamente inmunógena y es la proteína más frecuentemente detectada en los ensayos de diagnóstico e inmunológicos, en el caso en el que la vacunación con VLPs quiméricas afectara el diagnóstico para rotavirus, la versión versión VP6/V5₁₄ resulta la indicada, pues induce anticuerpos contra la proteína *carrier* que tienen muy poca reactividad frente a la proteína VP6 nativa o nula reactividad frente a la proteína VP6 desnaturalizada.

Sin embargo, teniendo en cuenta la alta seroprevalencia para rotavirus en las poblaciones animales y humanas, diferenciar animales vacunados de infectados quizás no sea un objetivo epidemiológico inmediato. Entonces, la quimera

VP6/V5₁₇₁ resulta ser la ideal, ya que es la más estable de todas las versiones y expone el epítotope V5 en su superficie, induciendo una sólida respuesta inmune contra el péptido heterólogo. Además, como las VLPs basadas en VP6/V5₁₇₁ exponen epítotope conformacionales que son reconocidos por sueros policlonales anti-rotavirus e inducen anticuerpos capaces de reconocer la proteína nativa presente en el virión, es posible mejorar las formulaciones de VLPs como vacunas para rotavirus incorporando epítotope derivados de proteínas no estructurales de rotavirus como NSP4, involucrada en los síntomas de la infección por la alteración en la secreción de iones cloruro (Hoire *et al.*, 1999).

En este trabajo se empleó como péptido heterólogo el epítotope V5 formado por 14 aminoácidos. Sin embargo, resta determinar la longitud heteróloga máxima que es posible insertar mediante esta estrategia. Nuestro grupo de trabajo evaluó también la inserción de un péptido correspondiente al sitio antigénico inmuodominante del irus de la fiebre aftosa (FMDV), denominado "sitio A", formado por 21 aminoácidos. Las quimeras VP6/sitioA arrojaron los mismos resultados en cuanto la caracterización antigénica de la posición 14 y los dominios de trimerización y de multimerización. Es posible que las quimeras VP6/V5₁₇₁ y VP6/V5_{301/8}, en las que la inserción del epítotope heterólogo se realiza en *loops* de VP6, acepten la inserción de péptidos mayores a los 21 aminoácidos.

Finalmente, el sistema de expresión utilizado (baculovirus-células de insecto) permite el escalado en la producción de antígenos empleando la infección de larvas de lepidóptero en lugar de cultivo celulares. La utilización de larvas reduce sensiblemente los costos de producción y no afecta la antigenicidad de las proteínas producidas (Lopez *et al.*, 2005). En nuestro laboratorio se observó que la infección de larvas de *Rachiplusia ni* con los baculovirus recombinantes AcVP6wt y AcVP2wt llevó a la expresión de las proteínas VP6 y VP2 y que éstas fueron capaces de interactuar formando VLPs que fueron recuperadas y analizadas mediante gradientes de CsCl.

Resta evaluar si es posible la producción de las VLPs quiméricas VP6/V5 en este sistema *in vivo* de producción.

CONCLUSIONES

El sitio antigénico lineal inmunodominante de la proteína VP6 involucra la posición aminoacídica 14. La disrupción de la secuencia lineal de VP6 en esta posición provoca la pérdida del reconocimiento antigénico por parte de sueros policlonales hacia la secuencia lineal de la proteína VP6.

La estructura de trímero de VP6 posee determinantes antigénicos discontinuos o conformacionales no presentes en la proteína lineal. La proteína quimérica VP6V5₁₄ en su forma trimérica es reconocida por aquellos sueros policlonales que no reconocen el monómero.

La inserción de una secuencia heteróloga en las posiciones 14 y 235 determina que las VLPs quiméricas cambien el patrón de epitopes conformacionales o discontinuos que presentan. Las versiones VP6V5₁₄ y VP6V5₂₃₅ en su forma multimérica no fueron reconocidas en los ensayos de ELISA *sandwich*. Asimismo, los anticuerpos generados mediante la inoculación de ratones con estas versiones reconocieron más pobremente las VLPs basadas en la proteína VP6wt.

El dominio de trimerización puede ser extendido entre los aminoácidos 171 y 314. La inserción de una secuencia heteróloga en la posición 171 de VP6 permitió acotar el extremo N-terminal de este dominio.

El dominio de multimerización de VP6 puede ser acotado a una región comprendida entre los aminoácidos 315 y 397. La inserción de un epitope en las posiciones aminoacídicas 358 y 382 de la proteína VP6 afectó la capacidad de la proteína VP6 de formar multímeros, mientras que el reemplazo en 301/8 no impidió a VP6 multimerizar.

El dominio de multimerización de VP6 puede ser acotado a una región comprendida entre los aminoácidos 147

Las funciones de trimerización y de multimerización son independientes.

La trimerización no es un requisito indispensable para la formación de multímeros o VLPs.

Las posiciones aminoacídicas 146 y 171 están expuestas en las partículas multiméricas. Debido a las alteraciones en el patrón de epitopes que los multímeros quiméricos presentan, no puede demostrarse la exposición de V5 en el resto de las versiones.

La inserción del epítipo V5 en la posición aminoacídica 171 de la proteína VP6 produce las VLPs que mejor reproducen la morfología de las VLPs basadas en VP6wt y en cantidades similares a las producidas por VP6wt.

La posición aminoacídica en la que el epítipo heterólogo es insertado tiene influencia en la inmunogenicidad del epítipo en la proteína quimérica en su forma monomérica. La versión VP6/V5₁₇₁ como monómero induce pobremente anticuerpos contra V5, probablemente debido a que la proteína *carrier* impone restricciones en su accesibilidad o su estructura espacial.

La exposición de V5 sobre la estructura de la VLP es responsable de la aumentada inmunogenicidad del epítipo V5 en la versión VP6/V5₁₇₁ respecto del resto de las quimeras. Esta misma versión, cuando fue inoculada como monómero en una dosis 170 veces mayor, despertó una pobre respuesta inmune.

La presencia de una respuesta inmune contra la proteína *carrier* previa a la inmunización con las quimeras produce algún efecto estimulador en la respuesta humoral contra el epítipo heterólogo.

Allison A.C., and Gregoriadis G. (1974). Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* (London), **250**: 252.

An K., Gillock E.T., Sweat J.A., Reeves W.M., and Consigli R.A. (1999). Use of the baculovirus system to assembled polyomavirus capsid-like particles with different polyomavirus structural proteins: analysis of the recombinant assembled capsid-like particles. *J. Gen. Virol.* 80: 1009-1016.

Baldwin S., D'Souza C., Roberts A., Kelly B., Frank A., Lui M., Ullmer J., Huygen K., McMurray D., and Orme I. (1998). Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis. *Infection and Immunity.* 66: 2951-2959.

Ball J.M., Hardy M.E., Atmar R.L., Conner M.E., and Estes M.K. (1998). Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *J. Virol.* 72 (2): 1345-1353.

Ball J.M., Graham D.Y., Opekun A.R., Gilger M.A., Guerrero R.A., and Estes M.K. (1999). Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase I study. *Gastroenterology.* 117: 40-48.

Baños D.M., Lopez S., Arias C.F., and Esquivel F.R. (1997). Identification of a T-Helper cell epitope on the rotavirus VP6 protein. *J. Virol.* 71(1): 419-426.

Benito A., Mateu M.G., and Villaverde A. (1995): Improved mimicry of a foot-and-mouth disease virus antigenic site by a viral protein displayed on beta-galactosidase surface. *Biotechnology.* 13(8): 801-804.

Ben-Yedidia T., and Arnon R. (1998). Effect of pre-existing carrier immunity on the efficacy of synthetic influenza vaccine. *Immunol. Lett.* 64(1): 9-15.

Berinstein A., Perez Filgueira M., Schudel A., Zamorano P., Borca M., and Sadir A. (1993). Avidine and LPS from *Brucella ovis* effect on the memory induced by foot-and-mouth disease virus vaccination in mice. *Vaccine*, **11**: 1295.

Boyaka PN, Marinaro M, Vancott JL, Takahashi I, Fujihashi K, Yamamoto M, van Ginkel FW, Jacson RJ, Kiyono H, McGhee JR. (1999). Strategies for mucosal vaccine development. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60 (4 Suppl): 35-45.

Bräutigam S., Snezhkov E., and Bishop D.H. (1993). Formation of poliovirus-like particles by recombinant baculovirus expressing the individual VP0, VP3 and VP1 proteins by comparison to particles derived from the expressed poliovirus polyprotein. *Virology* 192: 512-524.

Breitburd F., Kirnbauer R., Hubbert N.L., Nonnenmacher D, Trin-Dinh-Desmarquet C, Orth G, Schiller JT; and Lowy DR. (1995). Immunization with virus-like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J. Virol.* 69; 3959-3963.

Broekhuijsen M.P., van Rijn J.M., Blom A.J., Pouwels P.H., Enger-Valk B.E., Brown F., and Francis M.J. (1987). Fusion proteins with multiple copies of the major antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus protect both the natural host and laboratory animals. *J Gen Virol*, **68**, 3137.

Burrell C.J., Mackay P., Greenaway P.J., Hofseider P.H., and Murray K. (1979). Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR322. *Nature* 296: 43-47.

Carter J.J., Hagensee M., Taflin M.C., Lee SK., Koustsky L.A., and Galloway D.A. (1993). HPV-1 capsids expressed in vitro detect human serum antibodies associated with foot warts. *Virology* 195: 456-462.

Celis E. (2002). Getting peptides vaccines to work: just a matter of quality control?. *J. Clin. Invest.* 110: 1765-1768.

Chatziandreu N., Stock N., Yuong D., Andrejeva J., Hagmaier K., McGeoch D.J., and Randall R.E. 2004. Relationships and host range of human, canine, simian and porcine isolates of simian virus 5 (parainfluenza virus 5). *J. Gen. Virol.* 85(10): 3007-3016.

Choi A.H., Basu M., mcNeal M.M., Bean J.A., Clements J.D., and Ward R.L. (2004). Intranasal administration of an Escherichia coli-expressed codon-optimized rotavirus VP6 protein induces protection in mice. *Protein Expr Purif.*, 38(2): 205-216.

Christensen N.D., Reed C.A., Cladel N.M., Han R., Kreider J.W. (1996). Immunization with virus-like particles induces long-term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit papillomavirus. *J. Virol.* 70: 960-965.

Clapp L., and Patton J.T. (1991). Rotavirus morphogenesis: domains in the major inner capsid protein essential for binding of single-shelled particles and for trimerization. *Virology.* 180: 697-708.

Cohen B.J., and Richmond J.E. (1982). Electron microscopy of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli*. *Nature* 296: 677-678.

Constantini V., Parreño V., Barrandeguy M., Combessies G., Bardon J.C., Odeon A., Leunda M., Saif L., and Fernandez F. (2002). Group A bovine rotavirus: diagnosis and antigenic characterization of strains circulating in the Argentine republic, 1994-1999. *Rev. Argent. Microbiol.* 34(2): 110-116.

Coste A., Sirard J.C., Johansen K., Cohen J., and Kraehenbuhl J.P. (2000). Nasal immunization of mice with virus-like particles protects offspring against rotavirus diarrhea. *J. Virol.* 74(19): 8966-8971.

Crawford S.E., Labbe M., Cohen J., Borroughs M.H., Zhou Y.J., and Estes M.K. (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.*, **68**: 5945.

Da Silva D.M., Pastrana D.V., Schiller J.T., and Kast W.M. (2001) Effect of preexisting neutralizing antibodies on the anti-tumor immune response induced by chimeric human papillomavirus virus-like particles vaccines. *Virology* 290: 350-360.

Da Silva D.M., Schiller J.T., and Kast W.M. (2003). Heterologous boosting increases immunogenicity of chimeric papillomavirus virus-like particle vaccines. *Vaccine* 21: 3219-3227.

De Aizpurua H.J., and Russel-Jones G.J. (1988). Oral vaccination. Identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. *J. Exp. Med.* 167: 440-451.

Delchambre M., Gheysen D., Thines D., Thiriart C., Jacobs E., VerdinE., Horth M., Burny A., and Bex F. (1989). The gag precursor of simian immunodeficiency virus assembles into virus-like particles. *EMBO J.* 8: 2653-2660.

Dilner J., Wiklund F., Lenner P., Eklund C., Frederiksson-Shanazarian V., Schiller J.T., Hibma M., Hallmans G., and Stendahl U. (1995). Antibodies against linear and conformational epitopes of human papillomavirus type 16 that independently associated with incident cervical cancer. *Int. J. Cancer.* 60: 377-462.

DiMarchi R., Brooke G., Gale C., Cracknell V., Doel T., and Mowat N. (1986). Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science*, **232**: 639.

Dittmer U., Brooks D.M., and Hasenkrug K.J. (1999). Protection against establishment of retroviral persistence by vaccination with a live attenuated virus. *J. Virol.* 73: 3753-3757.

Edman J.C., Hallewell R.A., Valenzuela P., Goodman H.M., and Rutter W.J. (1981). Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E. coli*. *Nature* 291: 503-506.

Emeny R.T., Wheeler C.M., Jansen K.U., Hunt W.C., Fu T.M., Smith J.F., MacMullen S., Esser M.T., and Paliard X. (2002). Priming of human Papillomavirus type 11-specific humoral and cellular immune responses in college-aged women with a virus-like particle vaccine. *J. Virol.* 76 (15): 7832-7842.

Elahi S.M., Shen S., Talbot B.G., Massie B., Harpin S., and Elazhary Y. (1999). Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of bovine viral diarrhoea virus by an adenovirus vector with an inducible promoter. *Virology*. 261(1): 1-7.

El Guink N., Kris R., Goodman-Snitkoff G.W., Small P.A., and Mannino R.J. (1989). Intranasal immunization with proteoliposomes protects against influenza, *Vaccine*, 7: 89.

Ernst W., Grabherr R., Wegner D., Borth N., Grassaver A., and Katinger H. (1998). Baculovirus surface display: construction and screening of a epitope library. *Nucleic Acids Reserch*. 26(7): 1718-1723.

Esparza J., and Gil F. (1978). An study on the ultrastructure of human rotavirus. *Virology*. 91: 141-150.

Estes M.K., Ball J.M., Guerrero R.A., Opekun A.R., Gilger M.A., Pacheco S.S., and Graham D.Y. (2000). Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *J. Infect. Dis.* 181 (2): S367-S373.

Fernandez-Fernandez M.R., Martinez-Torrecuadrada J.L. Casal J.I., and García J.A. (1998). Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus. *FEBS Lett.* 427: 229-235.

Fields B.N., Knipe D.M., and Howley P.M. 1996. *Virology*, third edition. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia.

Fooks A.R., Stephenson J.R., Warnes A., Dowset A.B., Rima B.K., and Wilkinson G.W.G. (1993). Measles virus nucleocapside protein expressed in insect cells assembles into nucleocapsids-like structures. *J. Gen. Virol.* 74: 1439-1444.

Francis M.J., fry C.M., Rowlands D.J., Brown F., Bittle J.L., Houghten R.A., and Lerner R.A. (1985). Immunological priming with synthetic peptides of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* 66: 2347.

Francis M.J., Hastings G.Z., Brown A.L., Grace K.G., Rowlands D.J., and Clarke B.E. (1990). Immunological properties of hepatitis B core antigen fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2545-2549.

French T.J., and Roy P. (1990). Synthesis of bluetongue virus (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV. *J. Virol.*, **64**: 1530.

French T.J., Marshall J.J., and Roy P. (1990). Assembly of double-shelled, virus-like particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins. *J. Virol.*, **64**: 5695.

Fromantin C., Jamot B., Cohen J., Piroth L., Pothier P., and Kohli E. (2001). Rotavirus 2/6 virus-like particles administered intranasally in mice, with or without the mucosal adjuvants cholera toxin and Escherichia coli heat-labile toxin, induce a Th1/Th2-like immune response. *J. Virol.* 75(22): 11010-11016.

Geldmacher A., Skrastina D., Borisova G., Petrovskis I., Kruger D.H., Pumpens P., and Ulrich R. (2005). A hantavirus nucleocapsid protein segment exposed on hepatitis B virus core particles is highly immunogenic in mice when applied without adjuvants or in the presence of pre-existing anti-core antibodies. *Vaccine* 23(30): 3973-3983.

Germann K.C., and Waldman R.H. (1988). Stimulation of secretory antibody following oral administration of antigen. *Rev. Infect. Dis.* 10: 939-950.

Gheysen D., Jacobs E., de Foresta F., Thiriart C., Francotte M., Thines D., and de Wilde M. (1989). Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 59: 103-112.

Ghiasi H., Kaiwar R., Nesburn A.B., Wechsler S.L. (1992). Baculovirus-expressed glycoprotein G of herpes simplex virus type 1 partially protects vaccinated mice against lethal HSV-1 challenge. *Virology.* 190: 233-239.

Gorziglia M., Larrea C., Liprandi F., and Esparza J. 1985. Biochemical evidence for the oligomeric (possible trimeric) structure of the major polypeptide (45K) of rotavirus. *J. Gen. Virol.* 66: 1889-1900.

Greenberg H.B., McAuliffe V., Valdesuso J., Wyatt R.G., Flores J., Kalica A.R., Hoshino Y., and Singh N. 1983: Serological analysis of the subgroup protein of rotavirus using monoclonal antibodies. *Infection and Immunity.* 39: 91-99.

Greenstone H.L., Nieland J.D., de Visser K.E., De Bruijn ML, Kirnbauer R, Roden RB, Lowy DR, Kast WM, and Schiller Jt.(1998). Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 1800-1805.

Griffiths J.C., Berrie E.L., Holdsworth L.N., Moore J.P., Harris S.J., Senior J.M., Kingsman S.M., Kingsman A.J., and Adams S.E. (1991). Induction of high-titer neutralizing antibodies, using hybrid human immunodeficiency virus V3-Ty virus like particles in a clinically relevant adjuvant. *J. Virol.* 65: 450-456.

Goswami K.K.A., Lange L.S., Mitchell D.N., Cameron K.R., and Russel W.C. 1984. Does simian virus 5 infect humans?. *J. Gen. Virol.* 65: 1295-1303.

Hagiwara K., Higashi T., Namba K., Uehara-Ichiki T., and Omura T. (2003). Assembly of single-shelled cores and double-shelled virus-like particles after baculovirus expression of major structural proteins P3, P7 and P8 of Rice dwarf virus. *J. Gen. Virol.* 84: 981-984.

Hanke T, Szawlowski P, Randall RE. (1992). Construction of solid matrix-antibody-antigen complexes containing simian immunodeficiency virus p27 using tag-specific monoclonal antibody and tag-linked antigen. *J. Gen. Virol.* 73 (Pt 3): 653-660.

Harford H., Cabezón T., Crabeel M., Rutgers A., and De Wilde M., (1982). Expression of hepatitis B surface antigen in yeast, in *Dev. Biol., Standard Second WHO/IASS Symposium on Viral Hepatitis: Standardization in immunoprophylaxis of infections by hepatitis B viruses.* Basel, Karger, vol 54, pp125-130.

Harlow E. and Lane D. (1988). *Antibodies. A laboratory manual.* Editado por: Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Harris S.J., Gearing A.J.H., Layton G.T., Adams S.E. and Kingsman A.J. (1992). Enhanced proliferative cellular responses to HIV-1 V3 peptide and gp120 following immunization with V3-Ty virus-like particles. *Immunology.* 77: 315-321.

Harro C.D., Pang Y.Y., Roden R.B., Hildesheim A, Wang Z, Reynolds MJ, Mast TC, Robinson R, Murphy BR, Karron RA, Dilner J, Schiller Jt, and Lowy DR.(2001) Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J. Natl. Cancer Inst.* 93: 284-92.

Honda M., Matsuo K., Nakasone T., Okamoto Y., Yoshizaki H., Kitamura K., Sugiura W., Watanabe K., Fukushima Y., Haga S., et al. (1995). Protective immune responses

induced by secretion of a chimeric soluble protein from a recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin vector candidate vaccine for human immunodeficiency virus type 1 in small animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92(23): 10693-10697.

Horie Y., Nakagomi O., Koshimura Y., Nakagomi T., Suzuki Y., Oka T., Sasaki S., Matsuda Y., and Watanabe S. (1999). Diarrhea induction by rotavirus NSP4 in the homologous mouse model system. *Virology.* 262: 398-407.

Jiang B., Barniak V., Smith R.P., Sharma R., Corsaro B., Hu B., and Madore H.P. (1998). Synthesis of rotavirus-like particles in insect cells: comparative and quantitative analysis. *Biotech. Bioeng.* 60(3): 369-374.

Jiang X., Wang M., Graham D., and Estes M.K. (1992). Expression self-assembly and antigenicity of the norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* 66(11): 6527-6532.

Joelson T.L., Akerblom P., Oxelfelt B., Strandberg B., Tomenius K., and Morris T.J. (1997). Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus. *J. Gen. Virol.* 78: 1213-1217.

Kajigaya S., Fujii H., Field A., Anderson S., Rosenfeld S., Anderson L.J., Shimada T., and Young N.S. (1991). Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **88**: 4646.

Kim Y., Nielsen P.R., Hodgins D., Chang K.O., Saif L.J. (2002). Lactogenic antibody responses in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like particles (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccines. *Vaccine* 20: 1248-1258.

Kirnbauer R., Booy F., Cheng N., Lowry D.R., and Schiller J.T. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 12180-12184.

Kirnbauer R., Hubbert N.L., Wheeler C.M., Becker T.M., Lowy D.R., and Schiller J.T. (1994). A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J. Natl. Cancer Inst.* 86: 494-499.

Kirnbauer R. 1996. Papillomavirus-like particles for serology and vaccine development. *Intervirology.* 39: 54-61.

Kirnbauer R., Chandrachud L.M., O'Neal B.W., Wagner ER, Grindlay GJ, Armstrongs A, McGarvie GM, Schiller JT, Lowy DR, and Campos MS.(1996). Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* 219: 37-44.

Kohli E., Maurice L., Vantheot J.F., Bourgeois C., Cohen J., pothieu P. (1992). Localization of group specific epitopes as the major capsid protein of group A rotavirus. *J. Gen. Virol.* 73: 907-914.

König G., Blanco C., Knowles N.J., Palma E.L., Maradei E., and Piccone M.E. (2001). Phylogenetic analysis of Foot and Mouth Disease Virus isolated in Argentina. *Virus Gene.* 23 (2) : 175-181.

Koutsky H.L., Ault K.A., Wheeler C.M., Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiaccherini LM, Jansen Ku.(2002). A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 347: 1645-1651.

Kratz P.A., Böttcher B., and Nassal M. (1999). Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 1915-1920.

Layton G.T., Harris S.J., Gearing A.J.H., Hill.Perkins M., Cole J.S., griffiths J.C., Burns N.R., Kingsman A.J., and Adams S.E. (1993). Induction of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo with hybrid HIV-1 V3-Ty virus-like particles. *J. Immunol.* 151: 1097-1107.

Lepault J., Petitpas I., Erk I., Navaza J., Bigot D., Dona M., Vachette P., Cohen J., and Rey F.A. (2001). Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *The EMBO Journal.* 20(7): 1498-1507.

Lifshitz R., Gitler C., and Moses E. (1981). Liposomes as immunological adjuvants in eliciting antibodies specific to synthetic polypeptide poly(LTyr, LGlu) poly(LLys) with high frequency of site-associated idiotypic determinants. *Eur. J. Immunol.*, **11**: 398.

López M.G., Peralta A., Berinstein A., Fondevilla N., Carrillo E., and Taboga O. (2005). High-level expression of recombinant 3AB1 non-structural protein from FMDV in insect larvae. *J. Virol. Methods.* 124: 221-224.

Luo L., Li Y., and Kang C.Y. (1990). Expression of gag precursor protein and secretion of virus-like gag particles of HIV-2 from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Virology* 179: 874-880.

Mathieu M., Petitpas I., Navaza J., Lepault J., Kohli E., Pothier P., Venkataram Prasad B.V., Cohen J., and Rey F.A. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *The EMBO Journal.* 20(7): 1485-1497.

McLain L., Durrani Z., Wisniewski A.L., Porta C., Lomonosoff G.P., and Dimmock N.J. (1996). Stimulation of neutralizing antibodies tp human immunodeficiency virus type 1 in three strains of mice immunized with a 22 amino acids peptide of gp41 expressed on the surface of a plant virus. *Vaccine.* 14(8): 799-810.

Mena J.A., Ramirez O.T., and Palomares L.A. (2005). Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *J. Biotechnol.* Nov. 11.

Millich D.R., McLachlan A., Stahl S., Wingfield P., Thorthon G.B., Hughes J.L., and Jones J.E. (1988). Comparative immunogenicity of hepatitis B core and e antigens. *J. Immunol.* 141: 3617-3624.

Morrow C.D., Novak M.J., Ansardi D.C., Porter D.C., and Moldoveanu Z. (1999). Recombinant viruses as vectors for mucosal immunity. "Current Topics in Microbiology and Immunology". Vol 236, "Defense of mucosal surfaces: Pathogenesis, immunity and vaccines". pp 255-273. (Krehenbuhl and Neutra, Eds).

Netter H.J., Woo W.P., Tindle R., Macfarlan R.I., and Gowans E.J. (2003). Immunogenicity of recombinant HbsAg/HCV particles in mice pre-immunised with hepatitis B virus-specific vaccine. *Vaccine* 21: 2692-2697.

Niikura M., Takamura S., Kim G., Kawai S., Saijo M., Morikawa S., Kurane I., Li T.C., Takeda N., and Yasutomi Y. 2002. Chimeric recombinant hepatitis E virus-like particles as an oral vaccine vehicle presenting foreign epitopes. *Virology.* 293: 273-280.

Noad R and Roy P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends in Microbiology.* 11(9): 438-444.

O'Neal C.M., Crawford S.E., Estes M.K., and Conner M.E. (1997). Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity. *J. Virol.* 71: 8707-8717.

O'Reilly D., Miller L.K., and Luckow, V.A. (1991). "Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual". W H Freeman and Company, New York, NY.

Pasek M., Goto T., Gilbert W., Zink B., Schaller H., Mackay P., Leadbetter G., and Murray K. (1979). Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature* 282: 575-579.

Petitpas I., Lepault J., Vachette P., Charpelienne A., Mathieu M., Kohli E., Pothier P., Cohen J., and Rey F.A. (1998). Crystallization and preliminary X-ray analysis of Rotavirus protein VP6. *J. Virol.* 72(9): 7615-7619.

Porta C., Spall V., Lin T., Johnson J., and Lomonosoff G. (1996). The development of cowpea mosaic virus as a potential source of novel vaccines. *Intervirology*, **39**: 79.

Pumpens P., Borisova G.P., Crowther R.A., and Grens E. (1995) Hepatitis B virus core particles as epitope carriers. *Intervirology*, **38**: 63.

Rasmussen L., Battles J.K., Ennis W.H., Nagashima K., and Gonda M. (1990). Characterization of virus-like particles produced by a recombinant baculovirus containing the gag gene of the bovine immunodeficiency-like virus. *Virology* 178: 435-451.

Ready K.F.M., Buko K.M.A., Whippey P.W., Alford W.P., and Bancroft J.B. 1988. The structure of tubes of bovine rotavirus nucleocapsid protein (VP6) assembled in vitro. *Virology*. 167: 50-55.

Reddy D.A., Bergmann C.C., Meyer J.C., Berriman J., Both G.W., Coupar B.E.H., Boyle D.B., and Andrew M.E. 1992. Rotavirus VP6 modified for expression on the plasma membrane forms arrays and exhibits enhanced immunogenicity. *Virology*. 189: 423-434.

Redmond M.J., Bielefeldt O.H., Huges H.P.A., Sabara M.I., Frenchick P.J., and Attah-Poku S.K. (1991). Rotavirus particles function as immunological carriers for the delivery of peptides from infectious agents and endogenous proteins. *Mol.Immunol.*, **28**: 269.

Redmond M.J., Ijaz M.K., Parker M.D., Sabara M.I., Dent D., Gibbons E., and Babiuk L.A. (1993). Assembly of recombinant rotavirus proteins into virus-like particles and assessment of vaccine potential. *Vaccine*, **11**: 273

Rose R.C., Bonnez W., Reichman R.C., and Garcea R.L. (1993). Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of virus-like particles. *J. Virol.* 67: 1936-1944.

Rosen E., Stapleton J.E., and McLinden J. (1993). Synthesis of immunogenic hepatitis A virus particles by recombinant baculoviruses. *Vaccine* 11: 706-712.

Rosenberg I.M. (1996). Protein Analysis and Purification. Benchtop Techniques. Editado por Birkhäuser Boston. Boston, USA.

Roseto A., Escaig J., Delain E., Cohen J., and Scherrer R. (1979). Structure of rotavirus as studied by the freeze-drying technique. *Virology.* 98: 471-475.

Roy P. French T.J., Erasmus B.J. (1992). Protective efficacy of virus-like particles for bluetongue disease. *Vaccine.* 1: 28-32.

Roy P. Bishop D.H.L., LeBois H., Erasmus B.J. (1994). Long-lasting protection of sheep against bluetong challenge after vaccination with virus-like particles. Evidence for homologous and partial heterologous protection. *Vaccine.* 1: 805-811.

Rueda P., Hurtado A., del Barrio M., Martinez-Torrecuadrada J.L., Kamstrup S., Leclerc C., and Casal I. (1999). Minor displacements in the insertion site provoke major differences in the induction of antibody responses by chimeric parvovirus-like particles. *Virology.* 263: 89-99.

Ruedl C., Schwarz K., Jegerlehner A., Storni T., Manolova V., and Bachmann M.F. (2005). Virus-like particles as carriers for T-cell epitopes: limited inhibition of T-cell priming by carrier-specific antibodies. *J. Virol.* 79(2): 717-724.

Ruffing M., Zentgraf H., and Kleinschmidt J.A. (1992). Assembly of virus-like particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J. Virol.* 66: 6922-6930.

Sabara M., Ready K.F.M., Frenchick P.J., and Babiuk L.A. (1987). Biochemical evidence for the oligomeric arrangement of bovine rotavirus nucleocapsid protein and its possible significance in the immunogenicity of this protein. *J. Gen. Virol.* 68: 123-133.

Saif L., Bohl E.H., Kohler E.M., Hughes J.H. (1977). Immune electron microscopy of transmissible gastroenteritis virus and rotavirus (reovirus-like agents) of swine. *Am. J. Vet. Res.* 38: 13-20.

Saini M. and Vratsi S. (2003). A Japanese Encephalitis Virus peptide present on Johnson Grass Mosaic Virus-Like particles induces virus-neutralizing antibodies and protects against lethal challenge. *J. Virol.* 77(6): 3487-3494.

Salimans M.M.M., van Bussel M.J.A.W.M., Brown C.S., and Spaan W.J.M. (1992). Recombinant parvovirus B19 capsids as a new substrate for detection of B19-specific IgG and IgM antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods* 39: 247-258.

Schlienger K, Mancini M, Riviere Y, Dormont D, Tiollais P, Michel ML. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 major neutralizing determinant exposed on hepatitis B surface antigen particles is highly immunogenic in primates. *J. Virol.* 66: 2570-2576.

Schödel F., Peterson D., and Milich D. (1995) Hepatitis B Virus Core and e Antigen: Immune recognition and use as vaccine carrier moiety. *Intervirology*, **39**: 104.

Schödel F., Moriarty A.M., Peterson D.L., Zheng J., Hughes J.L., Will H., Leturcq D.J., Mcgee J.S., and Milich D.R. (1992). The position of heterologous epitopes inserted in hepatitis B virus core particles determines their immunogenicity. *J. Virol.* 66: 106-114.

Schutze M.P., Leclerc C., Jolivet M., Audibert F., and Chedid L. (1985). Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. *J. Immunol.* 135(4): 2319-2322.

Sedlick C., Sarraseca J., Rueda P., Leclerc C., and Casal I. (1995). Immunogenicity of poliovirus B and T cell epitopes presented by hybrid porcine parvovirus-like particles. *J. Gen. Virol.* 76(9): 2362-2368.

Sedlick C., Saron M.F., Sarraseca J., Casal I., and Leclerc C. (1997). Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 7503-7508.

Sedlick C., Dridi A., Deriaud E., Saron M.F., Rueda P., Sarraseca J., Casal I., and Leclerc C. (1999). Intranasal delivery of recombinant parvovirus-like particles elicits cytotoxic T-cell and neutralizing antibody responses. *J. Virol.* 73(4): 2739-2744.

Shah S., Raghupathy R., Sing H., Talwar G.P., and Sodhi A. (1999). Prior immunity to a carrier enhances antibody responses to hCG in recipients of an hCG-carrier conjugate vaccine. *Vaccine* 17: 3116-3123.

Shuttleworth G., eckery D.C., and Awram P. (2005). Oral and intraperitoneal immunization with rotavirus 2/6 virus-like particles stimulates a systemic and mucosal immune response in mice. *Arch. Virol.* 150: 341-349.

Sugiyama Y., Hamamoto H., Takemoto S., Watanabe Y., and Okada Y. (1995). Systemic production of foreign peptides on the particle surface of tobacco mosaic virus. *FEBS Lett.* 359: 247-250.

Suzich J.A., Ghim S.J., Palmer-Hill F.J., White WI, Tamura KJ, Bell JA, Newsomw JA, Jenson AB, and Schleger L. (1995). Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 11553-11557.

Taboga O, Tami C, Carrilo E, Nuñez JI, Rodriguez A, Saiz JC, Blanco E, Valero ML, Roig X, Camarero JA, Andreu D, mateu MG, Giralt E, Domingo E, Sobrino F, Palma EI. (1997). A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation os escape mutants. *J. Virol.* 71: 2606-2614.

Tami C, Farber M, Palma E, Taboga O. (2000) Presentation of antigenic sites from foot-and-mouth disease virus on the surface of baculovirus and in the membrane of infected cells. *Arch Virol*, **145**: 1.

Tami C, Peralta A, Barbieri R, Berinstein A, Carrillo E, Taboga O. (2004). Immunological properties of FMDV-gp64 fusion proteins expressed on Sf9 cell and baculovirus surfaces. *Virology* 316: 161-170.

Tang B., Gilbert J.M., matsui S.M., and Greenberg H.B. (1997). Comparison of the rotavirus gene 6 from different species by sequence analysis and localization of subgroup-specific epitopes using site-directed mutagenesis. *Virology* 237: 89-96.

Thomsem D.R., Meyer A.L., and Post L.E. (1992). Expression of feline leukaemia virus gp85 and gag proteins and assembly into virus-like particles using the baculovirus expression vector system. *J. Gen. Virol.* 73: 1819-1824.

Thouless M.E., Beards G.M., and Flewett T.H. 1982. Serotyping and subgrouping of rotavirus strains by the ELISA test. *Arch. Virol.* 73: 219-230.

Tian Y., Hu Y., Schilling W.P., Lindsay D.A., Eiden J., and Estes M.K. (1994). The non-structural glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. *J. Virol.* 68: 251-257.

Tindle R.W., Herd K., Londono P., Fernando G.F.P., Chatfield S.N., Malcolm K., and Dougan G. (1994). Chimeric hepatitis B core antigen particles containing B and Th epitopes of human papillomavirus type 16 E7 protein induce specific antibody and T-helper responses in immunised mice. *Virology.* 200: 547-557.

Tosser G., Labbé M., Brémont M., and Cohen J. (1992). Expression of the major capsid protein VP6 of group C Rotavirus and synthesis of chimeric single-shelled particles by using recombinant baculoviruses. *J. Virol.* 66(10): 5825-5831.

Turpen T, Reini S, Charoenvit Y., Hoffman S, Fallarme V, and Grill L. (1995). Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. *Bio. Technology*, **13**: 53.

Valenzuela P., Medina A., Rutter W.J., Ammerer G., and Hall B.D. (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B surface antigen particles in yeast. *Nature* 298; 347-350.

Volpers C., Schimacher P., Streeck R.E., and Sapp M. (1994). Assembly of the major and the minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells. *Virology* 200: 504-512.

Von Brunn A., Brand M., Reichhuber C., Morys-Wortmann C., Deinhardt F., and Schödel F. (1993). Principal neutralizing domain of HIV-1 is highly immunogenic when expressed on the surface of hepatitis B core antigens. *Vaccine.* 11: 817-824.

Wagner R., Fliessbach H., Wanner G., Motz M., Niedrig M., Deby G., von Brunn A., and Wolf H. (1992). Studies on processing, particle formation, and immunogenicity of the HIV-1 gag gene product: a possible component of a HIV vaccine. *Arch. Virol.* 127: 117-137.

Wagner R, Demi L, Notka F, Wolf H, SchirmbeckR, Reimann J, Teeuwesen V, Heeney J. (1995) Safety and immunogenicity of recombinant human immunodeficiency virus-like particles in rodents and Rhesus Macaques. *Intervirology*, **39**: 93.

Wang L., Huang J.A., Nagesha H.S., Smith S.C., Phelps A., Holmes I., Martyn J.C., Coloe P.J., and Reeves P.R. (1999). Bacterial expression of the major antigenic regions of porcine rotavirus VP7 induces a neutralizing immune response in mice. *Vaccine*. 17: 2636-2646.

Weidt G, Deppert W, Utermohlen J, Lehmann-Grube F. (1995) Emergence of virus escape mutants after immunization with epitope vaccine. *J. Virol.* 69: 7147-7151.

Willemse M.J., van Schooneveld S.H., Chalmers W.S., and Sondermeijer P.J. (1996). Vaccination against feline leukaemia using a new feline herpesvirus type 1 vector. *Vaccine* 16: 1511-1516.

Xiang Z.Q., gao G.P., Reyes-Sandoval A., Li Y., Wilson J.M., and Ertl H.C. (2003). Oral vaccination of mice with adenoviral vectors is not impaired by preexisting immunity to the vaccine carrier. *J. Virol.* 77(20): 10780-10789.

Yoshida S., Kondoh D., Arai E., Matsouka H., Seki C., Tanaka T., Okada M., and Ashii A. (2003). Baculovirus virions displaying Plasmodium berghei circumsporozoite protect against malaria sporozoite infection. *Virology*, 316: 161-170.

Zeng C.Q.Y., Wentz M.J., Cohen J., Estes M.K., Ramig R.F. (1996). Characterization and replicase activity of double-layered and single-layered rotavirus-like particles expressed from baculovirus recombinants. *J. Virol.* 70: 2736.2742.