



**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE  
VEHICULIZACIÓN DE ANTÍGENOS DE ROTAVIRUS, A  
PARTIR DE VLPS  
DERIVADAS DE LA PROTEÍNA  
Z DEL VIRUS JUNÍN.**

---

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

DIRECTOR: DRA. CRISTINA SILVIA BORIO  
CO-DIRECTOR: DR. MARCOS FABIÁN BILEN

**EST. JULIÁN AXEL BERGIER**

**2016**





## RESUMEN

El trabajo “Vehiculización de la región C-terminal de la proteína VP6 de Rotavirus a partir de VLPs derivadas de la expresión de la proteína Z del virus Junín” fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Cristina S. Borio y la Codirección del Dr. Marcos F. Bilén, en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular, área de virosis emergentes y zoonóticos (LIGBCM-AVEZ) en el departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes.

La estructura del documento se encuentra dividida en seis capítulos:

En el **primer capítulo**, se encuentra el estado del arte de los Arenavirus, con un enfoque principal en el virus Junín. Brindando sus características, su replicación y transcripción, sus mecanismos de entrada en la célula del hospedador, la descripción de cada una de sus proteínas, con una mayor descripción de la proteína de matriz Z, la cual en este trabajo es utilizada como plataforma de vehiculización de antígenos. También se detalla al virus Rotavirus, con una breve descripción de cada una de sus proteínas, siendo VP6 la más detallada. Por último, se realiza una descripción de las vacunas basadas en VLPs y en ADN.

En el **capítulo 2**, se encuentran los materiales y métodos utilizados para el desarrollo de este trabajo.

El **capítulo 3**, detalla los resultados bioinformáticos obtenidos del estudio de la porción C-terminal de la proteína VP6, seleccionada como el antígeno de estudio de este trabajo.

En el **capítulo 4** se desarrollan los resultados obtenidos a partir de la generación de las herramientas necesarias para cumplir el objetivo de este trabajo. En particular, se detalla la construcción de los plásmidos utilizados, tanto para su uso en células procariotas como eucariotas. También se describe la producción y purificación de CT-VP6, de la proteína GFP y de los plásmidos ultrapuros.

En el **capítulo 5** se describen los resultados obtenidos en los ensayos *In vitro* e *In vivo*, utilizando las herramientas generadas en el capítulo anterior. Los mismos corresponden a la expresión del antígeno en células de mamífero en cultivo y a los ensayos de inmunización en ratones

Por último, en el **capítulo 6**, se analizan los resultados obtenidos en cada uno de los capítulos antes mencionados y se realiza una discusión de los mismos.



## GLOSARIO

**$\alpha$ DG**: Receptor de  **$\alpha$ -dístroglicano**

**aa**: **Aminoácidos**

**ADN**: **Ácido desoxiribonucleíco**

**APL**: *Acute Promyelocytic Leukemia*

**ARN S**: Segmento S o *Small*

**ARN**: **Ácido ribonucleíco**

**ARNm**: **ARN mensajero**

**CAP** o **m<sup>7</sup>GTP**: 7-metil guanosina-trifosfato

**Caspasas**: *Cysteine-dependent aspartate-specific proteases* o Proteasas específicas de aspartato, dependientes de cisteína.

**CCVs**: *Clathrin-Coated Vesicles* o Vesículas Cubiertas de Clatrina.

**CT-VP6**: C-terminal de VP6, con los aminoácidos 332-397.

**DLPs**: Partículas con doble capa, en particular las dos capas internas

**DTT**: Dithiothreitol

**EGFP**: *Enhanced Green Fluorescent Protein*

**ELISA**: **Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay**

**ESCRT**: *Endosomal sorting complexes required for transport*

**FHA**: Fiebre Hemorrágica Argentina

**FHA**: Fiebre Hemorrágica Argentina

**GFP**: *Green Fluorescent Protein* o Proteína fluorescnete verde

**GP1** o **G1**: **Glicoproteína 1**

**GP2** o **G2**: **Glicoproteína 2**

**GPC**: Precursor de las glicoproteínas

**GST**: **Glutación-S-Transferasa**

**HEK**: *Human Embryonic Kidney*

**HEX**: *Hematopoietically Expressed homeobox*

**His**: Poli **Histidina**

**His**: Poli **Histidina**

**IFN**: **Interferón**

**INF**: Incompleto de Freund

**IRF-3**: Factor de regulación de Interferón **3**

**IRF-7**: Factor de regulación de Interferón **7**

**JUNV:** Junín Virus

**L:** ARN polimerasa

**LASV:** Lassa Virus

**MAVS:** *Mitochondrial antiviral signaling proteins*

**MPLA:** Monofosforil lípido A

**MVBs:** *Multivesicular Bodies* o cuerpos multivesiculares

**NF1:** Factor nuclear 1

**NP o N:** Nucleoproteína

**ARN L:** Segmento L o *Large*

**NSP:** Proteínas no estructurales

**ORF:** *Open Read Frame* (Marco de lectura abierto)

**P (P0, P1 y P2):** Proteínas ribosomales

**PEP:** Péptido con los aminoácidos 368-397 de CT-VP6

**PML:** Proteína de la leucemia promielocítica o *Promyelocytic Leukemia Protein*

**PRH:** *Proline-rich Homeodomain Protein*

**PRRs:** Receptores celulares de reconocimiento de patrones

**RdRp:** ARN polimerasa ARN dependiente

**RIG-I:** *Retinoic-acid inducible gene-1*

**SSP:** Péptido señal

**TfR1:** Receptor de Transferrina 1

**TLPs:** Partículas virales de triple capa

**TSG101:** *Tumor susceptibility gene 101*

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

**VLPs:** *Virus Like Particles* o partículas tipo virales

**VP (1, 2, 3, 4, 6, 7):** Proteínas estructurales 1, 2, 3, 4, 6, 7

## ÍNDICE

Capítulo 1 – INTRODUCCIÓN	
<b>1.1 La familia Arenavirus</b>	<b>1</b>
<b>1.2. El virus Junín</b>	<b>1</b>
1.2.1. Características del virión	1
1.2.2. Replicación y Transcripción	3
1.2.3. Mecanismos de entrada de los Arenavirus	5
1.2.4. Proteínas virales	6
<i>El precursor de las glicoproteínas (GPC)</i>	6
<i>La proteína de la nucleocápside (N)</i>	6
<i>La ARN polimerasa dependiente de ARN (L)</i>	8
<i>La proteína de matriz (Z)</i>	9
<i>Interacciones con proteínas celulares</i>	12
1.2.5. Z como plataforma de vehiculización de antígenos	14
<b>1.3. Rotavirus</b>	<b>16</b>
1.3.1. Enfermedad	16
1.3.2. Estructura	17
1.3.3. Proteínas virales	17
1.3.4. Proteína VP6	18
1.3.5. VP6 como antígeno	19
<b>1.4. Vacunas a VLPs</b>	<b>20</b>
<b>1.5. Vacunas a ADN</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVO E HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
Capítulo 2 – MATERIALES Y MÉTODOS	
<b>2.1. Análisis bioinformático</b>	<b>25</b>
<b>2.2. Técnicas de biología molecular</b>	<b>25</b>
2.2.1. Electroforesis de ácidos nucleicos	25
2.2.2. Electroforesis de proteínas	25
2.2.3. Extracciones plasmídicas	26
2.2.4. Extracciones plasmídicas a gran escala	26
2.2.5. Digestiones Enzimáticas	27
2.2.6. Ligaciones	28
2.2.7. Electroporación y plaqueo	28
2.2.8. Síntesis y amplificación de ADN mediante PCR	28
2.2.9. Oligonucleótidos y <i>Primers</i>	28
2.2.10. Selección de clones positivos: <i>Colony PCR</i>	29
2.2.11. Secuenciación	30
2.2.12. Precipitación de ácidos nucleicos	30
2.2.13. Cuantificación de ácidos nucleicos	30

<b>2.3. Expresión y purificación de proteínas en <i>E. Coli</i></b>	<b>30</b>
2.3.1. Expresión de CT-VP6-His	30
2.3.2. Lisis celular	31
<i>Lisis por métodos químicos</i>	31
<i>Lisis por métodos enzimáticos</i>	31
<i>Lisis por métodos físicos</i>	31
<i>Lisis por método mixto</i>	32
2.3.3. Purificación de CT-VP-His	32
<i>En condiciones nativas</i>	32
<i>En condiciones desnaturalizantes</i>	32
2.3.4. Análisis por espectrometría de masa	32
2.3.5. Cuantificación de proteínas totales	33
<b>2.4. Técnicas de biología celular</b>	<b>33</b>
2.4.1. Líneas celulares de Mamíferos	33
2.4.2. Mantenimiento de líneas celulares de mamíferos	33
2.4.3. Transfección de células de mamífero	33
<b>2.5. Técnicas de microscopía</b>	<b>34</b>
2.5.1 Microscopía de fluorescencia	34
<b>2.6. Ensayos y métodos inmunológicos</b>	<b>34</b>
2.6.1 Inmunización de ratones	34
2.6.2 Enzimo-inmuno Ensayo (EIE o ELISA)	36
2.6.3 Inmunodetección ( <i>Western blot</i> )	37
2.6.4. Titulación de rotavirus en materia fecal	37

### Capítulo 3 - ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

<b>3.1. Selección del antígeno CT-VP6</b>	<b>39</b>
<b>3.2. Selección del péptido 368-397</b>	<b>40</b>
<b>3.3. Perfil de hidrofobicidad de CT-VP6</b>	<b>40</b>
<b>3.4. Predicción de estructura de CT-VP6</b>	<b>41</b>
<b>3.5. Optimización de codones de CT-VP6</b>	<b>42</b>
<b>3.6. Propiedades bioquímicas</b>	<b>43</b>

### Capítulo 4 - GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS

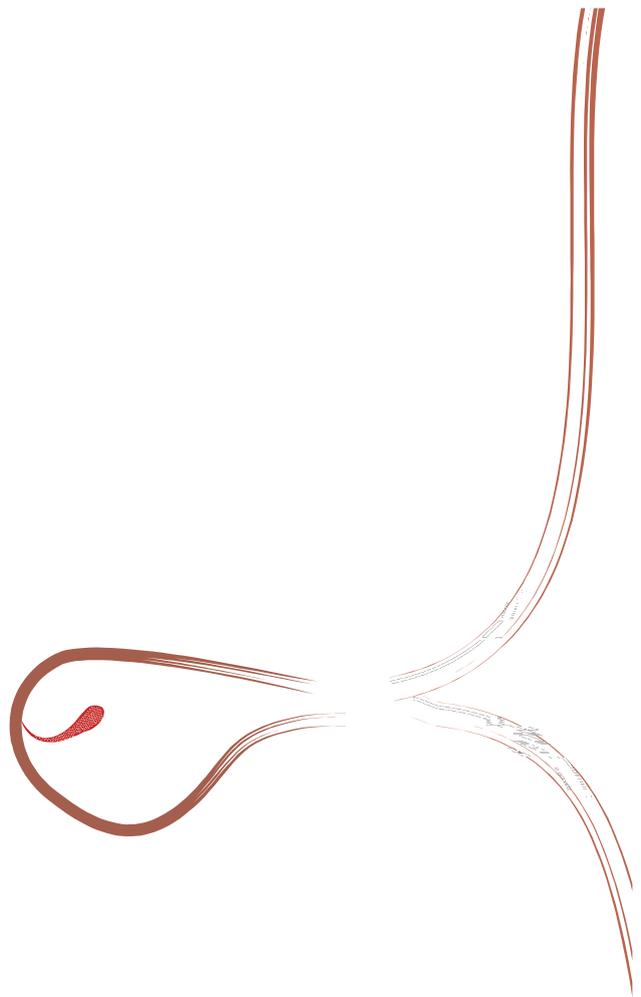
<b>4.1. Producción de CT-VP6</b>	<b>45</b>
4.1.1. Clonado de CT-VP6 en vectores procariotas	45
<i>Síntesis de CT-VP6</i>	45
<i>Clonado de CT-VP6 en pGEM-T (pGem-T-CT-VP6)</i>	48
<i>Clonado de CT-VP6 en pET-28a (pET-CT-VP6-His)</i>	50
<i>Clonado de CT-VP6 en pTio-Z-His y pGST-Z (pTio-CT-VP6-His y pGST-CT-VP6)</i>	52
4.1.2. Clonados de CT-VP6 en vectores eucariotas	54
<i>Clonado de Z-CT-VP6 en pcDNA3.1-IntronA (pIntA-Z-CT-VP6)</i>	54

<i>Clonado de CT-VP6 en pcDNA3.1-Intron A (plntA-CT-VP6)</i>	56
<i>Clonado del péptido 368-397 fusionado a Z en pcDNA3.1-Intron A (plntA-Z-PEP)</i>	57
4.1.3. Expresión de CT-VP6-His en <i>E. Coli</i>	58
4.1.4. Lisis Celular	59
<i>Lisis por métodos químicos</i>	60
<i>Lisis por método enzimáticos</i>	60
<i>Lisis por métodos físicos</i>	61
<i>Lisis por método mixto</i>	63
4.1.5. Expresión de Tio-CT-VP6-His y GST-CT-VP6 en <i>E. Coli</i>	64
4.1.6. Purificación de CT-VP6-His	65
4.1.7. Estabilidad de CT-VP6-His purificada	67
4.1.8. Análisis por espectrometría de masa	68
<b>4.2. Producción de GFP en <i>E. Coli</i></b>	71
4.2.1. Expresión de GFP	71
4.2.2. Purificación de GFP	71
<b>4.3. Producción de plásmidos ultrapuros</b>	72
4.3.1. Cromatografía de intercambio iónico DEAE	73
4.3.2. Extracción orgánica/PEG8000	74
<b>Capítulo 5 -ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO</b>	
<b>5.1. Estudios <i>in vitro</i></b>	77
<b>5.2. Estudios <i>in vivo</i></b>	78
<b>5.2.1. Ensayo de inmunización en ratones para GFP</b>	78
<b>5.2.2. Ensayo de inmunización en ratones para CT-VP6</b>	80
<b>Capítulo 6 – DISCUSIÓN</b>	
<b>6.1 Discusión y conclusiones</b>	85
<b>ANEXO</b>	91
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	95
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	103



# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN





## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 La familia *Arenavirus*

La familia *Arenaviridae* ha sido caracterizada por poseer un único género llamado *Arenavirus*. Sin embargo desde el año 2014 el ICTV ha modificado su clasificación, a partir de las recientes publicaciones independientes de aislamientos de un grupo divergente de *Arenavirus* en serpientes del orden Alethinophidia (en cautiverio). Por este motivo, actualmente la familia *Arenaviridae* se divide en dos géneros: *Mammarenavirus* y *Reptarenavirus* (Radoshitzky *et al.*, 2015). Y tal como previamente se dividía al género *Arenavirus*, el nuevo género *Mammarenavirus* se divide en dos grandes grupos: los *Arenavirus* del Viejo Mundo y los del Nuevo Mundo (Charrel, de Lamballerie, & Emonet, 2008). Los *Arenavirus* pertenecientes al primer grupo se aislaron en África y Europa, mientras que los del Nuevo Mundo, en América. (Buchmeier *et al.*, 1981; Rawls & Buchmeier, 1976; Murphy & Withfield, 1975; Pfau, 1974; Murphy *et al.*, 1970; Rowe *et al.*, 1970b; Murphy *et al.*, 1969; Dalton *et al.*, 1968).

Esta familia de virus posee un genoma de ARN bisegmentado y los mismos son envueltos en una membrana lipoprotéica. Los segmentos del genoma, denominados S y L (*short* con 3500 nucleótidos y *large* con 7300 nucleótidos de longitud, respectivamente) codifican para dos marcos de lectura abiertos (ORF), cada uno, en orientación ambisentido (Figura 1.1). (Auperin *et al.*, 1984).

### 1.2. El virus Junín

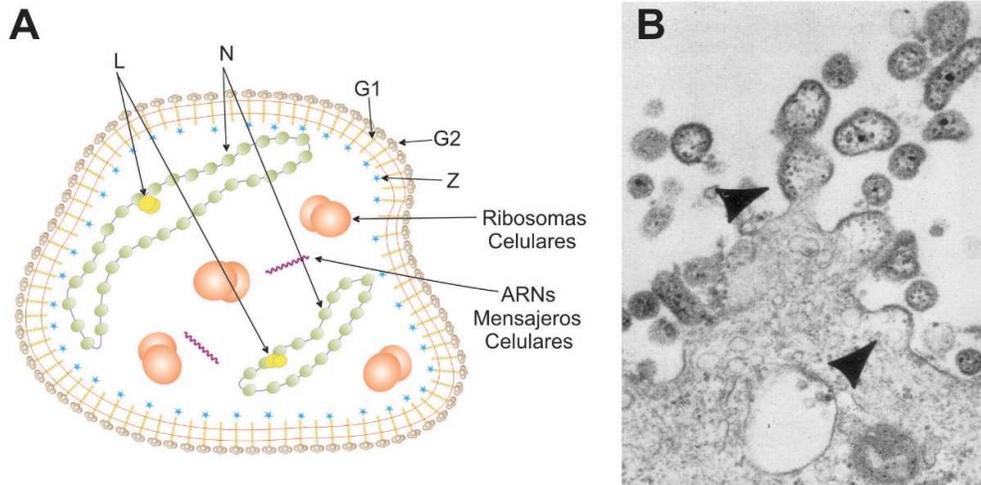
El virus Junín es miembro del grupo de los Virus del nuevo mundo, dentro de la familia *Arenaviridae*, y es el agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA). Esta enfermedad endémica de la región agroproductora de la República Argentina fue descrita por primera vez por el Dr. Arribáizaga en 1955 (Arribáizaga *et al.*, 1955), y el agente viral causante de la FHA fue aislado por primera vez en 1958, a partir de muestras de pacientes, por el Dr. Parodi (Parodi *et al.*, 1959).

Luego en 1970, a partir de los aislamientos del Dr. Parodi, se logró caracterizar serológicamente, fisicoquímicamente y morfológicamente al virus Junín. Y fue a partir de los resultados obtenidos que se lo integró dentro de la familia *Arenaviridae*. (Pfau, 1974; Rowe *et al.*, 1970).

#### 1.2.1. Características del virión

Los virus de la familia *Arenaviridae* se caracterizan por poseer una membrana lipídica que los recubre y una estructura pleomórfica, de aproximadamente 50-200 nm de

diámetro (Murphy & Whitfield, 1975; Gschwender *et al.*, 1975; Ofodile *et al.*, 1973; Speir *et al.*, 1979; Murphy *et al.*, 1969 y 1970; Dalton *et al.*, 1968). En la literatura se ha descrito que los viriones poseen ribosomas en el viroplasma, lo que llevó a nombrarlos arenavirus (**Figura 1.2 B**), al asemejarse a granos de arena, aunque nunca se logró comprobar realmente la presencia de los mismos (Gómez *et al.*, 2011).



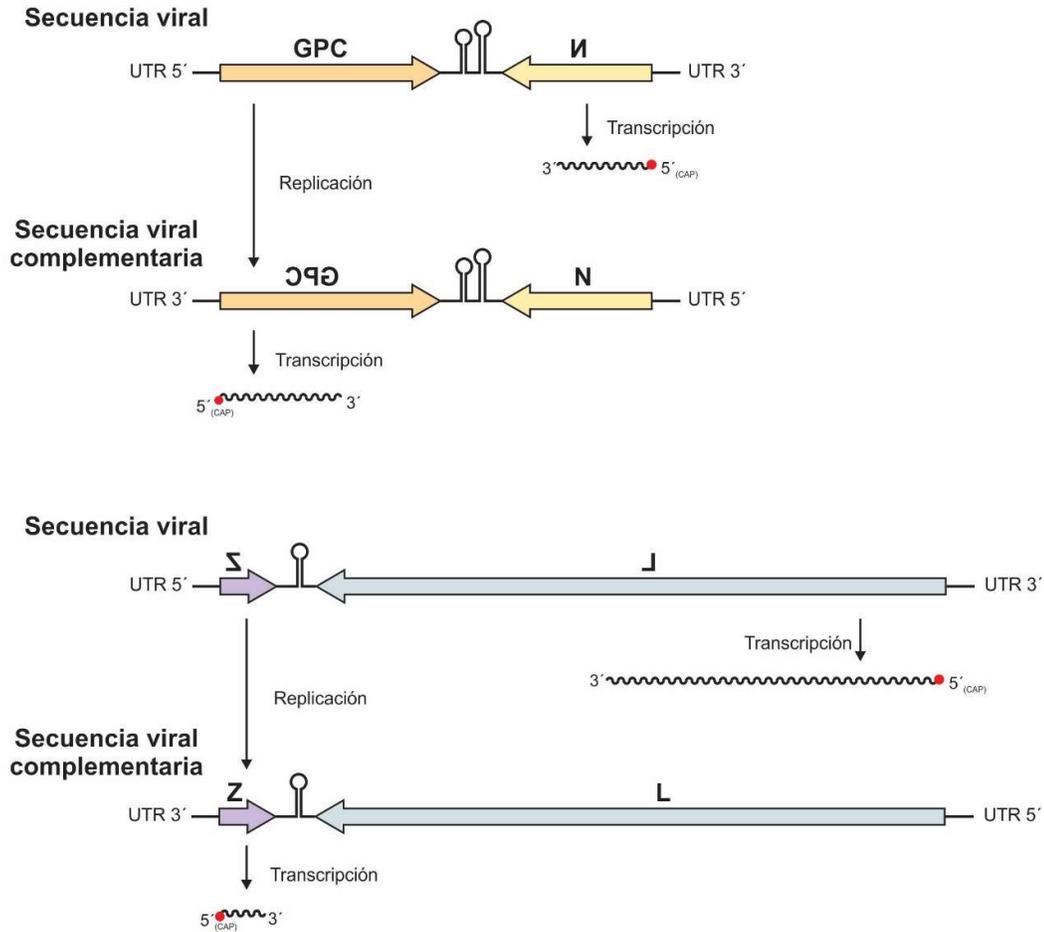
**Figura 1.2 A. Esquema de la estructura del virión.** La envoltura lipídica se encuentra representada por la doble línea roja, recubierta por las glicoproteínas G1 y G2 en la superficie extracelular y por la proteína Z, en la superficie interior. Dentro del virión se encuentran las nucleocápsides circulares en forma de collar de perlas, las cuales se encuentran asociadas a la proteína L, junto con el ARN mensajero (ARNm) y ribosomas celulares. **B.** Microscopía electrónica de transmisión de una célula infectada, donde se observa el proceso de brotación viral desde la membrana plasmática. Aumento x45000 (Murphy *et al.*, 1970).

Su genoma está organizado en dos segmentos de ARN simple cadena uno pequeño (S) y otro largo (L). Ambos fragmentos contienen dos marcos abiertos de lectura, no solapados y de sentido opuesto. El segmento L posee a la proteína de matriz Z de 94 aa y 10,459 kDa junto con la ARN polimerasa dependiente de ARN (proteína L), de 2210 aa y 252,764 kDa. Por otro lado, en el segmento S se encuentra codificada la nucleoproteína N (537 aa, 60,003 kDa), y el precursor de las glicoproteínas, el cual sufre modificaciones post-traduccionales dando origen a la glicoproteína G1 (192 aa, 22,154 kDa), la glicoproteína G2 (235 aa, 27,118 kDa) y al péptido señal (58 aa, 6,370 kDa) (**Figura 1.2 A**).

### 1.2.2. Replicación y Transcripción

Los segmentos S y L, poseen en ambos extremos una región no codificante de aproximadamente 19 nucleótidos, las cuales son complementarias entre sí. Esto ha permitido a algunos autores proponer la existencia de una estructura de tipo mango de sartén o *Panhandle* para cada segmento del genoma (Auperin *et al.*, 1982 a y b). En la literatura también se describe que los 19 nucleótidos del extremo 3' podrán ser reconocidos por la proteína L como inicio a la transcripción del genoma viral (Günther & Lenz, 2004). Por otro lado, existe otra región no codificante, la cual se encuentra entre los dos marcos abiertos de lectura de cada segmento. Éstas regiones intergénicas poseen estructuras de tipo *hairpin* y se ha demostrado que las mismas participan en la regulación de la transcripción génica (Gómez *et al.*, 2011).

Los ARNs genómicos desnudos de los arenavirus no son infectivos, dado que no pueden ser utilizados como ARNm por la célula hospedadora. Por este motivo, para que el virus sea infectivo y logre transcribir su genoma, debe imperativamente contener al menos una molécula de la polimerasa viral dentro del virión. De esta manera los ARNm de las proteínas N y L son transcritos por la polimerasa viral a partir del extremo 3' del ARN genómico S ó L, respectivamente. Una vez traducidas las proteínas N y L, es posible obtener los ARNs virales antígenómicos de longitud completa, que son las formas replicativas del genoma viral. Posteriormente, los ARNm de GPC y Z son transcritos a partir del extremo 3' del ARN viral antígenómico S o L, respectivamente (Figura 1.3).



**Figura 1.3** Estrategia de organización y codificación del genoma de los arenavirus. Ambos segmentos genómicos (S y L) se encuentran esquematizados, y se indican los marcos de lectura abiertos en la polaridad correspondiente. A partir de la molécula de genoma viral la ARN polimerasa viral genera un transcrito directo parcial y un transcrito directo de longitud completa. Luego se genera una secuencia viral antigenómica, a partir de la cual se generan los nuevos transcritos de orientación inversa. Los ARN mensajeros, los cuales contienen una estructura de CAP en su extremo 5', se producen a partir de las secuencias virales y virales complementarias de cada segmento.

La obtención del ARNm de N y L, como resultado de la transcripción viral o la obtención del ARN antigenómico de longitud completa, como intermediario de la replicación, es un fenómeno regulado, en el que la estructura de las regiones intragénicas de cada uno de los ARNs genómicos, y la presencia de algunas de las proteínas virales, juegan un rol central. Como ya se mencionó, la región intergénica no codificante posee la capacidad de formar una estructura secundaria muy estable en forma de horquilla o *hairpin*, la que

podría ser responsable de esta regulación, actuando como terminador de la transcripción (Ghiringhelli *et al.*, 1991; Iapalucci *et al.*, 1991; Rivera Pomar *et al.*, 1991; Franze Fernández *et al.*, 1987; Romanowski *et al.*, 1985). En este modelo, basado en experimentos *in vivo*, se propuso que el cambio de la transcripción del ARNm a la replicación de la hebra antígenómica ocurre mediante la relajación de esta región intergénica, a partir de la interacción con la proteína N de forma dependiente de su concentración (Tortorici *et al.*, 2001). Sin embargo, años después, Pinschewer *et al.*, (2003) utilizando un modelo replicativo *in vitro*, sugirieron que los niveles de expresión de N no eran suficientemente significativos como para controlar los procesos de transcripción/replicación. Hasta la fecha, aún no se han confirmado los factores responsables de la regulación de estos procesos, lo que aún hoy demanda su estudio.

### 1.2.3. Mecanismos de entrada de los Arenavirus

De manera de dar comienzo al ciclo viral, el virión debe lograr su unión a la célula hospedadora. Los arenavirus del Viejo Mundo y los del clado C del Nuevo Mundo, ingresan en la célula a través de la unión al receptor de  $\alpha$ -distroglicano ( $\alpha$ DG) (Cao *et al.*, 1998; Spiropoulou *et al.*, 2002), mientras que los miembros de los clados A y B del Nuevo Mundo, incluido el virus Junín, utilizan el receptor de transferrina (TfR1) (Abraham *et al.*, 2010; Radoshitzky *et al.*, 2007). Este receptor se encarga del transporte de hierro al interior celular, y es por este motivo que en individuos con dietas bajas en hierro, la sobreexpresión de este receptor puede resultar en un peor pronóstico de la enfermedad. Al utilizar éste receptor, reconocido por G1, el virus es internalizado por endocitosis mediante vesículas cubiertas de clatrina (clathrin-coated vesicles, CCVs) y los que se unen al receptor  $\alpha$ DG lo hacen vía Multivesicular bodies (MVBs) y los complejos ESCRT. Sin embargo, se describe que algunos arenavirus podrían utilizar como receptor alternativo para la entrada viral, a los receptores DC-SIGN y L-SIGN, incluido también el virus Junín (Martinez *et al.*, 2013)

Luego de la internalización del virión, la membrana del mismo se fusiona a la membrana del endosoma tardío al generarse una acidificación en el pH local. La fusión está mediada por la proteína G2, que sufre un cambio conformacional al variar el pH, y a partir de la fusión de las membranas del virión y del endosoma, la nucleocápside es liberada al citoplasma celular, donde comienza la síntesis de los ARN antígenómicos, los ARNm y las proteínas virales (Shao *et al.*, 2015).

#### **1.2.4. Proteínas virales**

##### ***El precursor de las glicoproteínas (GPC)***

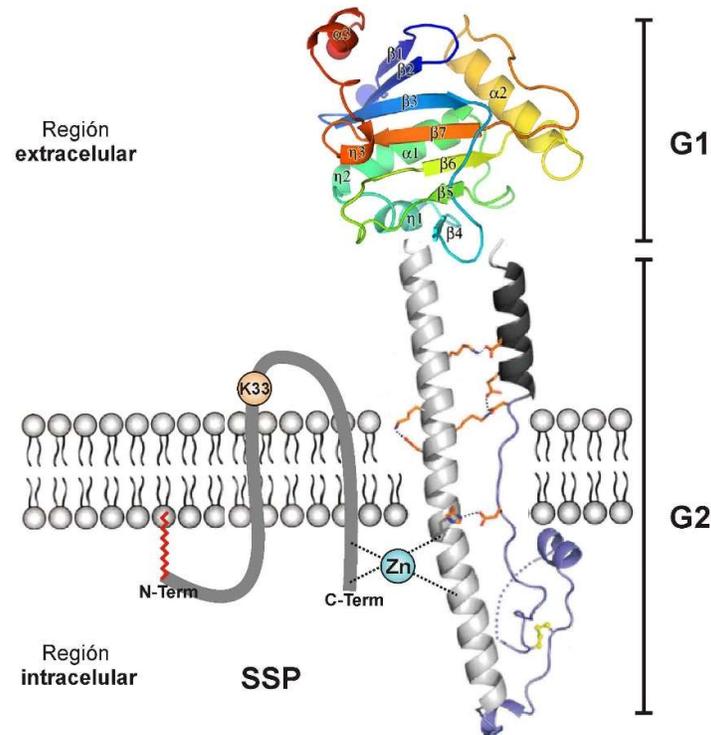
El precursor de las glicoproteínas se traduce como un único polipéptido que luego de sufrir la proteólisis en dos sitios específicos, da origen a tres estructuras: el péptido señal (SSP), la glicoproteína 1 (G1) y la glicoproteína 2 (G2).

El péptido señal participa en el direccionamiento del precursor completo hacia la membrana endoplasmática, donde sufre la proteólisis. En primer lugar, una peptidasa celular separa al SSP de las G1 y G2, las cuales continúan unidas. El SSP sufre la adición de un ácido mirístico en la glicina de la posición 2, y este se ancla a la membrana endosomal junto con las glicoproteínas (York *et al.*, 2004). Luego, entre el Golgi medio y el trans-Golgi, ocurre la segunda proteólisis, la cual separa a G1 de G2, como consecuencia de la actividad de la subtilasa celular SKI-1/S1P (Bayer *et al.*, 2003; Lenz *et al.*, 2001). Las glicoproteínas G1 y G2 conforman homo-trímeros, que se asocian entre sí de manera no covalente, y junto con el SSP forman el complejo GPC, capaz de unir al receptor celular durante la entrada del virus a la célula hospedadora. En la **figura 1.4** se observa un esquema de la estructura del complejo de las glicoproteínas basado en las estructuras cristalográficas de la G1 y la G2.

##### ***La proteína de la nucleocápside (N)***

La nucleoproteína N es la proteína más abundante dentro del virión y posee variadas funciones implicadas en el desarrollo de las actividades virales. En primer lugar, la proteína N es la encargada de la regulación de la síntesis del ARNm y ARN antígenómico. Se hipotetiza que a partir de la síntesis de N, y del aumento de su concentración celular, esta se asocia con el *hairpin loop* intergénico. Esta interacción relaja la estructura y permite que la ARN polimerasa dependiente de ARN viral no interrumpa la transcripción, dando lugar así a los ARN antígenómicos (Tortorici *et al.* 2001 a).

Por otro lado, a través de estudios de mutagénesis de la proteína N se ha demostrado que la misma es capaz de formar homo-multímeros, donde estarían involucrados los residuos 92 a 119. Y además se comprobó que esta asociación es independiente de la presencia de ARN (Levingston Macleod *et al.*, 2011). Sin embargo, la unión de estos multímeros al ARN genómico conforma las nucleocapsides virales que luego serán empaquetadas dentro del virión, como consecuencia de la interacción de N con la proteína de matriz Z (Ortiz-Riano *et al.*, 2011).



**Figura 1.4** G1 conforma la región extracelular, G2 posee una región externa, interna y transmembrana y por último, el SSP posee dos regiones transmembrana, una región extracelular y otra intercelular. G1 y G2 se observan como monómeros pero forman trímeros. (Eschli *et al.*, 2006)

Por otro lado, la proteína N posee una actividad exonucleasa en su extremo C terminal, y en su extremo N terminal una región de unión al CAP. En particular, la actividad exonucleasa 3'-5' de ARN doble cadena inhibe la activación de los receptores de reconocimiento de patrones patógenos (PRRs) MDA-5, RIG-I y TLRs, quienes activan la expresión de la vía de interferón (Hastie *et al.*, 2011, Rodrigo *et al.*, 2012).

Por último, la proteína N posee también actividad de inhibición de la apoptosis, lo cual genera un ambiente óptimo para la replicación viral. Mediante estudios bioinformáticos, se encontró en la secuencia de la nucleoproteína secuencias de reconocimiento para la proteólisis mediada por caspasas (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*). Los mismos se encontraban ubicados en la secuencia de manera que los pesos moleculares de los fragmentos de N observados coincidieran. Lo mencionado anteriormente, junto con la demostración del aumento de NP procesada y la disminución de la proteólisis de la Caspasa 3 durante la activación de la apoptosis, demostró la interferencia en la cascada de señalización de la apoptosis mediante un mecanismo de

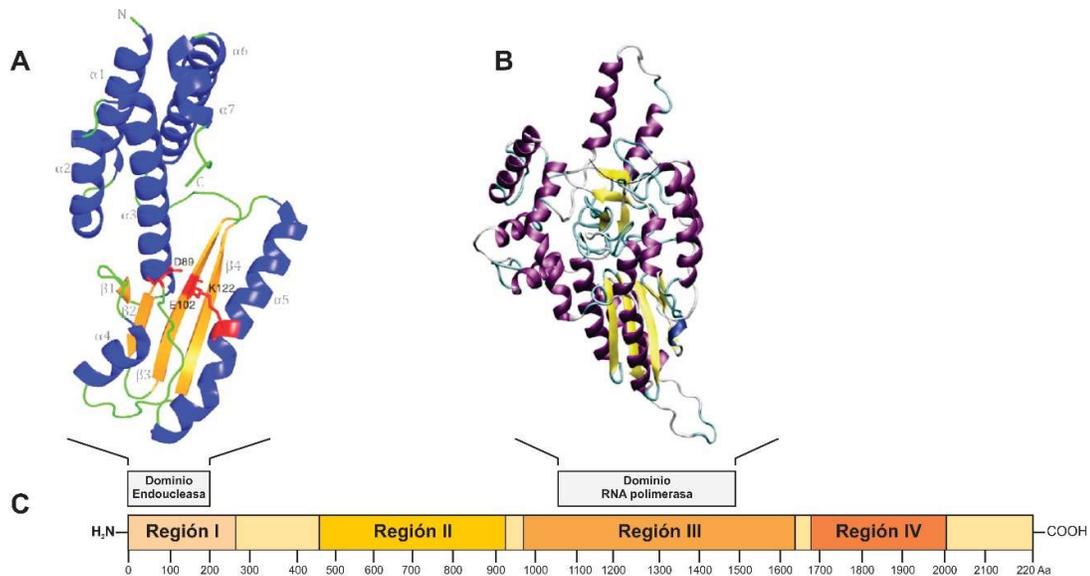
“señuelo”, donde NP compite con la Caspasa 3 por el procesamiento proteolítico (Wolff *et al.*, 2012).

### ***La ARN polimerasa dependiente de ARN (L)***

El marco de lectura abierto de mayor tamaño del genoma arenaviral codifica para la proteína L, con un peso molecular aproximado de 200 kDa, y se le atribuye la actividad de ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp). Es la encargada de la replicación y transcripción viral estando ambos procesos altamente regulados por las otras proteínas virales.

Es notable destacar que la proteína L de los arenavirus presenta motivos muy conservados entre las ARN polimerasa ARN dependiente de virus de ARN con cadena negativa (Sanchez & de la Torre, 2005). De hecho, la comparación de diferentes secuencias de RdRp, incluyendo a las proteínas L de los miembros de los arenavirus, evidencia la presencia de cuatro regiones conservadas (**Figura 1.5**). Entre ellas, el módulo polimerasa localizado en la porción central, dentro de la región III (Vieth *et al.*, 2004).

Un trabajo publicado a finales del año 2008 (Wilda *et al.*, 2008) analizó los sitios de unión entre la proteína Z y la polimerasa L en el virus Tacaribe (Nuevo Mundo). Esta interacción fue descrita como inhibitoria de la replicación, siendo Z responsable de la regulación del final de la transcripción/replicación viral. Tres años más tarde esta hipótesis fue confirmada por Kranzusch & Whelan (2011), quienes evidenciaron que la interacción de la proteína Z con L inhibe la iniciación de la síntesis de ARN, bloqueando a la polimerasa en un estado catalíticamente inactivo unida al promotor. Este mecanismo de regulación donde la forma inactiva de L permanece unida al ARN genómico permite garantizar el ensamblaje de la polimerasa unida a las nucleocápsides dentro del virión.



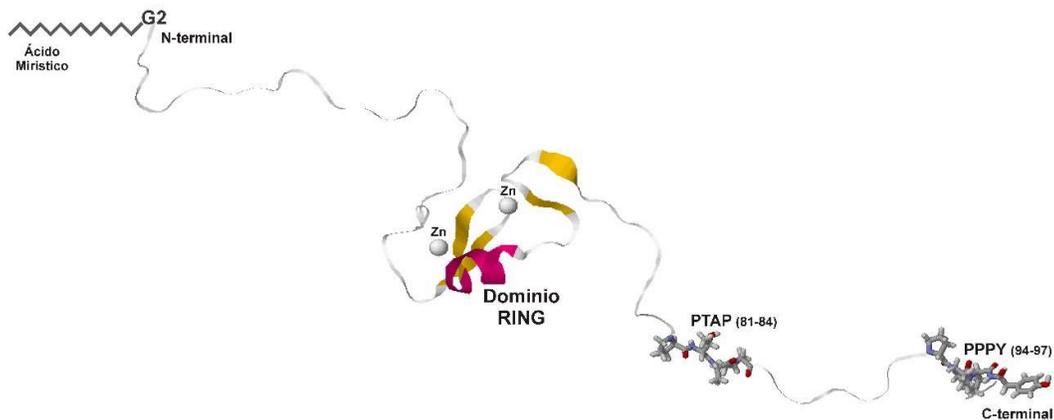
**Figura 1.5** A. Estructura cristalográfica de la porción N-terminal (endonucleasa) de la proteína L (Morin *et al.*, 2010) B. Modelado por homología a HCV del dominio polimerasa de L de JUNV (Goñi, tesis doctoral, 2010). C. Esquema de la secuencia aminoacídica de la proteína L completa, donde se señalan las regiones I, II, III y IV según Vieth *et al.* (2004).

### **La proteína de matriz (Z)**

La proteína de matriz Z es el marco de lectura de menor tamaño del genoma de los arenavirus. Posee de 90 a 103 aminoácidos (10-11 kDa) y su principal función es la de impulsar la brotación viral, aunque aún no se conocen todas sus funciones.

Su estructura se caracteriza por la presencia de tres dominios destacables: el N-terminal donde se encuentra un señal de miristoilación, la región central que conforma un dominio RING a partir de la coordinación de dos átomos de  $Zn^{+2}$ , y el C-terminal donde se destacan los dominios tardíos ricos en prolina (**Figura 1.6**)

La N-miristoilación es una modificación proteica irreversible, que ocurre cotraduccionalmente o post-traduccionalmente por la acción de la *N-miristoil transferase* (NMT). Esta enzima cataliza la adición covalente de un ácido graso saturado de 14 carbonos (ácido mirístico) a un residuo de glicina en la posición 1, a través de un enlace amida. Esta glicina libre en el extremo N-terminal es un requisito excluyente para el mecanismo de acción de la NMT, por lo que el residuo metionina inicial es removido por la acción de una metionin-aminopeptidasa celular (Farazi *et al.*, 2001).



**Figura 1.6 Estructura de la proteína Z del virus Lassa (cepa Joshia) obtenida por RMN.** En el extremo N-terminal se destaca la presencia de una glicina en la posición 2, la cual es sustrato de la miristoilación. En la región central se indica el motivo RING en coordinación con dos átomos de  $Zn^{+2}$ , mientras que en la región C-terminal se muestran los dos dominios tardíos presentes en la secuencia del virus de Lassa. Figura adaptada de [Volpon et al., 2010](#).

Además de la glicina en la posición 1 (Gly1), la NMT requiere que en la posición 2 no existan residuos cargados, aromáticos o una prolina. En las posiciones 3 y 4 se permite cualquier aminoácido, mientras que en la posición 5 es necesaria la presencia de Ser, Thr, Ala, Gly, Cys, o Asn, y en la posición 6 se permite cualquier residuo, excepto prolina ([Farazi et al., 2001](#)). Esta secuencia consenso se encuentra presente en la región N-terminal de la proteína Z de todos los arenavirus y la glicina en la posición 2 está totalmente conservada en todos los miembros de la familia. Esta región altamente conservada en los Arenavirus fue descrita por primera vez en el año 2004 por [Pérez y colaboradores](#), como involucrada en el proceso de brotación viral. Además, mediante la utilización de versiones mutantes de esta región, reportaron que no se producía la brotación viral cuando se reemplazaba la Glicina conservada por una Alanina. Esto les permitió definir a la miristoilación de Z como un requisito para el proceso de brotación viral. Dos años más tarde Strecker y colaboradores describieron la fuerte asociación de la proteína Z del virus Lassa con las membranas celulares, a pesar de que esta careciera de dominios transmembrana, totalmente dependiente de la miristoilación de la proteína Z ([Strecker et al., 2006](#)).

Por otro lado, la región central de la proteína Z está caracterizada por un motivo RING (*Really interesting new gene*) o “*Zinc finger*”. Este tipo de dominio fue definido por primera vez por Freemont en el año 1991 y se caracteriza por contener la siguiente secuencia canónica: Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X(9-39)-Cys-X(1-3)-His-X(2-3)-Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X(4-48)-Cys-X<sub>2</sub>-Cys (donde X es cualquier aminoácido) (Freemont *et al.*, 1991). Hasta el momento se conoce que estos motivos cumplen funciones de unión a ADN, unión a sustratos proteicos o lipídicos y participan en la actividad de ubiquitina ligasa (Deshaies & Joazeiro, 2009).

Existen varias superfamilias con motivos *Zinc Finger*, las cuales varían según la secuencia o la estructura del dominio. En los arenavirus este motivo comprende aproximadamente 50 aminoácidos, y Z es la proteína más pequeña conocida que contiene un motivo RING, comprometiendo aproximadamente el 50% de la secuencia aminoacídica total. Este dominio central participa en la inhibición de la síntesis del ARN viral, a través del bloqueo del sitio catalítico de L, y en el proceso de brotación viral (Wang *et al.*, 2012).

Por último, los dominios tardíos presentes en la porción C-Terminal de la proteína Z están implicados directamente en el proceso de brotación viral. Este evento necesario para la generación de viriones envueltos involucra la curvatura de la membrana plasmática de la célula hospedadora permitiendo así la brotación del virión naciente. En algunos casos los virus han resuelto este mecanismo mediante la imitación de los procesos celulares naturales para la formación de vesículas. El estudio de estos motivos tardíos comenzó dentro de la familia de retrovirus, donde se caracterizaron las siguientes secuencias: YPXL, PTAP y PPXY. Y fue mediante la mutagénesis de estos sitios que se observó un bloqueo en la brotación viral y la acumulación de los viriones nacientes en la membrana plasmática (Bieniasz, 2006).

Por otro lado, numerosos virus que contienen estos dominios tardíos son capaces de interactuar con proteínas de clase E (VPS4A, VPS4B, Nedd4 y TSG101), las cuales están implicadas en el camino de la formación de los cuerpos multivesiculares y la citoquinesis. Esta convergencia sugiere que la brotación de virus que contienen dominios tardíos, la formación de cuerpos multivesiculares y la separación final de las células en división, podrían ser procesos análogos donde se involucran factores celulares similares (McDonald & Martin-Serrano, 2009; Urata *et al.*, 2006).

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

dentro de una proteína. Esto fue estudiado principalmente en la proteína Gag del virus del Sarcoma de Rous y de VIH, donde otros dominios tardíos fueron capaces de remplazar el motivo PTAP presente naturalmente en estas proteínas, incluso en posiciones distintas (Parent *et al.*, 1995). Este funcionamiento autónomo sugiere un mecanismo de acción asociado al reclutamiento de otros factores virales o celulares responsables de la brotación viral, de manera independiente al contexto proteico que contiene el dominio L. Estos factores involucrados en el transporte multivesicular han sido ampliamente estudiados en levaduras, donde se ha descrito un subconjunto de factores designados de Clase E, los cuales participan en la formación de cuatro complejos proteicos, denominados complejos de clase endosomal requeridos para el transporte (ESCRT, por la denominación inglesa *endosomal sorting complexes required for transport*) -0, -I, -II y -III. Y son estos complejos los que actúan de forma secuencial y orquestada para estimular la formación de vesículas o, en el contexto de una infección viral, promover el proceso de brotación viral.

### ***Interacciones con proteínas celulares***

Además de la interacción entre las proteínas virales y Z, esta última es capaz de interactuar con otros factores de la célula hospedadora, produciendo efectos variados en el contexto de la infección viral.

Entre las primeras interacciones descritas, aparece la unión a la proteína **PML** (*Promyelocytoc Keukemia Protein*). En una situación celular normal, PML forma parte de complejos que se localizan en el núcleo celular y está implicada en la cascada de activación de IFN- $\alpha$  y  $\beta$ , los cuales inhiben la proliferación celular (Djavani *et al.*, 2001). Dicha distribución es afectada por infecciones virales, leucemia promielocítica aguda (APL) y en condiciones neurodegenerativas. En particular, durante una infección arenaviral PML y la proteína Z interaccionan entre sí y se genera la deslocalización nuclear de PML afectando así su funcionamiento celular (Borden *et al.*, 1998; Everett & Chelbi-Alix, 2007).

Otra de las proteínas celulares de interacción a Z más conocidas es el factor de traducción **eIF4E**. El mismo interactúa con el m<sup>7</sup>GTP de los ARNm e induce el inicio de la traducción y la exportación del ARNm fuera del núcleo (Hershey, 1994; Rhoads *et al.*, 1994; Shatkin, 1985; Sonenberg, 1994). Hay numerosas proteínas celulares de unión a eIF4E, las cuales están implicadas en su regulación, aunque la proteína viral Z también es capaz de interactuar con el factor eIF4E generando una disminución de la afinidad de eIF4E por el m<sup>7</sup>GTP, de aproximadamente 100 veces (Kentsis *et al.*, 2001). Esto

impacta directamente en la disminución de la traducción CAP-dependiente dentro de la célula infectada. Además, el factor eIF4E regula la expresión de la proteína IRF-7 (*Interferón regulatory factor 7*), la que a su vez regula la expresión de interferón en células dendríticas. Mediante el mismo mecanismo antes mencionado, es posible que Z por medio de la inhibición (en forma indirecta) de IRF-7 en células dendríticas infectadas con arnavirus, esté involucrada en la disminución de la respuesta por interferón, lo que permitiría al virus evadir la respuesta inmune innata (Urata & de la Torre, 2011).

Como ya se mencionó previamente, existen proteínas celulares capaces de reconocer patrones patógenos, entre las cuales se encuentra la proteína **RIG-I** (*retinoic acid-inducible gene 1*). Este receptor posee la capacidad de reconocer ARNs virales de simple cadena sin CAP, es decir que deben poseer el extremo 5' fosforilado, en el citoplasma celular. Al reconocerlo, RIG-I activa el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual induce la producción de interferones de tipo I, los cuales son necesarios para la defensa contra la infección viral (Fan *et al.*, 2010). En 2014 Xing y colaboradores observaron que la proteína Z de los Arnavirus infectivos que causan enfermedades en humanos (LASV, DANV, LCMV, LUJV, CHPV, MACV, GTOV, JUNV y SABV), poseen la capacidad de unirse y colocalizar con RIG-I, interrumpiendo la formación del complejo entre el RIG-I y los MAVS (*Mitochondrial antiviral signaling proteins*), impidiendo la activación de NF- $\kappa$ B y del factor de regulación de Interferón 3 (IRF-3), lo que resulta en una disminución de la inducción de IFN- $\beta$  (Xing *et al.*, 2014).

Por otro lado, las proteínas Z de los arnavirus del Nuevo Mundo poseen el dominio tardío P[T/S]AP en la porción C-Terminal de su secuencia. Las mismas son capaces de interactuar con el factor perteneciente al complejo ESCRT-I, **Tsg101**, lo que permite el reclutamiento de otros factores de los complejos ESCRT, mediando así el proceso de brotación viral, como ya se mencionó previamente.

Existen otras proteínas celulares que interactúan con Z, como las **proteínas ribosomales P** (P0, P1 y P2), aunque esta interacción no afecta su distribución (Campbell Dwyer *et al.*, 2000). Estas proteínas forman parte del complejo ribosomal mayor y son necesarias para la síntesis proteica. La interacción entre las proteínas P y Z podría ser la razón de la presencia de ribosomas y de P0 en la partícula viral (Leung & Rawls, 1977), aunque hasta la actualidad no se ha confirmado que esto realmente sea así.

Por último, la proteína rica en prolina (*Proline-rich Homeodomain Protein*, **PRH**), también conocida como proteína de *homeobox* expresada hematopoyéticamente (*Hematopoietically Expressed homeobox*, **HEX**), pertenece a la familia de factores de

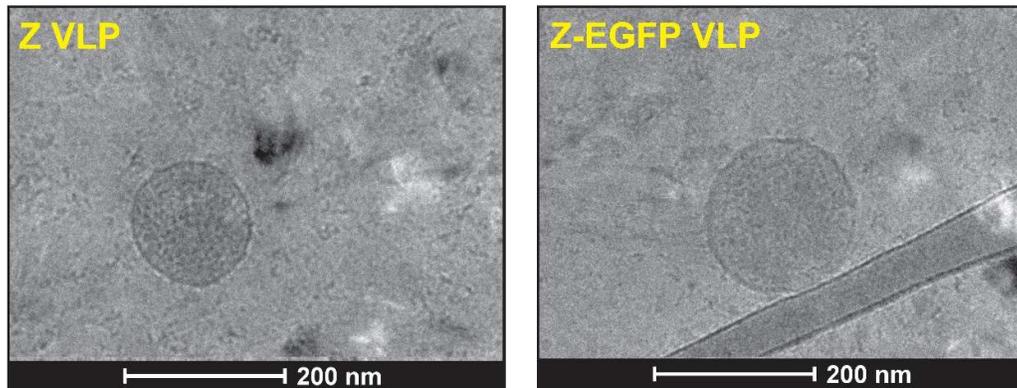
transcripción que regulan el desarrollo (Djavani *et al.*, 2005). Es uno de los primeros genes requeridos para el desarrollo del hígado, y también se expresa en tejidos adultos implicados principalmente en los procesos de regeneración vascular y hematopoyesis (Barton *et al.*, 1995). En un estudio del año 2005 Djavani y colaboradores propusieron la hipótesis de que las cepas virulentas de Arnavirus causan disfunción hepática mediante la inhibición de los procesos fisiológicos de reparación del tejido, como consecuencia de la disminución de la producción de PRH y de la dispersión de los cuerpos nucleares de PRH (Djavani *et al.*, 2005). En estudios de doble híbrido en levaduras y de coprecipitación han demostrado la capacidad de la proteína Z, en particular su dominio RING, de interactuar con PRH (Topcu *et al.*, 1999). Si bien la proteína Z en el contexto de infecciones virales con cepas virulentas y no virulentas es capaz de colocalizar con PRH, la translocación de los cuerpos PRH al citoplasma y la disminución de la expresión de PRH solo ocurre con las cepas virulentas, lo que en el contexto del individuo podría bloquear el proceso regenerativo. Es importante mencionar que el tejido hepático, el endotelio vascular y las células hematopoyéticas son los principales blancos para los virus de fiebres hemorrágicas, siendo el hígado el órgano de mayor tasa replicativa viral (Lukashevich *et al.*, 2004).

### 1.2.5. Z como plataforma de vehiculización de antígenos

Las proteínas virales de matriz de otros virus tienden a ser las que dirigen el proceso de brotación viral, sin embargo en el caso de los arnavirus se observó que la proteína Z en ausencia de otras proteínas virales es capaz de producir la brotación. Strecker y colaboradores (2003) realizaron un ensayo donde mediante la transfección de células eucariotas con la secuencia para la expresión de la proteína Z, eran capaces de recuperar a partir del sobrenadante de cultivo partículas similares a virus (*virus-like particles*, VLPs) conteniendo a Z en su interior. De este modo, lograron confirmar la responsabilidad de Z en la inducción de la brotación viral, y que la misma es contenida dentro de las VLPs.

Con el objetivo de utilizar esta característica como una herramienta biotecnológica, Borio y colaboradores realizaron una fusión entre la proteína Z del virus Junín y eGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), para luego analizar su capacidad de producir VLPs y de vehiculizar antígenos en su interior. Los resultados de este ensayo, evidenciaron la aptitud de Z para dirigir la brotación viral, estando fusionada a una secuencia heteróloga por su extremo C-terminal, conteniendo a la proteína de fusión en su interior (**figura 1.7**). Además, mediante un ensayo de inmunización con estas VLPs

quiméricas en ratones, se logró obtener una respuesta humoral contra eGFP (en ausencia de adjuvantes) mayor a la obtenida con el antígeno soluble en ausencia de adjuvantes (Borio *et al.*, 2012). Este trabajo fue el inicio de una nueva línea de investigación dentro del LIGBCM-AVEZ de la Universidad de Quilmes, donde el nuevo objetivo fue evaluar el sistema de vehiculización de antígenos, con secuencias heterólogas virales.



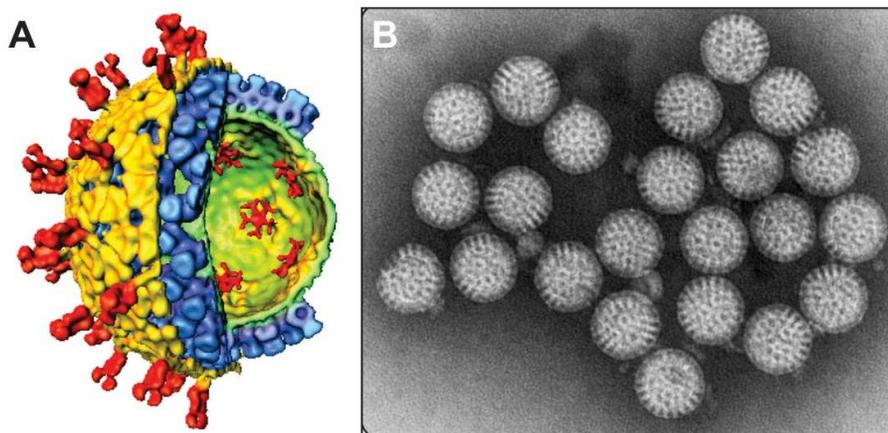
**Figura 1.7.** Crio-microscopías electrónicas de *Virus like particles* derivadas de la expresión de la proteína Z y de la fusión Z-EGFP, obtenidas en nuestro laboratorio.

En este sentido, colaboradores en la Universidad de Santa Catarina (Brasil) realizaron una fusión entre la proteína Z del virus Junín y un péptido de 23 aminoácidos derivado de la secuencia de la proteína E del virus del Dengue. Esta última es la proteína de envoltura del virus Dengue, la cual se conserva entre los miembros de la familia *Flaviviridae*, siendo responsable del ensamblado viral, la unión al receptor de la célula a hospedadora y la fusión a la membrana del hospedador. Aunque también es el principal objetivo de la mayoría de los anticuerpos neutralizantes que se obtienen durante la infección viral. La inmunización de ratones con ADN codificante para la VLP quimérica de Z y el péptido de la proteína E, evidenció una respuesta inmune humoral significativamente mayor a la obtenida con el péptido desnudo, junto con la presencia de anticuerpos neutralizantes de la entrada del virus a la célula hospedadora (Mareze *et al.*, 2015). Estos resultados, junto con otros obtenidos en nuestro laboratorio, son los que dirigen el presente seminario de investigación.

### 1.3. Rotavirus

El Rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae*, la cual posee 11 géneros. Los virus miembros de esta familia poseen de 11 segmentos de ARN doble cadena y encapsidan su genoma dentro de múltiples capas proteicas de simetría icosaédrica (T-13) con un diámetro aproximado de 100nm (**Figura 1.8 A y B**).

Dado que estos virus poseen genomas de ARN bicatenarios, la replicación se produce exclusivamente en el citoplasma. El virus posee dentro de la partícula infectiva varias proteínas que son responsables de la replicación y la conversión del genoma de ARN bicatenario a ARN monocatenario de sentido positivo o negativo. Luego de la entrada viral, la partícula se desnuda y el núcleo del virus se libera en el citoplasma, y es allí donde el genoma es transcrito produciendo un exceso de cadenas de sentido positivo, que se utilizan como molde para sintetizar ARNm de sentido negativo. Finalmente, a partir de estos últimos se sintetizan todas las proteínas virales, estructurales y no estructurales (Knipe & Howley-Fields, 2013).



**Figura 1.8 Estructura de los Rotavirus.** A. Esquema de las tres capas proteicas que recubren la partícula viral. En primer lugar, la capa externa conformada por VP7 (amarillo) y VP4 (rojo), luego la capa intermedia conformada por la proteína VP6, y la capa interna compuesta por VP2 (verde). B. Microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa de rotavirus (Knipe & Howley-Fields, 2013).

#### 1.3.1. Enfermedad

Las infecciones por rotavirus son mayoritariamente frecuentes en niños menores de 5 años. La infección se genera en el yeyuno dentro del intestino, siendo esta región la encargada de la absorción de nutrientes y líquidos. Por lo tanto, la destrucción de estas células causa la disminución de absorción de nutrientes y agua. Esta enfermedad es

grave en niños que no pueden recibir atención médica rápidamente (generalmente en países en desarrollo), provocando como consecuencia una mala nutrición, deshidratación o incluso la muerte (Pesavento *et al.*, 2006).

### 1.3.2. Estructura

Los rotavirus, como ya se mencionó previamente, poseen 11 segmentos de ARN doble cadena codificantes para 12 proteínas. Como se observa en la **figura 1.8 A**, la capa interna del virión está formada por la proteína VP2, la cual está unida por su lado interno a VP1 y VP3. La capa intermedia está compuesta por VP6, la cual se asocia en forma de trímeros. Y la capa externa por VP7 y VP4, la cual es responsable de las espículas que sobresalen de la superficie de la partícula (González & Affranchino, 1995).

### 1.3.3. Proteínas virales

En la siguiente tabla (**tabla 1.1**) se enumeran las 12 proteínas codificadas en el genoma de los Rotavirus, junto con una breve descripción de su función.

<b>Proteínas estructurales</b>	<b>Peso (kDa)</b>	<b>Función</b>
VP1	125	RNA polimerasa dependiente de RNA. Une al ARNsc e Interactúa VP3.
VP2	102,4	Unión al ARN e interacción con VP1.
VP3	98,1	Interactúa con VP1, unión con ARNsc y posee la propiedad de transferasa de guanosina y metilos.
VP4	86,8	Participa durante la entrada viral, conforma los trímeros de la capa externa y contiene la región de encargada de la fusión de membranas
VP6	45	Trímero hidrofóbico, posee grupo y subgrupo de antígenos. Participa durante la transcripción.
VP7	34	Glicoproteína que integra el trímero dependiente de Calcio en la superficie viral.
<b>Proteínas no estructurales</b>	<b>Peso (kDa)</b>	<b>Función</b>
NSP1	58,7	Unión a ARN y antagonista de la respuesta de interferón.
NSP2	36,7	Importante para la replicación genómica y el empaquetamiento, función NTPasa se une al ARN e interactúa con VP1 y NSP5
NSP3	34,6	Unión al extremo 3' de los ARNm virales, interactúa con eIF4G e inhibe la traducción celular.

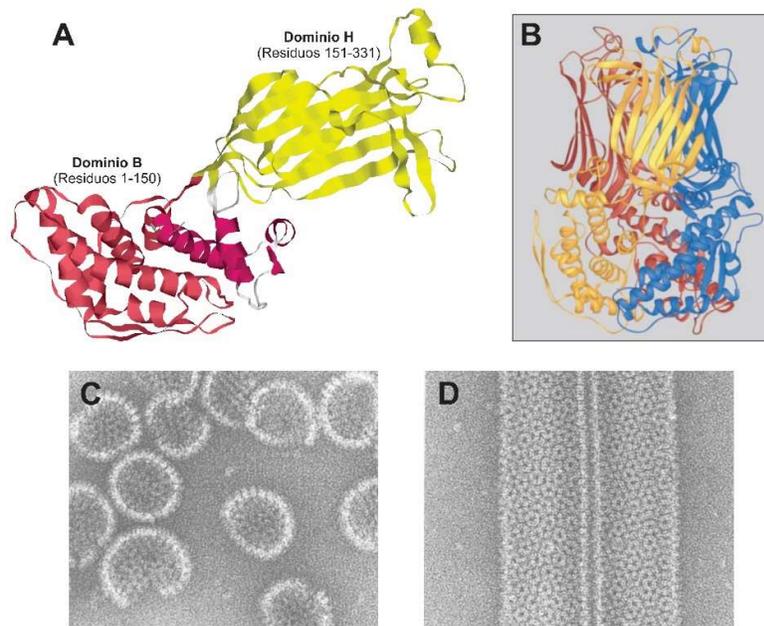
<i>NSP4</i>	20,3	Glicoproteína transmembrana del retículo endoplasmático, participa en la morfogénesis viral y en la replicación del ARN viral. Además es una enterotoxina viral de secreción.
<i>NSP5</i>	21,7	Fosfoproteína, Interactúa con NSP2, VP2 y NSP6, se une al ARN y es una protein-quinasa.
<i>NSP6</i>	12	Interactúa con NSP5 y une al ARN viral

**Tabla 1.1: Descripción de las proteínas estructurales y no estructurales,** detallando su peso molecular y una breve descripción de su función (Tabla adaptada de (Knipe & Howley-Fields, 2013).

#### 1.3.4. Proteína VP6

La proteína VP6 es la más abundante en masa con respecto al resto de los componentes virales y es la que forma la cápside intermedia del virus, la cual mantiene la misma conformación icosaédrica con 780 moléculas y 260 trímeros. Ésta proteína posee un rol fundamental durante el ciclo viral, dado que funciona como adaptador entre la capa interna y la capa externa. Esta dos últimas cumplen diferentes funciones, por un lado la capa interna es responsable del empaquetamiento del RNA, mientras que la externa está implicada en la entrada del virus a la célula blanco (Mathieu *et al.*, 2001).

La proteína VP6 posee 2 dominios principales que a su vez coordinan un átomo de Zinc en el centro de la molécula (**Figura 1.9 A**), el dominio distal o H el cual está conformado por una estructura de  $\beta$ -sandwich antiparalelos que mantienen el contacto con VP7 (la proteína de la capa externa). Y el dominio inferior o B, que consiste de ocho  $\alpha$ -hélices, el cual interactúa con VP2 (la proteína de la capa interna) (Mathieu *et al.*, 2001). La proteína VP6 también interactúa entre sí de manera lateral, a través de residuos con carga, para formar los trímeros que luego compondrán la cápside intermedia (**Figura 1.9 B**). Es importante destacar que la proteína VP6, al igual que se mencionó para la proteína Z del virus Junín, es capaz de formar *virus-like particles* de Rotavirus, a partir de su sola expresión, siendo estas VLPs proteica de una única capa (Zhao, 2011). Por otro lado, esta función de oligomerización de VP6 también ha sido estudiada con el objetivo de obtener nanoestructuras tubulares de forma semi-esférica (Lepault *et al.*, 2001). La capacidad de formar nanotubos (**Figura 1.9 C**) o VLPs esféricas (**Figura 1.9 D**) depende del pH y la fuerza iónica del entorno al momento de la oligomerización. La flexibilidad descrita para la estructura de VP6, y su potencial antigénico, hacen de esta proteína un blanco de interés biotecnológico.



**Figura 1.9 Estructura de la proteína VP6 de Rotavirus.** **A.** Esquema de la estructura cristalográfica de VP6, señalando sus dos dominios principales, dominio B (rosa) y dominio H (Amarillo). **B.** Esquema del trímero conformado por VP6 (Mathieu *et al.*, 2001). **C.** Microscopia electrónica de las VLPs derivadas de la oligomerización de VP6. **D.** Y de las estructuras tubulares de VP6 de 75 nm de diámetro (Lepault *et al.*, 2001).

### 1.3.5. VP6 como antígeno

Actualmente se utilizan vacunas para prevenir la infección por rotavirus, con virus atenuados. Estas al contener virus vivos atenuados, implican un posible riesgo de reversión, siendo la opción menos deseada. Es por este motivo, que hasta la actualidad continua la búsqueda de nuevas vacunas de mayor bioseguridad, como lo son las vacunas a subunidad. Un ejemplo del riesgo de las vacunas a virus vivo atenuado fue el producto comercial Rotashield® (Wyeth) fue la causante de intususcepciones en niños (invaginación del intestino con otro segmento del intestino (Ward & Mcneal, 2010) . Debido a éste efecto adverso se realizaron y actualmente se comercializan, dos nuevas vacunas denominadas RotaTeq® (Merck) y Rotarix® (Glaxo Smith Kline), las cuales están compuestas por virus atenuados, con las que hasta el momento no se notificaron efectos adversos.

Con el objetivo de evaluar nuevas estrategias vacunales para los rotavirus, la inmunogenicidad de sus componentes ha sido ampliamente estudiada. Un ejemplo de esto fue el trabajo de Richard L. Ward & Monica M. McNeal (2010), quienes realizaron diferentes experimentos, en los cuales utilizaron TLPs (partículas virales de triple capa) y DLPs (partículas con doble capa, en particular las dos capas internas). Ellos observaron que no había diferencia en la respuesta inmune al inocular TLPs o DLPs. El derramamiento de rotavirus en las heces con ambas VLPs era cercano a cero.

Al tener a VP6 en la capa intermedia y formar parte de las TLPs y DLPs, analizaron a VP6 como único antígeno y para estudiar el sistema en mayor detalle, inmunizaron nuevamente con cada uno de los componentes del virus, y evidenciaron que VP6 era el componente más inmunogénico, al menos en el sistema murino utilizado, lo que la convirtió en objeto de estudio como blanco vacunal.

#### **1.4. Vacunas a VLPs**

Como se mencionó previamente, las vacunas de mayor bioseguridad son aquellas basadas en subunidades. Sin embargo, actualmente la mayoría de las vacunas licenciadas son de virus atenuados o inactivados. Esta tendencia está comenzando a cambiar a partir de los estudios de numerosos grupos de investigación, en estrategias basadas a subunidad en ausencia de genoma viral. Ejemplo de estos esfuerzos son las vacunas contra el virus de la hepatitis B (Engerix®, Glaxo Smith Kline y Recombivax HB®, Merck) o el virus del papiloma humano Gardasil®, Merck y Cervarix®, GlaxoSmithKline), entre otras (Roldão *et al.*, 2010).

El desafío de este tipo de vacunas de nueva generación se basa en que la utilización de una proteína soluble como antígeno genera una respuesta inmune más débil que la observada durante la infección con el patógeno completo. Por este motivo, las nuevas estrategias estudian la posibilidad de utilizar partículas tipo virales (VLPs), las cuales simulan la partícula viral, y eventualmente su entrada a la célula hospedadora, aunque no poseen genoma viral en su interior, por lo que no son infectivas. Esto último hace que las estrategias basadas en VLPs sean más bioseguras tanto en la administración como en su producción.

Las VLPs pueden ser clasificadas en distintas categorías, una de ellas puede ser la división entre VLPs envueltas y no envueltas. Las no envueltas, son estructuras formadas por las proteínas virales estructurales, las cuales al ser expresadas se autoensamblan formando la estructura de la cápside viral. En contraste, las partículas no envueltas brotan utilizando generalmente como superficie exterior la membrana

celular del hospedador (Naskalska & Pyrc, 2015). Por otro lado, las VLPs poseen una superficie con epítopes repetitivos, lo que permite aumentar su inmunogenicidad. Las partículas interactúan con el sistema inmune de manera similar que los patógenos completos, por lo tanto esto despierta no solo una respuesta humoral, sino también una respuesta celular. La activación elevada de la respuesta de células B es generalmente dependiente de que las VLPs sean simétricas y con alto número de epítopes (Buonaguro *et al.*, 2011). Además, las VLPs como antígenos exógenos, son eficientemente capturadas por las células presentadoras de antígenos por excelencia (*dendritic cells*, DC) quienes procesan y presentan los antígenos en las moléculas de MHC clase II, las que estimulan las células T CD4+. Por otro lado, las VLPs que simulan ser virus, son procesadas en el citoplasma de las DC como antígenos endógenos y presentados en moléculas de MHC clase I, las cuales estimulan células T CD8+ citotóxicas (Grgacic & Anderson, 2006, Groothuis & Neefjes, 2005). Éste mecanismo de presentación cruzada generalmente produce respuestas inmunológicas fuertes, incluso en ausencia de adyuvantes (Keller *et al.*, 2010, Manolova *et al.*, 2008, Naskalska & Pyrc, 2015).

### 1.5. Vacunas a ADN

En la década de 1980 y principios de los 90 Will *et al.* (1982), Dubensky *et al.* (1984), y Wolff *et al.*, (1990) demostraron que a partir de la administración de ADN recombinante desnudo en un animal, se generaba la expresión *in situ* de la proteína codificada por el gen contenido en el ADN. Años más tarde, Tang *et al.* (1992), Ulmer *et al.* (1993) y Fynan *et al.* (1993) demostraron que la expresión de proteínas exógenas mediante ADN recombinante era capaz de activar una respuesta humoral contra el antígeno en cuestión. Esto lo evidenciaron a partir la inmunización de un animal con un plásmido recombinante, a través de una inyección intramuscular o subcutánea, donde el plásmido era capaz de ingresar a las células del hospedador, generando la expresión del antígeno codificado en su secuencia, asegurando su correcto plegado (teniendo en cuenta la utilización de un promotor compatible con el individuo utilizado). En consecuencia, el sistema inmune reconoce la proteína heteróloga como extraña y activa así la respuesta inmune. Sumado a esto, el plásmido utilizado como vector de la secuencia antigénica, puede ser reconocido también como foráneo y generar así una respuesta inmune contra el mismo, logrando una activación de la respuesta aún mayor.

Por otro lado, al utilizar ADN como inmunógeno, se obtienen diversos beneficios entre los cuales existe la posibilidad de obtener una respuesta inmune humoral y/o celular. También posee como ventaja técnica la fácil manipulación del vector, en cuanto a los

costos, el escalado de su producción y la bioseguridad. El transporte de este tipo de vacunas y el almacenaje es más sencillo que en el caso de las vacunas proteicas o basadas en virus, dado que la estabilidad de los plásmidos circulares es mayor.

A pesar de que actualmente no existen vacunas comerciales licenciadas para uso en humanos, existen numerosos ejemplos de desarrollos en fases clínicas (Malaria, HIV, HPV, Influenza, Kutzler *et al.*, 2008, Ferraro *et al.*, 2011). Esto es consecuencia, de que aún no se ha comprobado la seguridad de las mismas en algunos aspectos como el riesgo de integración del plásmido en el genoma del individuo o la inducción de una respuesta autoinmune anti-ADN. Por otro lado, uno de los desafíos que aún resta superar es la necesidad de realizar varias inmunizaciones con concentraciones elevadas de ADN para obtener una respuesta efectiva. Aunque, como se estudiará en este trabajo, las vacunas de ADN son útiles como inmunización primaria y no como refuerzo. Por este motivo, para una respuesta inmune efectiva se debe aplicar, luego de una inmunización primaria con ADN, un refuerzo de VLPs, proteínas recombinantes o vectores virales, lo que comúnmente se denominan protocolos mixtos (Grunwald & Ulbert, 2015; Saade, 2012; Shedlock & Weiner, 2000).

# **OBJETIVO E HIPÓTESIS**



## OBJETIVO

**Evaluar la plataforma de vehiculización de antígenos basada en VLPs de la proteína Z del virus Junín, utilizando dominios de la proteína VP6 de Rotavirus murino.**

### **Objetivos específicos:**

- Estudiar la eficiencia de una vacuna a ADN para estimular la respuesta inmune contra rotavirus.
- Determinar dominios antigénicos de la proteína VP6, funcionales en el sistema de vehiculización basado en VLPs del virus Junín
- Expresar los antígenos seleccionados en *E. coli*, y optimizar las etapas de purificación para obtener la proteína de interés apta para ensayos en animales.
- Optimizar un método de purificación de ácidos nucleicos para obtener mayor rendimiento que las metodologías convencionales y calidad suficiente para ensayos en animales.
- Evaluar el sistema desarrollado en un modelo animal, en particular el desarrollo de la respuesta humoral y protección contra el virus.

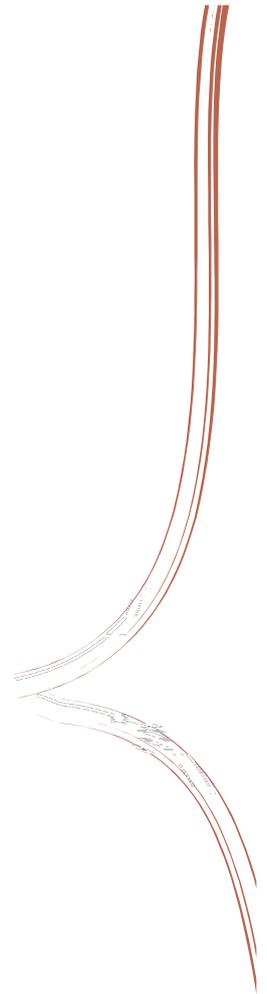
## HIPÓTESIS

**La región C-terminal de la proteína VP6 de Rotavirus, integrada en la plataforma de vehiculización de antígenos basada en la proteína Z, es capaz de estimular la respuesta inmune de ratón, utilizando una vacuna a ADN.**



# CAPÍTULO 2

## MATERIALES Y MÉTODOS





## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Análisis bioinformático

Con el objetivo de caracterizar la secuencia aminoacídica de CT-VP6, se utilizaron diferentes servidores. En primer lugar se utilizó el *Protein blast* del servidor NCBI, utilizando la base de datos no redundante y la función *protein-protein blast* (Gish. & States, 1993). Para la obtención del perfil de hidrofobicidad, se utilizó el servidor *ProtScale*, mediante la matriz de Kyte & Doolittle con una ventana de 9 (Gasteiger et al., 2005).

Por otro lado, se realizó una predicción *Ab Initio* de la estructura terciaria mediante el servidor Quark (Xu & Zhang, 2012), y utilizando la misma junto con la estructura de VP6 obtenida del *Protein Data Bank* (PDB), se realizó una superposición de estructuras con el programa *UCSF Chimera* (Pettersen et al., 2004).

La optimización del uso de codones de CT-VP6 se realizó utilizando el servidor OptimumGene™ - Codon Optimization (GenScript).

Los parámetros bioquímicos de las proteínas utilizadas en este trabajo se obtuvieron utilizando el servidor *ProtParam* del paquete de herramientas de Proteómica ExPASy (Gasteiger et al., 2003).

### 2.2. Técnicas de biología molecular

#### 2.2.1 Electroforesis de ácidos nucleicos

Para el análisis de ácidos nucleicos en diferentes experimentos, se realizaron electroforesis en geles de agarosa, con *buffer* TAE 1x (Tris base 0,04 M, Ácido Acético Glacial 1,14 ml/l solución; EDTA pH 8, 1mM). Teniendo en cuenta el tamaño de los fragmentos de ADN a separar, se seleccionó el porcentaje deseado para confeccionar el gel de agarosa y los patrones de peso molecular *Ladder* 100pb, *Ladder* 50pb y *Ladder* 400pb (Productos Bio-lógicos) óptimos para cada condición. El método de tinción de ácidos nucleicos utilizado fue el de bromuro de etidio (Sigma, stock 20000 X, 10 mg/ml) y revelado por exposición a luz UV.

#### 2.2.2. Electroforesis de proteínas

Para el análisis de proteínas se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida 10, 12, 16 y 18% utilizando el sistema de *buffer* Tris-glicina en el equipo vertical *Miniprotean* III de BIO-RAD. Las muestras se sembraron utilizando el *buffer* de siembra 4X (azul de bromofenol 0,4 %, glicerol 40 %, SDS 8 %, DTT 400 mM, Tris pH 6,8 200 mM), realizando una incubación previa en presencia del *buffer* de 10 min a 90 °C. La corrida se realizó a 35mA por gel durante 30 min y la tinción de los geles se

realizó con *Coomasie brilliant blue* R250 (Sigma). Todas las soluciones y reactivos fueron preparadas según los protocolos descriptos por Sambrook *et al.*, 1989. Los patrones de peso molecular utilizados fueron PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, (Thermo) y PageRuler™ Prestained Protein Ladder, (Thermo).

### 2.2.3. Extracciones plasmídicas

Las mini preparaciones se realizaron utilizando la técnica estándar de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Sin embargo, las preparaciones plasmídicas utilizadas para la transfección de células eucariotas se realizaron utilizando el método de adsorción a matriz de sílica (Kit de extracción de plásmido, Productos Bio-lógicos). La calidad y rendimiento de las mismas fueron verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa y visualizadas por tinción con bromuro de etidio. En los casos de recuperación de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el método de adsorción a matriz de sílica (*Gel extraction*, Productos Bio-lógicos), y para la utilización de productos de PCR purificados durante las etapas de clonado, se utilizó el kit de *Clean-Up* de Productos Bio-lógicos.

### 2.2.4. Extracciones plasmídicas a gran escala

Se evaluaron dos métodos de obtención de plásmidos a gran escala de calidad ultrapuros. En primer lugar se analizó el protocolo por lisis alcalina, seguido de un paso de precipitación con PEG 8000. El mismo consiste en la incubación de cultivos de bacterias conteniendo el plásmido de interés en 50 ml de medio TB en erlenmeyers de 250ml, durante 16 hs a 37°C.

Luego de la centrifugación del cultivo a 5000 rpm (Beckman Coulter, Avanti J26-XP - Rotor JA-14) durante 10 minutos a 4°C, el *pellet* obtenido es resuspendido en 10 ml de solución isotónica de lavado (Solución I de *Miniprep*, Sambrook *et al.* 1989). Luego se agregaron 10 ml de solución de ruptura celular (solución II de *Miniprep*) y se mezcló por inversión hasta la completa clarificación de la solución. A continuación se agregaron 10 ml de solución de neutralización (Solución III de *Miniprep*), y nuevamente se mezcló por inversión. El resuspendido se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante obtenido. Al mismo se le agregaron 0,5 volúmenes de cloroformo, se agitó enérgicamente, y a continuación se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa, a la cual se le agregaron 0,8 volúmenes de isopropanol. Luego de incubar la mezcla 20 minutos a -20 °C, se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante, y el *pellet* obtenido se lavó con 50 ml de etanol 70%. Por último, el

precipitado se resuspendió en 200  $\mu$ l de agua desionizada estéril e incubado 5 minutos a 50 °C. Opcionalmente, se pueden agregar 10 $\mu$ l de RNAsa A (50 mg/ml) e incubar a 37 °C durante 30 minutos, para eliminar el ARN celular.

Una vez obtenido el ADN por lisis alcalina, se realizó una precipitación con Polietilenglicol (PEG) 8000 (Sambrook *et al.*, 1989). El protocolo consiste en la adición de PEG 8000 a una concentración final de 6,5% junto con NaCl 0,8M final al ADN purificado. Esta mezcla se incubó 20 minutos a -20 °C y luego se centrifugó a 10000 xg durante 20 minutos a 4°C. El *pellet* obtenido es lavado con etanol 70%, y por último el ADN purificado es resuspendido en el volumen deseado de agua desionizada estéril.

En segundo lugar, se utilizó el método de purificación plasmídica por cromatografía de intercambio iónico débil, DEAE. Para la realización de la misma, el cultivo es tratado de igual manera que para el protocolo de lisis alcalina (con la excepción de que la solución I utilizada ésta compuesta por Tris-Cl 50 mM y EDTA 10 mM, pH 8.) Luego de la adición de la solución III de *Miniprep* el resuspendido se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Luego, mediante la utilización de un conductímetro, la conductividad del mismo se ajustó a 35-40 mS/cm con agua mQ, de manera que la interacción con la resina de DEAE sea la óptima. Esta solución, luego de ser filtrada por un filtro de jeringa de 0,2  $\mu$ m, es aplicada a la columna de DEAE-1ml (*Bia-Separation*), previamente equilibrada con la solución de equilibrio (50 mM Tris y 10 mM EDTA, pH 7,2), a un flujo de 0,5 ml/min para maximizar la interacción con la matriz. A continuación la columna es lavada con la solución de lavado (50 mM Tris; 10 mM EDTA y 0,6 M NaCl; pH 7,2) y finalmente el ADN es recuperado mediante la solución de elución (50 mM Tris; 10 mM EDTA y 1 M NaCl; pH 7,2). Como procedimiento general, se equilibra la columna con 20 volúmenes de columna (VC), luego se introduce la muestra, y se equilibra nuevamente, con 20 VC de la solución de equilibrio. Se utiliza la solución de lavado hasta que la línea de base vuelve a 0 y por último, se eluye el ADN en 5 VC. La fracción eluída es luego precipitada con isopropanol (0,8 volúmenes) y sales (AcNa 0,3M), y resuspendida en el volumen deseado de agua desionizada estéril.

### 2.2.5. Digestiones Enzimáticas

En todas las digestiones con enzimas de restricción (*New England Biolabs*, *Thermo* y *Promega*) se utilizaron 8 U finales para incubaciones de 2 h, y 2 U finales para incubaciones durante toda la noche, utilizando los buffers óptimos para cada una de ellas. Las enzimas se inactivaron térmicamente en las condiciones recomendadas por

el fabricante. En general, todas las digestiones fueron realizadas en un volumen final de 10/20 µl, e incubadas a 37 °C (o a la temperatura óptima para la enzima utilizada).

### 2.2.6. Ligaciones

Las ligaciones de los diferentes fragmentos a los vectores correspondientes fueron realizadas utilizando 1 U de ADN ligasa del bacteriófago T4 (Thermo), e incubando durante 2 h a 22 °C, o durante toda la noche a 4 °C.

### 2.2.7. Electroporación y plaqueo

Se utilizó el equipo *Gene Pulser II* (BioRad), electroporando en cada caso 5 ng del producto ligado. En todos las ocasiones se emplearon alícuotas de 75 µl de bacterias electro competentes adecuadas según el plásmido utilizado y siguiendo protocolos estándar. Las bacterias transformadas fueron incubadas a 37 °C durante 1 h en medio LB líquido (5 g extracto de levadura; 10 g de peptona, 10 g de NaCl; llevar a 1 litro) sin antibiótico. Posteriormente se sembraron en placas de Petri con LB sólido (agregado de 15 g de agar por litro de LB líquido) y el antibiótico correspondiente.

### 2.2.8. Síntesis y amplificación de ADN mediante PCR

Las amplificaciones de ADN utilizados en los pasos de clonado y confirmación de clones positivos se realizaron en un volumen total de 20 µl, utilizando las siguientes concentraciones finales de los reactivos: 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2mM dNTPs; 1 µM de cada primer y 1 U por reacción de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq ADN polimerasa, Productos Bio-Lógicos) o Pfu polimerasa (Productos Bio-Lógicos) En los distintos casos, se optimizaron las condiciones de reacción, adicionando DMSO o modificando la temperatura de hibridación de los *primers*, así como los tiempos de los distintos pasos del ciclado, utilizando como regla general entre 19 y 35 ciclos por reacción.

### 2.2.9. Oligonucleótidos y *Primers*

Los *primers* utilizados para las estrategias de clonado y confirmación de los mismos se encuentran listados en la **tabla 2.1**.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Descripción
<b>Directo 1</b>	CGCCGGGTATGAACTGGACCGACCTGATCA CCAACACTCTCCGTCTCGTGAAGACAACCT GC	Forma parte de la secuencia de CT-VP6 con los codones optimizados para <i>E. coli</i> y posee una región de solapamiento con <b>Reverso 1</b> .
<b>Directo 2</b>	TACCTCTGTTTCGTCAGGAATACGTTATCCCG	Forma parte de la secuencia de

	GTTGGTCCGGTTTTCCCGCCGGGTATGAAC TGGACCGAC	CT-VP6 con los codones optimizados para <i>E. coli</i> y posee un solapamiento con <b>Directo 1</b> .
<b>Directo 3</b>	CCATGGGATCCGAATCTGTTCTGGCGGACG CGTCTGAAACCATGCTGGCGAACGTTACCTC TGTTTCGTCAGGAATAC	Forma parte de la secuencia de CT-VP6 con los codones optimizados para <i>E. coli</i> y posee una región de solapamiento con <b>Directo 2</b> .
<b>Reverso 1</b>	CCCAAGCTTAACCAGCATAGAACGGATAGAC GCAACGGTGAAAACACGCTGCAGGTTGTCT TCACGAGACG	Forma parte de la secuencia de CT-VP6 con los codones optimizados para <i>E. coli</i> y posee una región de solapamiento con <b>Directo 1</b> .
<b>CT-VP6-Fw</b>	<u>CCATGGGATCCGAATCTGTTCTGGCGGACG</u>	Extremo N-Terminal de CT-VP6 con codones optimizados. Con sitios NcoI y BamHI
<b>CT-VP6-Rev</b>	<u>CCCAAGCTTAACCAGCATAGAACGGATAGAC</u>	Extremo C-Terminal CT-VP6 con codones optimizados. Agrega el sitio HindIII
<b>Fw-Intron A</b>	TCTGAGCAGTACTCGTTGCTGCC	Hibrida en la región del Intron A, del vector eucariota pcDNA3 Intron A.
<b>CT-VP6-Rev-WT</b>	ATAGTTTAG <u>CGGCGC</u> CTACTTTACCAG CATGCTTCTAAT	Extremo C-Terminal CT-VP6 con codones eucariotas. Agrega el sitio NotI
<b>pGEX Fw</b>	AACGTATTGAAGCTATCCC	Extremo 3' del ORF GST
<b>pGEX Rv</b>	GAGCTGCATGTGTCAGAG	Extremo 3' del MCS de pGEX
<b>T7</b>	AATACGACTCACTATAG	Hibrida en la región del promotor T7
<b>T7 Prom</b>	TAATACGACTCACTATAGGG	Hibrida en la región del promotor T7
<b>Fw CMV Prom</b>	ACA ACTCCGCCCCATTGACG	Hibrida en la región del extremo 3' del promotor CMV

**Tabla 2.1.** Listado de los *primers* utilizados en este trabajo.

### 2.2.10. Selección de clones positivos: *Colony PCR*

Utilizando palillos estériles se picaron las colonias obtenidas luego de la transformación. Los clones seleccionados se analizaron en grupos de 5, en microtubos estériles de 0,5 ml, conteniendo 10µl de H<sub>2</sub>O destilada. Las muestras fueron hervidas durante 10 minutos y luego centrifugadas a 16000 xg durante 5 minutos. La reacción de amplificación se realizó utilizando 1µl del sobrenadante como molde en 10µl de volumen final de mezcla de reacción, empleando pares de *primers* que permitan verificar el sitio de incorporación del inserto. Los grupos que presentaron el fragmento de interés fueron analizados individualmente en una segunda ronda de amplificación, permitiendo así seleccionar las colonias positivas individualmente. Estas fueron luego analizadas por mapa de restricción enzimática, utilizando enzimas que generan de productos diferenciales entre los clones positivos y negativos.

### **2.2.11. Secuenciación**

Para las reacciones de secuenciación se utilizó el servicio de secuenciación automatizada de Macrogen (Korea) utilizando *primers* universales del proveedor o *primers* específicos diseñados en nuestro laboratorio. Se utilizaron muestras de ADN ultra puro mediante precipitación con PEG 8000 o mediante la utilización de kits de extracción de plásmido (Productos Bio-lógicos), a una concentración final de 100 ng/μl.

### **2.2.12. Precipitación de ácidos nucleicos**

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

### **2.2.13. Cuantificación de ácidos nucleicos**

Se utilizó el kit comercial *Quant-it ADN Assay* (Invitrogen) junto con fluorómetro Qubit (Invitrogen) según las especificaciones del fabricante, utilizando un volumen de muestra variable entre 2-10 μl. También se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo).

## **2.3. Expresión y purificación de proteínas en *E. Coli***

### **2.3.1. Expresión de CT-VP6-His**

Para la proteína de fusión CT-VP6-His se utilizaron las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) (*New England Biolabs Inc.*), y BL21 pLys (*New England Biolabs Inc.*). Las células transformadas se cultivaron en 250 ml de medio LB conteniendo kanamicina en concentración 1X, a 37 °C y 220 rpm. Cuando la absorbancia de cultivo a 600 nm alcanzó un valor de 0,5, las células fueron inducidas con 1 mM de concentración final de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) durante diferentes tiempos, siendo 5 horas a 37 ° C la máxima expresión. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 4000 xg durante 15 min, y se resuspendieron en *buffers* específicos para su posterior lisis. Luego de la ruptura las fracciones solubles e insolubles se separaron mediante centrifugación a 20.000 xg durante 30 min y analizaron por SDS-PAGE (el *buffer* de siembra 4X contiene 200 mM Tris-HCl, 8% de SDS, 40% de glicerol, 0,4% azul de bromofenol y 400 mM de DTT, pH 6,8). Los análisis mediante

SDS-PAGE se realizaron de acuerdo a Laemmli (1970), utilizando porcentajes de acrilamida entre 12-15%, y posteriormente teñidos con azul de Coomassie R250. El *buffer* de corrida de Tris-Glicina se preparó según (Maniatis *et al.*, 1982).

### 3.1.1. Lisis celular

A partir de la fracción celular del cultivo de *E. Coli* inducido para la expresión de la proteína de interés, se realizaron diferentes protocolos de lisis:

#### ***Lisis por métodos químicos***

Se utilizó el *buffer* que contiene Tris-Cl 20 mM, pH 7,2; 5% Tolueno; 0,05% Tritón y EDTA 3,42 mM. Se incubó en agitación lenta durante 30 minutos a 37 °C y luego se centrifugó a 10.000 xg, 20 minutos a 4 °C. Al sobrenadante se le agregó DNAsa I 10 ug/ml, PMSF 1mM y DTT 1 mM.

También se utilizó el *buffer* de Urea 8 M como único *buffer* de lisis. Se resuspendió el *pellet* bacteriano con dicha solución y se incubó en agitación 2 horas. Luego se centrifugó a 16.000 xg para la separación de la fracción soluble de la no soluble

#### ***Lisis por métodos enzimáticos***

Se resuspendió la fracción celular correspondiente a 1 litro de cultivo en el 15 ml de *buffer* A (Tris HCl 500mM pH8, Dextrosa 50mM, EDTA 1mM y lisozima 1 mg/ml) y luego de incubar 10 minutos a temperatura ambiente se agregaron 15 ml de *buffer* B (Tris HCl 10mM pH8, EDTA 1mM, Tween-20 0,5% y NP-40 0,5%), incubando 15 minutos a 37°C.

#### ***Lisis por métodos físicos***

Se realizaron dos protocolos de sonicado, en el ciclado 1 se resuspendieron las células en un *buffer* NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 8,2; NaCl 300 mM e imidazol 20 mM. El mismo se utilizó en una proporción de 50 ml de *buffer* por litro de cultivo bacteriano, con 5 ciclos de 3 minutos al 50% de potencia, con 30 segundos de pausa por cada ciclo.

En el ciclado 2 se utilizó un *buffer* compuesto por NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 30 mM, β-mercaptoethanol 10mM y Tween 20 0.2%, y se sonicaron las células con 3 ciclos de 30 segundos al 50% de potencia, con 40 segundos de pausa entre cada ciclo.

Luego de cada ruptura se realizó una centrifugación de 20 minutos en el rotor JA-14 (Beckman Coulter, Avanti J26-XP) a 4 °C y 16.000 xg.

Por otro lado, se realizó la lisis mediante *French Press*. El *pellet* de células obtenido a partir de un cultivo saturado de 50 ml, se resuspendió en 10 ml de *buffer* de lisis (Tris-Cl 50 mM; NaCl 200 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; DTT 5 mM y PMSF 1 mM). La prensa se utilizó con una presión de 7000 a 10000 psi y se realizaron 4 ciclos de ruptura. Se centrifugó a 16000 xg durante 20 minutos a 4°C para la separación de la fracción soluble.

#### ***Lisis por método mixto***

A las fracciones no solubles obtenidas de la ruptura celular con el *buffer* Tolueno y mediante sonicado, se las solubilizó con un *buffer* de Urea 8 M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM y Tris-HCl 10 mM en agitación *overnight*. Luego se centrifugó a 16000 xg para separar las fracciones y se analizó el resultado mediante SDS-PAGE.

### **2.3.3. Purificación de CT-VP6-His**

#### ***En condiciones nativas***

La fracción soluble obtenida, luego de la lisis bacteriana se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente con una resina de Ni<sup>2+</sup> (Ni-NTA Agarose, Qiagen), previamente equilibrada con el mismo *buffer* de sonicado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM; pH 8,2; NaCl 300 mM y 20mM de Imidazol). Luego se lavó y eluyó las fracciones de interés con concentraciones de Imidazol entre 20mM a 500 mM, o alternativamente con soluciones de pH 8 y pH 4,5.

#### ***En condiciones desnaturalizantes***

La fracción soluble obtenida luego de la lisis bacteriana por el método mixto, se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente con la resina de Ni<sup>2+</sup> (Ni-NTA Agarose, Qiagen), previamente equilibrada con el mismo *buffer* de lisis. Luego la proteína CT-VP6-His fue eluída con el *buffer* de elución conteniendo diferentes concentraciones de Urea (1M, 2M, 4 M, 6M y 8M).

### **2.3.4. Análisis por espectrometría de masa**

La fracción correspondiente a la proteína CT-VP6-His purificada se analizó mediante espectrometría de masa (servicio de espectrometría de masa de la Universidad Nacional de Quilmes). El equipo utilizado posee un detector de masa *LCQ advantage max*, *Thermo Finnigan*, acoplado a un equipo de HPLC *Surveyor Plus* con Columna *vydac RP C8 25-11*. En análisis de deconvolución fue realizado con el programa de *pro-mass xcalibur*.

### 2.3.5. Cuantificación de proteínas totales

Para la cuantificación de proteínas totales, se utilizó el equipo Nanodrop 1000 (Thermo) por absorbancia a 280nm. Alternativamente se utilizó el método de Bradford. Para la cuantificación de RFU (unidades relativas de fluorescencia), se utilizó el Nanodrop de fluorescencia 3300 (Thermo).

## 2.4. Técnicas de biología celular

### 2.4.1. Líneas celulares de Mamíferos

La línea celular 293T, obtenida a partir de la transformación de células de riñón de embrión humano (HEK) con ADN de adenovirus tipo 5, fue descrita por primera vez por [Graham y colaboradores \(1977\)](#). Esta variante contiene en su genoma el antígeno mayor T de SV40 que permite una replicación episomal de alto número de copias de aquellos vectores plasmídicos que contengan un origen de replicación del virus SV40. También se utilizó la línea celular COS-7 derivada de la línea celular de riñón de mono verde africano (CV-1), la cual esta transformada con una versión mutante del virus SV40, defectivo en su origen de replicación, que codifica para el antígeno T ([Gluzman, 1981](#)).

### 2.4.2. Mantenimiento de líneas celulares de mamíferos

Los cultivos celulares se realizaron en frascos de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> o 75 cm<sup>2</sup> y en poli cubetas de diferentes superficies (Sarstedt), con medio Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (MP Biomedicals, Estados Unidos), suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (Bioser, Argentina) y 1x de antibióticos/antimicóticos (Invitrogen), incubando a 37 °C con 5 % de CO<sup>2</sup> (Sanyo MCO-17AIC, Sanyo Electric Co).

Los repiques celulares se efectuaron cuando el cultivo presentaba una cobertura de la superficie superior al 70 % de confluencia. Para esto, en los casos que fue necesario se empleó Tripsina 1x (PAA Laboratories GmbH, Alemania) para desprender las células de la superficie plástica, inactivando la misma mediante el agregado de medio con suero, y siendo luego diluidas en medio de cultivo fresco. Durante el mantenimiento de las líneas celulares se realizaron pasajes con diluciones ¼ en medio de cultivo fresco.

### 2.4.3. Transfección de células de mamífero

Monocapas celulares confluentes al 70% se lavaron con PBS y se transfectaron con el reactivo polietilenimina (PEI, Universidad de Buenos Aires - Facultad de Farmacia y Bioquímica – Departamento de Química Orgánica) de acuerdo a las indicaciones del

fabricante. En todos los casos el ADN plasmídico fue purificado utilizando el kit de purificación de plásmido (Productos Bio-lógicos).

## **2.5. Técnicas de microscopía**

### **2.5.1 Microscopía de fluorescencia**

La captura de imágenes de fluorescencia se realizó a partir de células adherentes cultivadas sobre placas de 12 ó 24 pocillos a una confluencia del 50%. Luego de 48 hs de incubación (en el caso de células transfectadas), las mismas fueron fijadas con 4% de formaldehído en PBS durante 15 min a temperatura ambiente, y luego incubadas con solución de montaje con DAPI (Vector). Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio de fluorescencia invertido *Nikon TE2000 eclipse Inverted Microscope*.

## **2.6. Ensayos y métodos inmunológicos**

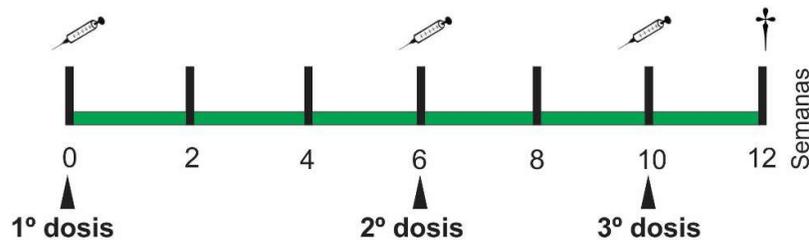
### **2.6.1 Inmunización de ratones**

Para el esquema de inmunización con el antígeno GFP, ratones Balb/C machos de 6 semanas (4 o 5 por grupo) fueron inmunizados por vía intramuscular con 50 µg de ADN plasmídico (pZ-EGFP y pEGFP) y 10 µg del adyuvante monofosforil lípido A (MPLA), o con 0,5 µg-20 µg de proteína soluble más 50 µl del adyuvante incompleto de Freund (INF). En ambos casos el volumen final por dosis fue de 100 µl, completando con solución fisiológica en caso de ser necesario.

El esquema de inmunización utilizado se detalla en la **figura 2.1**, el mismo consistió en una primera dosis, seguido de 2 refuerzos, excepto los grupos que fueron inoculados con ADN en la primer y segunda dosis, los cuales no recibieron una tercer dosis

El detalle de las dosis de cada grupo se muestra en la **tabla 2.3**. En todos los casos, las inmunizaciones con ADN se acompañaron con el adyuvante MPLA, mientras que las dosis con proteína soluble se realizaron con el adyuvante incompleto de Freund.

Se tomaron muestras de sangre, de todos los grupos, en las semanas 0, 2, 4, 6, 8, 12 para permitir el análisis de la cinética de la respuesta inmune. Finalmente los ratones fueron sacrificados en la semana 12. Los sueros obtenidos en cada sangría fueron almacenados a -20 ° C hasta su posterior uso.



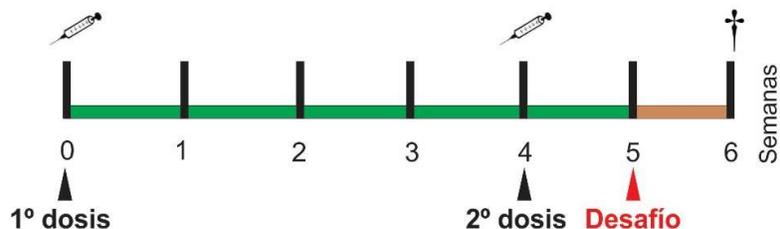
**Figura 2.1 Esquema de inmunización para el antígeno GFP.** La primer dosis se realizó en la semana 0, la segunda en la semana 6, mientras que la última dosis se administró en la semana 10. Se tomaron muestras de sangre en las semanas 0, 2, 4, 6, 8 y 12; y se sacrificaron los animales luego de la semana 12.

	1° dosis	2° dosis	3° dosis
<b>Grupo 1</b>	0,5 µg GFP + INF	0,5 µg GFP + INF	20 µg GFP + INF
<b>Grupo 2</b>	50 µg pZ-EGFP (ADN) + MPLA	0,5 µg GFP + INF	20 µg GFP + INF
<b>Grupo 3</b>	50 µg pZ-EGFP (ADN) + MPLA	25 µg pZ-EGFP (ADN) + MPLA	
<b>Grupo 4</b>	50 µg pEGFP (ADN) + MPLA	0,5 µg GFP + INF	20 µg GFP + INF
<b>Grupo 5</b>	50 µg pEGFP (ADN) + MPLA	25 µg pEGFP (ADN) + MPLA	
<b>Grupo 6</b>	Solución fisiológica	Solución fisiológica	Solución fisiológica

**Tabla 2.3. Protocolo de inmunización del antígeno GFP por grupo.** Se detallan la masa de ADN o proteína soluble utilizada en cada dosis, junto con el adyuvante correspondiente a cada inmunización (MPLA, monofosforil-Lipido A; INF, adyuvante incompleto de Freund). El grupo 6, el cual solo fue inyectado con solución fisiológica estéril, se utilizó como control del experimento.

En el segundo ensayo de inmunización, se utilizaron nuevamente ratones Balb/C machos de 8 semanas, pero en éste caso el antígeno utilizado fue CT-VP6-His. Nuevamente se inmunizaron por vía intramuscular con 50 µg de ADN plasmídico conteniendo la secuencia para la expresión de Z-CT-VP6 o CT-VP6 más 10 µg del adyuvante monofosforil lípido A (MPLA). Y en el caso de las dosis de proteína, con 20 µg de proteína soluble (CT-VP6-His) o con 20 µg de péptido soluble, más 50 µl del adyuvante incompleto de Freund (INF). En todos los casos el volumen final por dosis fue de 100 µl, completando con solución fisiológica en caso de ser necesario. En este nuevo esquema de inmunización se administraron únicamente dos dosis (**figura 2.2**), y se utilizaron los mismos adyuvantes que en el protocolo anterior. A la 5<sup>ta</sup> semana, se realizó el desafío de los animales inmunizados con Rotavirus murino cepa EC ( $10^4$  *shedding dose* 50 (SD50) en 100 µl de volumen final por vía intragástrica. Al día siguiente y durante 6 días más, se colectó la materia fecal de cada animal

correspondiente a cada grupo, para luego realizar la titulación del virus presente en materia fecal. Por otro lado, se tomaron muestras de sangre en las semanas 2, 4 y 6.



**Figura 2.2 Esquema de inmunización para el antígeno CT-VP6.** La primer dosis se realizó en la semana 0, y luego un refuerzo a la semana 4. Una semana después se realizó la infección de los animales por vía intragástrica con Rotavirus, y durante los 7 días siguientes se colectó materia fecal de cada animal correspondiente a cada grupo. Por último, en la sexta semana los animales fueron sacrificados. Se tomaron muestras de sangre en las semanas 2, 4 y 6.

El detalle de las dosis de cada grupo se muestra en la **tabla 2.4**. En todos los casos, las inmunizaciones con ADN se acompañaron con el adjuvante MPLA, mientras que las dosis con proteína o péptido soluble se realizaron con el adjuvante incompleto de Freund.

	1° dosis	2° dosis
<b>Grupo 1</b>	20 µg CT-VP6 + INF	20 µg CT-VP6 + INF
<b>Grupo 2</b>	50 µg plntA- Z-CT-VP6 (ADN) + MPLA	20 µg CT-VP6 + INF
<b>Grupo 3</b>	50 µg plntA-CT-VP6 (ADN) + MPLA	20 µg CT-VP6 + INF
<b>Grupo 4</b>	50 µg plntA-Z-PEP (ADN) + MPLA	20 µg PEP + INF
<b>Grupo 5</b>	20 µg PEP + INF	20 µg PEP + INF
<b>Grupo 6</b>	Solución fisiológica	Solución fisiológica
<b>Grupo 7</b>	Desafío con rotavirus (5 <sup>ta</sup> semana)	

**Tabla 2.4 Protocolo de inmunización del antígeno CT-VP6, por grupo.** Se detallan la masa de ADN o proteína soluble utilizada en cada dosis, junto con el adjuvante correspondiente a cada inmunización (MPLA, monofosforil-Lipido A; INF, adjuvante incompleto de Freund). El grupo 6, el cual solo fue inyectado con solución fisiológica estéril, se utilizó como control negativo del experimento. Mientras que el grupo 7, no tuvo inmunizaciones previas al desafío con Rotavirus, en la 5<sup>ta</sup> semana.

### 2.6.2 Enzimo-inmuno Ensayo (EIE o ELISA)

Para llevar a cabo el análisis de los sueros extraídos se realizó un ensayo de EIE indirecto. Para ello, se sensibilizó una poli cubeta (*Greiner Bio-One, Microlon*) de 96

pocillos con 50  $\mu$ l de una solución de 10  $\mu$ g/ml de la proteína correspondiente (GFP o CT-VP6) en *buffer* Carbonato-Bicarbonato pH 9,0 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 mM,  $\text{NaHCO}_3$  90 mM, NaCl 140 mM), para el análisis de los sueros  $\alpha$ -GFP o  $\alpha$ -CT-VP6. Luego de incubar *over night* a 4°C se realizaron 3 lavados con Solución de Lavado (*Buffer* PBS conteniendo 0,05 % de Tween 20, pH 7,2) y se agregaron los sueros a evaluar diluidos 1/100 en Solución de Dilución (Solución de Lavado con 1% de Albúmina de suero bovino -PBS-BSA 1 %-, pH 7,2). Se incubó durante 1 hora a 37°C u *over-night* a 4°C, y luego se realizaron 3 lavados. Luego se agregó el anticuerpo secundario comercial IgG de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón, conjugado a peroxidasa (Santa Cruz *Biotechnologies*) en Solución de Dilución 1/3000. Esto se incubó durante 1 hora a 37°C y luego de la etapa de lavado, se agregó a cada pocillo la solución de revelado. La misma se compone de 1 mg/ml de Ofenilendiamina (OPD) en *buffer* citrato pH 5 (ácido cítrico 100 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  200 mM con el agregado de 6  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% por cada ml de reactivo). Posterior a la incubación de la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad, se detuvo la misma mediante el agregado de una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 9%, y se procedió a determinar la absorbancia a 492 nm en el lector de multiplacas (*Dimex Technologies MRXTC*). Los datos obtenidos se analizaron mediante el *software GraphPad Prism 6*.

### 2.6.3 Inmunodetección (*Western blot*)

Para la realización del *western blot* las muestras a analizar se separaron por SDS-PAGE (12-18% en gel de poliacrilamida) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond P+, Amersham Pharmacia) en *buffer* Tris-glicina conteniendo 20% (v/v) de metanol. Para evitar la unión no específica de los anticuerpos, las membranas fueron bloqueadas por incubación con leche descremada al 5% en PBS durante 16 hs horas a 4° C. Para la incubación de los anticuerpos primarios se utilizaron diluciones entre 1/500 y 1/1000 en leche al 2% en BPS a 37 °C durante 1 h. Luego, para la incubación del anticuerpo secundario se utilizaron anticuerpos comerciales  $\alpha$ -conejo o  $\alpha$ -ratón conjugados con peroxidasa (Santa Cruz, *Biotechnology*) en una dilución 1/10000 en PBS 0,1% Tween-20 a 37 °C durante 1 h. Entre cada incubación, la membrana fue lavada tres veces con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente.

### 2.6.4. Titulación de rotavirus en materia fecal

La toma de muestras de la materia fecal durante los 7 siguientes a la infección con rotavirus EC-*wt*, se realizó en todos los grupos del ensayo. Cada grupo de ratones, se separó en cajas individuales, para lograr coleccionar las heces de cada uno de ellos.

Luego de obtener entre 3 y 5 *pellets* de materia fecal se sanitizó el recipiente donde se encontraba cada ratón con etanol 70% y se repitió el procedimiento para el resto de los ratones.

Las heces fueron recolectadas en microtubos de 1,5 ml, previamente rotulados y pesados, y resuspendidos en la solución TNC (Tris 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM y Tween-20 0,05%), a una concentración final de 10% p/v. Luego de la resuspensión, se centrifugó a 7000 rpm durante 5 minutos, se recolectó el sobrenadante y se mantuvo a -20 °C hasta su utilización.

Para la titulación, se realizó un ELISA desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Nacional de Quilmes para la detección de muestras positivas para rotavirus grupo A. El método consiste en un ELISA de captura que emplea anticuerpos policlonales de cabra anti-rotavirus. Se sensibilizaron placas de 96 pocillos con una dilución 1/250 de IgG purificada de cabra anti-rotavirus en buffer carbonato pH 9,6 incubando 1 hora a temperatura ambiente. Luego, la placa se lavó tres veces con PBS-T (PBS, Tween-20 0,2 %). Las muestras a analizar se diluyeron en PBS-TC (PBS-T, caseína 1 %) en una dilución 1/5, se depositaron en los pocillos y se incubaron *overnight* a 4 °C. Luego del lavado se incubó con una dilución 1/1000 de IgG purificada anti-rotavirus biotinilada en PBS-TC durante 1 h a 37 °C, se lavó y se incubó 30 minutos con una dilución 1/4000 de estreptoavidina conjugada con peroxidasa (USBiologicals, Swampscott, MA, Estados Unidos) en PBS-TC.

Finalmente, las placas se revelaron con OPD 1mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y peróxido de hidrógeno (0,03 % v/v) en *buffer* citrato, pH 5,0. Luego de 15 minutos de desarrollo de color la reacción se frenó con ácido sulfúrico 1 N y se determinó la densidad óptica a 490 nm (DO<sub>490</sub>) en un lector de microplacas Asys UVM 340 (Biochrom US, Holliston, MA, Estados Unidos), considerándose positivas aquellas muestras con DO<sub>490</sub> mayor a 0,210 (Argüelles *et al.*, 2000). Los datos fueron analizados utilizando el software *GraphPad Prism 6*.

# CAPÍTULO 3

## ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

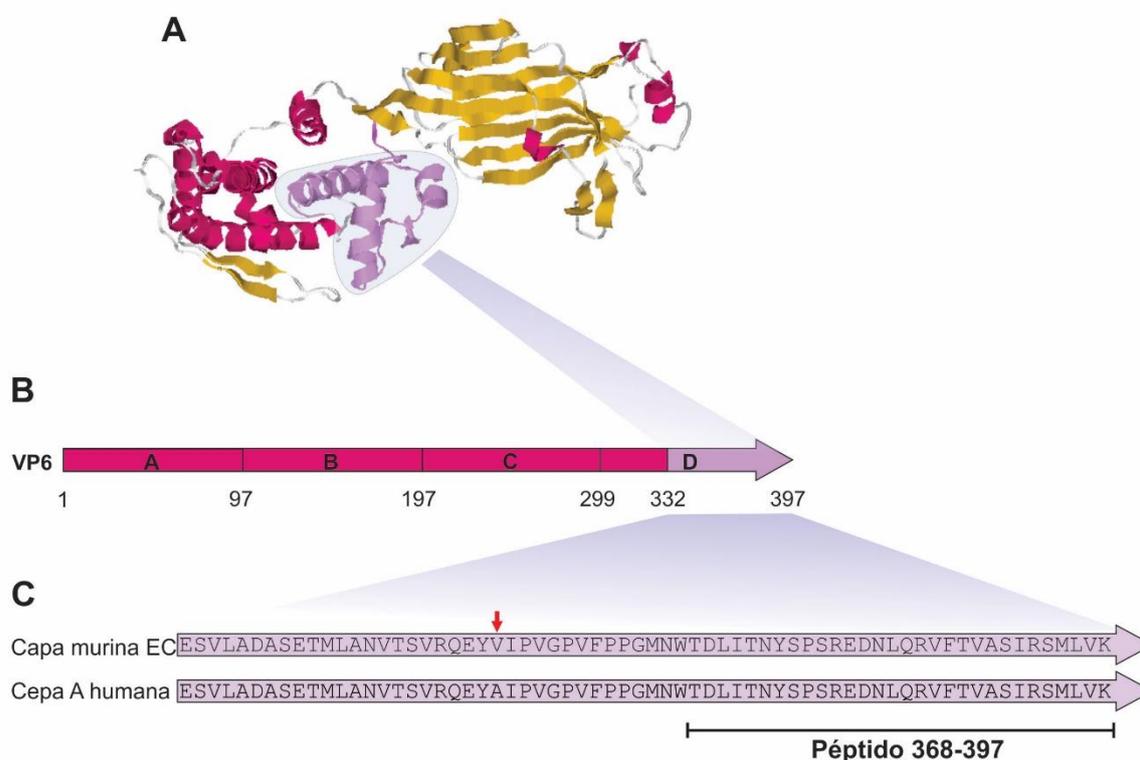




### 3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

#### 3.1. Selección del antígeno CT-VP6

En la búsqueda de la región de mayor inmunogenicidad de la proteína VP6, [Choi et al., \(2000\)](#) construyeron 3 versiones truncadas de VP6, provenientes de la cepa murina EDIM. Dividieron a VP6 en 4 regiones denominadas: A, B, C y D, con las cuales realizaron tres construcciones plasmídicas (AB, BC y CD, ver **figura 3.1**), donde cada versión de VP6 estaba fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP, *maltose binding protein*). En el protocolo de inmunización y desafío, los tres fragmentos estimularon respuesta inmune contra rotavirus, sin embargo el más eficiente de los tres fue el fragmento CD, con el cual se obtuvo una reducción del 99,8% de Rotavirus en las heces de los ratones. A su vez, dentro de la región CD (200 aa) encontraron una secuencia de 65 aminoácidos (332-397, denominada CD4) que generaba una reducción del 92% de Rotavirus en las heces. Mediante ensayos de ELISA comprobaron que CD4 producía altas concentraciones de anticuerpos IgG contra Rotavirus ([Choi et al., 2000](#)).



**Figura 3.1: Esquema de la proteína VP6 y la región CT-VP6. A.** Estructura cristalográfica de la proteína VP6, donde se señala en violeta la región CT-VP6. **B.** Esquema de la proteína VP6 dividida en las 4 regiones y subregiones según [A. H. Choi et al., \(2000\)](#). **C.** Secuencia aminoacídica de la región CT-VP6 (interna a la región CD) de la cepa murina EC y la cepa humana A. En la misma se señala el

aminoácido que difiere entre las dos cepas y la secuencia correspondiente al péptido 368-397.

En base a estos resultados, en este trabajo se seleccionó la región CD4 (a partir de ahora denominada CT-VP6), para evaluar la plataforma de vehiculización de antígenos basada en la proteína Z del virus Junín. En particular se utilizó la proteína VP6 de la cepa murina EC, cuya secuencia aminoacídica difiere en un solo aminoácido de la cepa A de Rotavirus humano (**Figura 3.1**).

### **3.2. Selección del péptido 368-397**

Con el objetivo de evaluar antígenos de distinto tamaño, además de la región CT-VP6, se seleccionó como antígeno un péptido interno a esta región, denominado péptido 368-397 (TDLITNYS~~PS~~REDNLQRVFTVASIR~~S~~MLVK). Esta subregión según Choi *et al.* (2000) fue capaz de generar la mayor defensa contra rotavirus de las evaluadas dentro de la región CT-VP6. La síntesis del mismo fue realizada por la empresa GenScript, en forma de Sal de acetato con un 96,5% de pureza, y solubilizado en agua ultrapura.

### **3.3. Perfil de hidrofobicidad de CT-VP6**

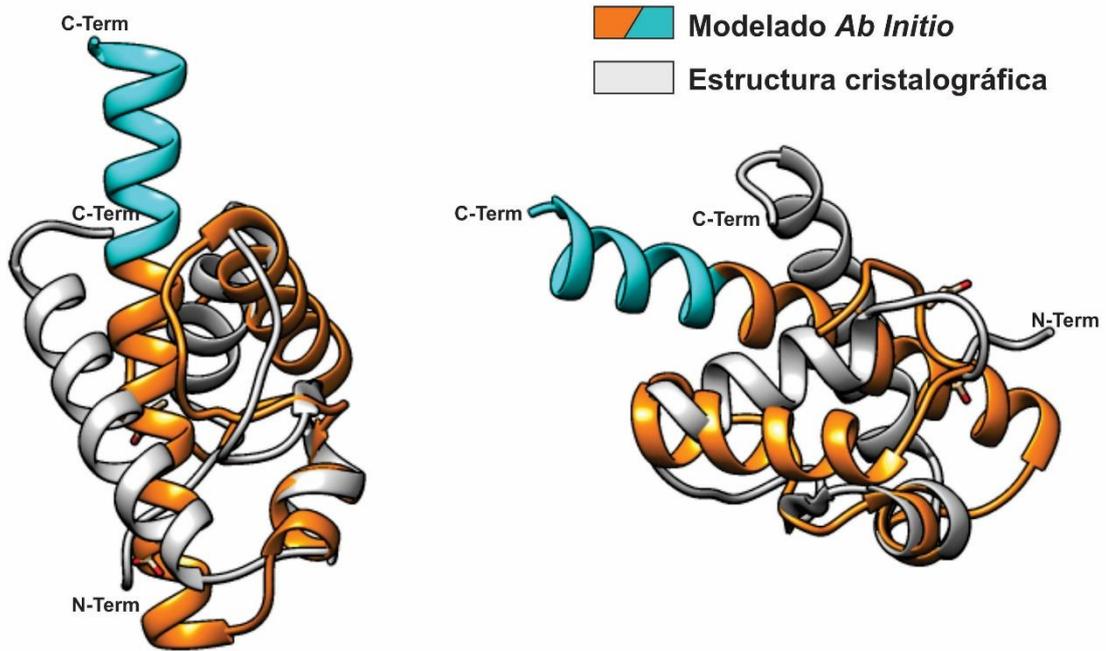
Con el objetivo de caracterizar la región CT-VP6, se realizó un análisis del perfil de hidrofobicidad utilizando el servidor *ProtScale* (Gasteiger *et al.*, 2005). Esto permite especular sobre la presencia de regiones transmembrana, o la posible solubilidad de la proteína CT-VP6 luego de ser expresada como una proteína independiente en un sistema heterólogo. El perfil obtenido, utilizando la matriz Kyte & Doolittle y una ventana de 9, se observa en la **Figura 3.2**, donde los valores mayores a 0 representan regiones hidrofóbicas, y las regiones menores a 0 corresponden a las zonas hidrofílicas. La detección de regiones hidrofílicas podría indicar zonas probables de ser expuestas a la superficie y poseer características antigénicas. Por ejemplo la región más hidrofílica de la figura, corresponde con los residuos del 45 al 55, los cuales coinciden con una región incluida en el péptido 368-397. Por otro lado, si bien se evidencian regiones hidrofobicas, las mismas no poseen la longitud habitual de regiones transmembrana.



**Figura 3.2:** Perfil de hidrofobicidad de CT-VP6, utilizando el servidor *ProtScale* con una ventana de 9 aminoácidos (Gasteiger *et al.*, 2005).

### 3.4. Predicción de estructura de CT-VP6

A partir de la estructura cristalográfica de VP6, previamente reportada por Mathieu *et al.* (2001) se buscó detectar la estructura secundaria y terciaria de la región CT-VP6 (Figura 3.3, en gris). Teniendo en cuenta que al expresar CT-VP6 independiente del resto de la proteína VP6, el plegado de la región podría diferir al especificado en el cristal de VP6. Por este motivo, se realizó un modelado *ab initio* utilizando el servidor Quark (Xu & Zhang, 2012), el cual fue comparado con la estructura extraída del cristal de VP6 (Figura 3.3). En la figura de la superposición de estructuras se evidencia que la estructura secundaria se conserva, es decir que las regiones que corresponden a alfa hélices, coinciden en ambos casos. Sin embargo, la estructura terciaria difiere en ambos casos, siendo los ángulos de inclinación de las alfa hélices y las regiones flexibles diferentes en cada estructura. Esta predicción es esperable, a partir de que el plegado de CT-VP6 en ausencia del resto de VP6 carece de las interacciones con otros aminoácidos que pueden modificar su conformación espacial



**Figura 3.3:** Superposición de la estructura cristalográfica de CT-VP6 (gris), extraída de la estructura completa de VP6, con el modelado *Ab Initio* de la secuencia de CT-VP6 (naranja y celeste) realizado con el servidor Quark. Para el modelado se utilizó la secuencia completa de CT-VP6 recombinante, incluyendo la cola de 6 histidinas (ver clonado de CT-VP6). La figura señala dos orientaciones de la misma superposición, la cual fue realizada con el programa UCSF *Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004).

### 3.5. Optimización de codones de CT-VP6

Para lograr altos niveles de expresión en sistemas heterólogos, es recomendable realizar una optimización del uso de codones, para adaptar la secuencia nucleotídica al organismo productor de la proteína de interés, en este caso *E. Coli*. Para esto se utilizó el servidor OptimumGene™-Codon Optimization (GenScript) donde se evidenciaron 56 mutaciones puntuales, sin modificación de la secuencia aminoacídica (figura 3.4).

```

CT-VP6-Murine EC
GAATCAGTTCTCGCGGATGCAAGTGAAACTATGTTGGCTAATGTAACGTCAGTCAGGCAA
CT-VP6-Optimizado
GAATCTGTTCTGGCGGACGCGTCTGAAACCATGCTGGCGAACGTTACCTCTGTTTCGTCAG
***** ***** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
**
Q
E S V L A D A S E T M L A N V T S V R

CT-VP6-Murine EC
GAATACGTAATACCAGTAGGACCAGTATTTCCACCAGGAATGAATTGGACTGACCTCATT
CT-VP6-Optimizado
GAATACGTTATCCCGGTTGGTCCGGTTTTCCCGCCGGGTATGAACTGGACCGACCTGATC
***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
**
I
E Y V I P V G P V F P P G M N W T D L

CT-VP6-Murine EC
ACTAATTACTCACCATCAAGGGAGGACAACCTACAACGTGTGTTTACAGTAGCTTCCATT
CT-VP6-Optimizado
ACCAACTACTCTCCGTCTCGTGAAGACAACCTGCAGCGTGTTTTACCAGTTGCGTCTATC
** ** ***** ** ** * ** ***** ** ***** ** ** ** ** ** **
**
I
T N Y S P S R E D N L Q R V F T V A S

CT-VP6-Murine EC
AGAAGCATGCTGGTAAAGTAG
CT-VP6-Optimizado
CGTTCATGCTGGTTAAGC--
* ***** **
R S M L V K -

```

**Figura 3.4.** Alineamiento de la secuencia nucleotídica de CT-VP6 de la cepa murina EC y la secuencia con el uso de codones optimizados. El \* representa las posiciones conservadas entre ambas secuencias, y en la fila inferior se encuentra anotada la secuencia aminoacídica como referencia.

### 3.6. Propiedades bioquímicas

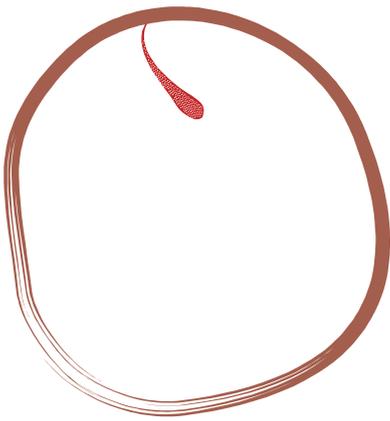
Los parámetros bioquímicos de las proteínas estudiadas en este trabajo se calcularon a partir de los datos de la secuencia de aminoácidos, utilizando el servidor ProtParam del paquete de herramientas de Proteómica ExpPASy (Gasteiger *et al.*, 2003). Un resumen de los pesos moleculares de cada una de las proteínas utilizadas en este trabajo se muestra en la **tabla 3.1**.

<b>Proteína</b>	<b>Peso molecular</b>
<b>En células de mamífero</b>	
Z-CT-VP6	17,9 kDa
Z-CT-VP6-GFP	45,3 kDa
Z-EGFP	37,8 kDa
CT-VP6	7,5 kDa
Z-PEP	14,0 kDa
<b>En E. Coli</b>	
Z-tio	27,3 kDa
CT-VP6-His	9,0 kDa
GST-CT-VP6	33,8 kDa
Tio-CT-VP6-His	23,9 kDa

**Tabla 3.1.** Pesos moleculares de cada una de las proteínas utilizadas en este trabajo, obtenidos a partir de la secuencia aminoacídica con el servidor *ProtParam*.

# CAPÍTULO 4

## GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS





## 4. GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS

En ésta sección, se detallará el desarrollo de las herramientas a utilizar en los ensayos *in vivo* e *in vitro* de este trabajo, en particular la construcción de vectores plasmídicos para su expresión en sistemas heterólogos o para ser utilizados como inmunógenos; y la expresión y purificación de proteínas recombinantes.

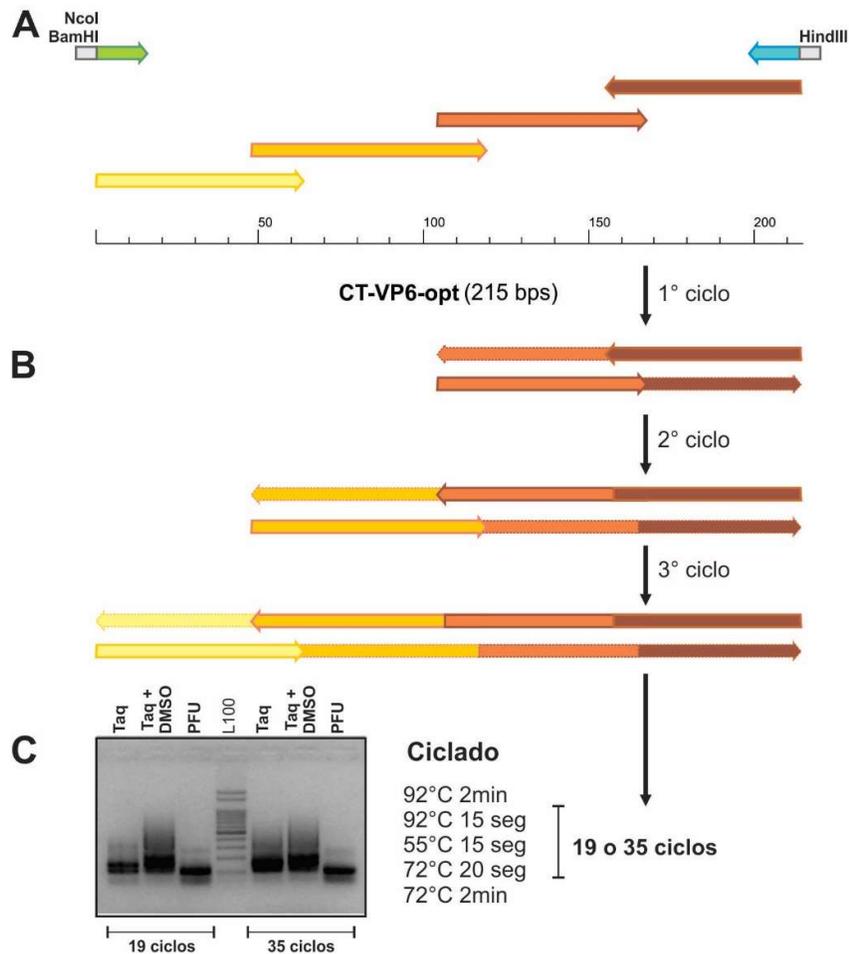
### 4.1 Producción de CT-VP6

El antígeno VP6 pertenece a un virus que infecta células eucariotas, por lo que el sistema de expresión ideal sería utilizar células eucariotas en cultivo. Sin embargo, teniendo en cuenta que la proteína VP6 no presenta glicosilaciones postraduccionales, se seleccionó el sistema de expresión en *E. Coli* para la producción del antígeno CT-VP6.

#### 4.1.1 Clonado de CT-VP6 en vectores procariotas

##### *Síntesis de CT-VP6*

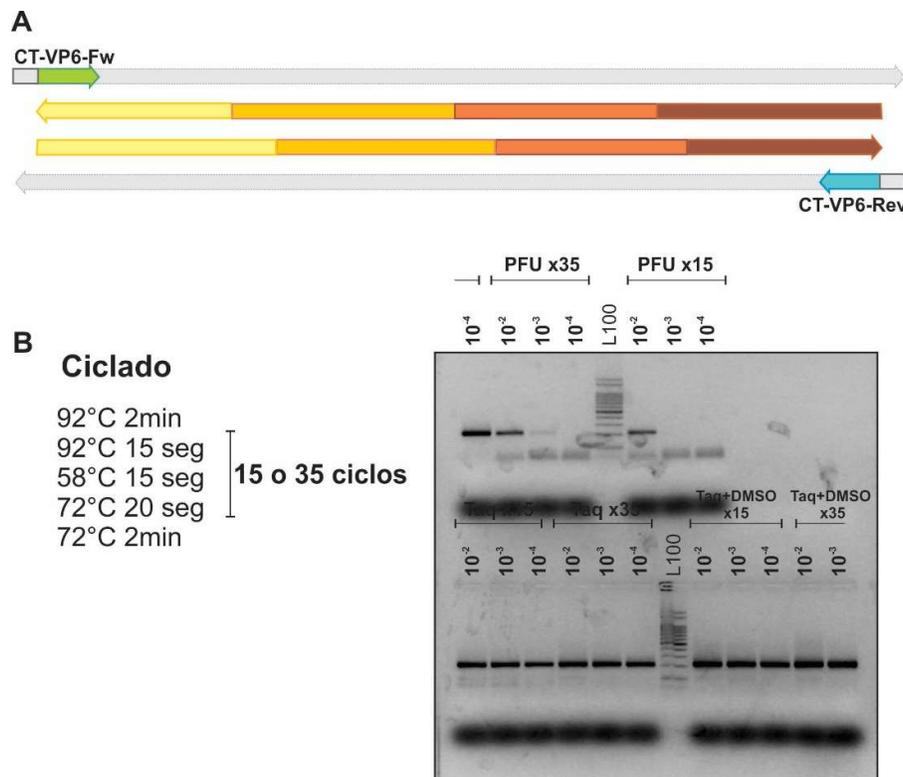
Para realizar el clonado de CT-VP6 con el uso de codones optimizados, es decir con las 56 mutaciones puntuales, se decidió utilizar una estrategia de síntesis por PCR. Para esto se diseñaron 4 oligonucleótidos de aproximadamente 70 nucleótidos cada uno, con alrededor de 20 nucleótidos solapados entre ellos (la secuencia de los mismos se encuentra detallada en la lista de *primers*, en la sección materiales y métodos). Los mismos fueron incubados en una mezcla de reacción, incluyendo una ADN polimerasa, con el objetivo de obtener el producto de fusión de los 4 oligonucleótidos. En la **figura 4.1. A** se observa un esquema de los oligonucleótidos diseñados y de lo que se espera obtener en los primeros tres ciclos de la reacción (**figura 4.1. B**).



**Figura 4.1: Síntesis de CT-VP6 mediante PCR.A.** Esquema del diseño de los oligonucleótidos utilizados para la síntesis, junto con dos *primers* adicionales (en verde y celeste) los cuales hibridan sobre los primeros y últimos 20 nucleótidos de la secuencia. **B.** Esquema del mecanismo de reacción de los primeros tres ciclos de la reacción. En cada ronda se observa el solapamiento de los oligonucleótidos y su extensión por medio de la ADN polimerasa. **C.** Electroforesis en gel de agarosa del producto de la reacción en las seis condiciones ensayadas (incluyendo un marcador de peso molecular), junto con el perfil del programa utilizado.

En resumen, durante el primer ciclo el oligonucleótido de orientación reversa hibrida junto al oligonucleótido con el que comparten 20 posiciones. Durante la temperatura óptima de extensión de la ADN polimerasa, la enzima utiliza el extremo 3' libre en cada cadena y extiende hasta el final. Esto genera como producto un fragmento doble

cadena que fusiona ambos oligonucleótidos. En el siguiente ciclo, la hebra con sentido reverso producto de la fusión anterior, hibrida con el oligonucleótido con el cual se solapan 20 nucleótidos, y nuevamente la ADN polimerasa extiende a partir de los extremos 3' libres, hasta llegar al final. Por último en la tercer ronda, ocurre el proceso homólogo, incorporando al último oligonucleótido en cuestión. De esta manera, luego de 19 o 35 ciclos, la mezcla de reacción estará comprendida por todas las formas de fusión entre los oligonucleótidos, incluyendo la que comprende los 4 fragmentos. Esto se evidencia en la **figura 4.1 C**, donde se observa el producto de PCR para seis condiciones ensayadas, en presencia de *Pfu*, *Taq* y esta última en presencia de DMSO. En los tres casos se evaluó el producto obtenido a los 19 y 35 ciclos.

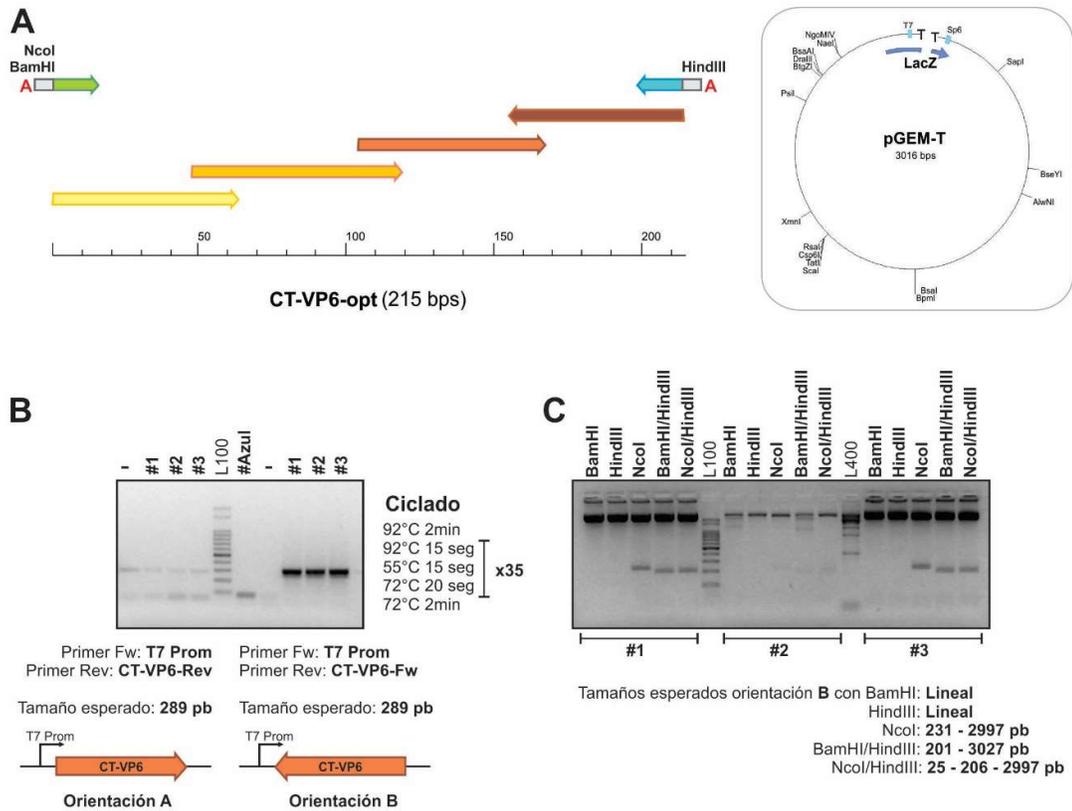


**Figura 4.2: Reamplificación por PCR del fragmento CT-VP6.A.** Esquema del diseño de los *primers* específicos de los extremos CT-VP6-Fw y CT-VP6-Rev, y del producto de la extensión de los mismos, donde quedan incorporados los sitios de enzimas de restricción, NcoI y BamHI para la orientación directa y HindIII para el reverso. **B.** Electroforesis en gel de agarosa, donde se evaluaron 16 condiciones de reacción, dos ADN polimerasas (*Pfu*, *Taq* y *Taq* + DMSO), 15 o 35 ciclos y tres diluciones del molde (1/100, 1/1000 y 1/10000). Además se indica el perfil del ciclado utilizado en el ensayo.

De manera de enriquecer la reacción en el producto de la fusión completa de los 4 fragmentos, se realizó una amplificación por PCR utilizando dos *primers* diseñados sobre los extremos de la secuencia (**figura 4.2. A**). Estos poseen una longitud de 30 nucleótidos, que incluye una secuencia no solapada (ver lista de *primers*, CT-VP6-Fw y CT-VP6-Rev), para la incorporación de sitios de restricción en el producto de PCR, señalada en gris en la figura. Como la reacción más enriquecida en el fragmento esperado de 207 pb fue la realizada con la Taq ADN polimerasa (**figura 4.1. C**), se utilizó una dilución del producto obtenido luego de los 35 ciclos, como molde para la reamplificación del mismo. Como se observa en la **figura 4.2 B** todas las condiciones de reamplificación ensayadas (*Pfu*, *Taq* y *Taq* + DMSO, por 15 o 35 ciclos, utilizando como moldetres diluciones, 1/100,1/1000 y 1/10000) dieron un único producto específico del tamaño esperado. Sin embargo, como el amplicón obtenido sería utilizado para clonar en el vector comercial pGEM-T®, se continuó trabajando con los productos obtenidos con la *Taq* ADN polimerasa.

#### **Clonado de CT-VP6 en pGEM-T® (pGem-T-CT-VP6)**

A modo de aclaración, la *Taq* polimerasa posee una actividad transferasa terminal, que resulta en la adición de una adenina en el extremo 3' de cada cadena sintetizada. Este fenómeno permite el clonado con extremos cohesivos en el vector comercial pGEM-T®, el cual se utiliza en su forma lineal con extremos 3' de timina (**Figura 4.3 A**). Además, el sitio múltiple de clonado en dicho vector interrumpe la expresión de LacZ, lo que permite la selección de clones con o sin inserto, mediante la presencia o ausencia de actividad  $\beta$ -galactosidasa.



**Figura 4.3. Clonado de CT-VP6 en pGEM-T.** **A.** Esquema del producto de síntesis por PCR utilizando la *Taq* ADN polimerasa, y mapa del vector pGem-T lineal. **B.** Electroforesis en gel de agarosa del producto de la *Colony* PCR para las tres colonias seleccionadas, junto con los controles negativos del ensayo (- y #Azul). Además se indican los pares de *primers* utilizados en cada reacción junto con un esquema de la orientación obtenida para cada reacción. **C.** Producto del mapa de restricción realizado sobre las tres colonias evaluadas previamente, junto con un patrón de peso molecular (L100)

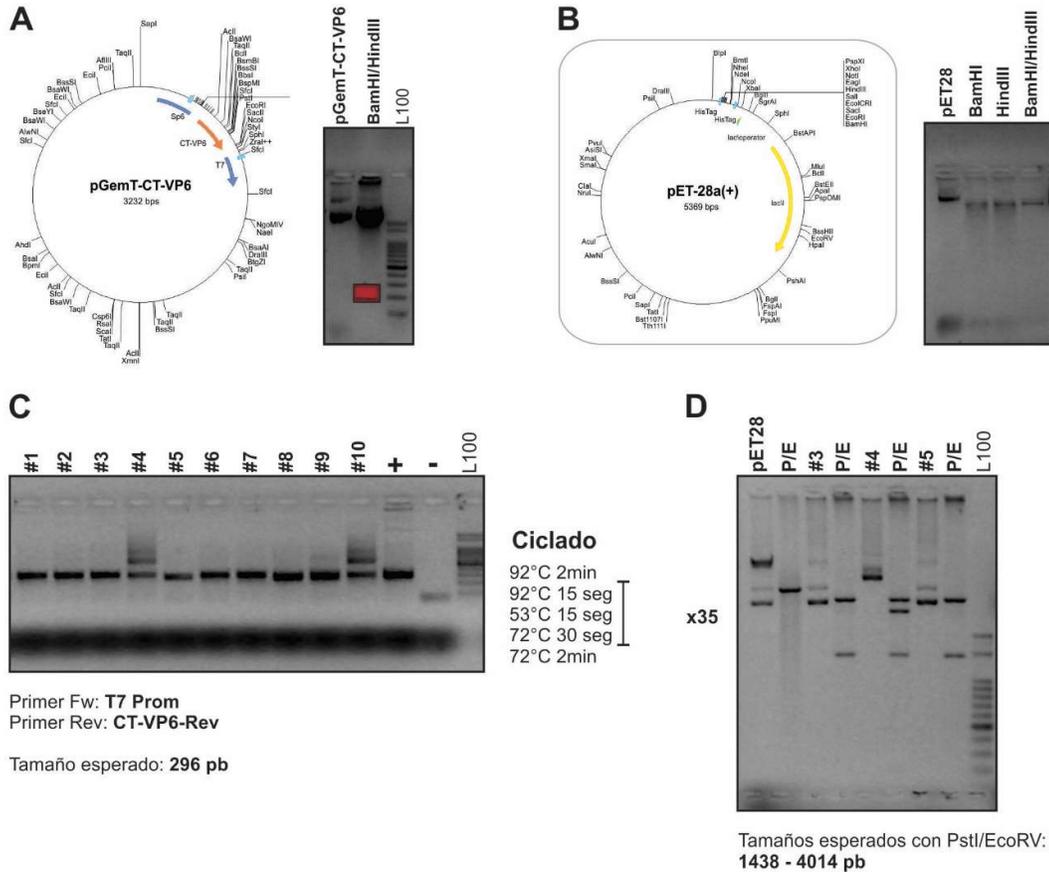
A pesar de que el vector posee un sistema de selección de clones positivos, se tomaron tres colonias al azar y se realizó un *colony PCR* con *primers* específicos (T7 Prom, CT-VP6-Rev y CT-VP6-Fw). En la **figura 4.3 B** se observa una electroforesis en gel de agarosa del producto de la *colony PCR* utilizando dos juegos de *primers*, lo que permite evaluar la orientación del inserto. Utilizando como controles del ensayo una colonia conteniendo el vector pGem-T® circular sin inserto (#azul) y una colonia de *E. Coli* DH5α sin vector (-), el resultado obtenido indica que las tres colonias seleccionadas contenían el inserto en la orientación B. Por otro lado, para confirmar mediante otra técnica la presencia e identidad del inserto, se realizó un mapa de

restricción con las enzimas BamHI, NcoI y, HindIII, sobre las tres colonias evaluadas previamente (**figura 4.3 C**). La electroforesis del resultado de la digestión evidenció los tamaños moleculares esperados para cada condición, lo que nuevamente confirma el clonado de CT-VP6 en pGEM-T® en la orientación B. A este vector se lo denominó pGEM-T-CT-VP6 (y se confirmó la totalidad de su secuencia mediante secuenciación automática, MacroGen Korea).

#### **Clonado de CT-VP6 en pET-28a (pET-CT-VP6-His)**

A partir de obtener el *orf*CT-VP6 con el uso de codones optimizados para *E. Coli* en el vector de clonado pGem-T®, se construyó el vector de expresión pET-CT-VP6. Para esto se utilizó el vector pET28a(+), el cual posee un promotor del Fago T7 y un *tag* de 6 histidinas para facilitar la posterior purificación de la proteína de interés.

Como se observa en la **figura 4.4 A**, se realizó una digestión de pGEM-T-CT-VP6 con BamHI y HindIII, de manera de liberar el inserto de 207pb, el cual fue purificado por *geneclon* a partir de la electroforesis en gel de agarosa (recuadro rojo de la **figura 4.4 A**). Por otro lado, el vector pET-28a fue también digerido con las enzimas BamHI y HindIII, tal como se muestra en la **figura 4.4 B**. Luego del evento de ligación y transformación en la cepa *E. Coli* DH5 $\alpha$ , se realizó un *colony* PCR de 10 colonias al azar, para evaluar los clones positivos. Esto se realizó utilizando los *primers* T7-prom y CT-VP6-Rev, esperando obtener un producto de amplificación de 296 pb para los clones positivos. Como se observa en la **figura 4.4 C**, todos los clones seleccionados evidenciaron el tamaño de amplicón esperado, por lo que se seleccionaron los clones #3, #4 y #5 para realizar un mapa de restricción con las enzimas PstI y EcoRV (**figura 4.4 D**). Como resultado del mismo, se observó que los clones #3 y #5 evidenciaron el patrón esperado (una banda de 1438pb y otra de 4014pb). Mientras que el clon #4 resultó en la formación de tres bandas.



**Figura 4.4: Clonado de CT-VP6 en el vector de expresión pET28a(+).** **A.** Esquema del vector pGem-T-CT-VP6 y la electroforesis en gel de agarosa de la digestión del mismo con las enzimas BamHI y HindIII. El recuadro rojo indica el fragmento purificado por *geneclean*. **B.** Esquema del vector pET-28a y la electroforesis en gel de agarosa de la digestión del mismo con las enzimas BamHI y HindIII. **C.** Electroforesis en gel de agarosa del *Colony* PCR de 10 colonias al azar, con los *primers* T7-Prom y CT-VP6-Rev, junto con el perfil de ciclado del mismo. **D.** Electroforesis en gel de agarosa del mapa de restricción de los clones #3, #4 y #5 utilizando las enzimas PstI y EcoRV

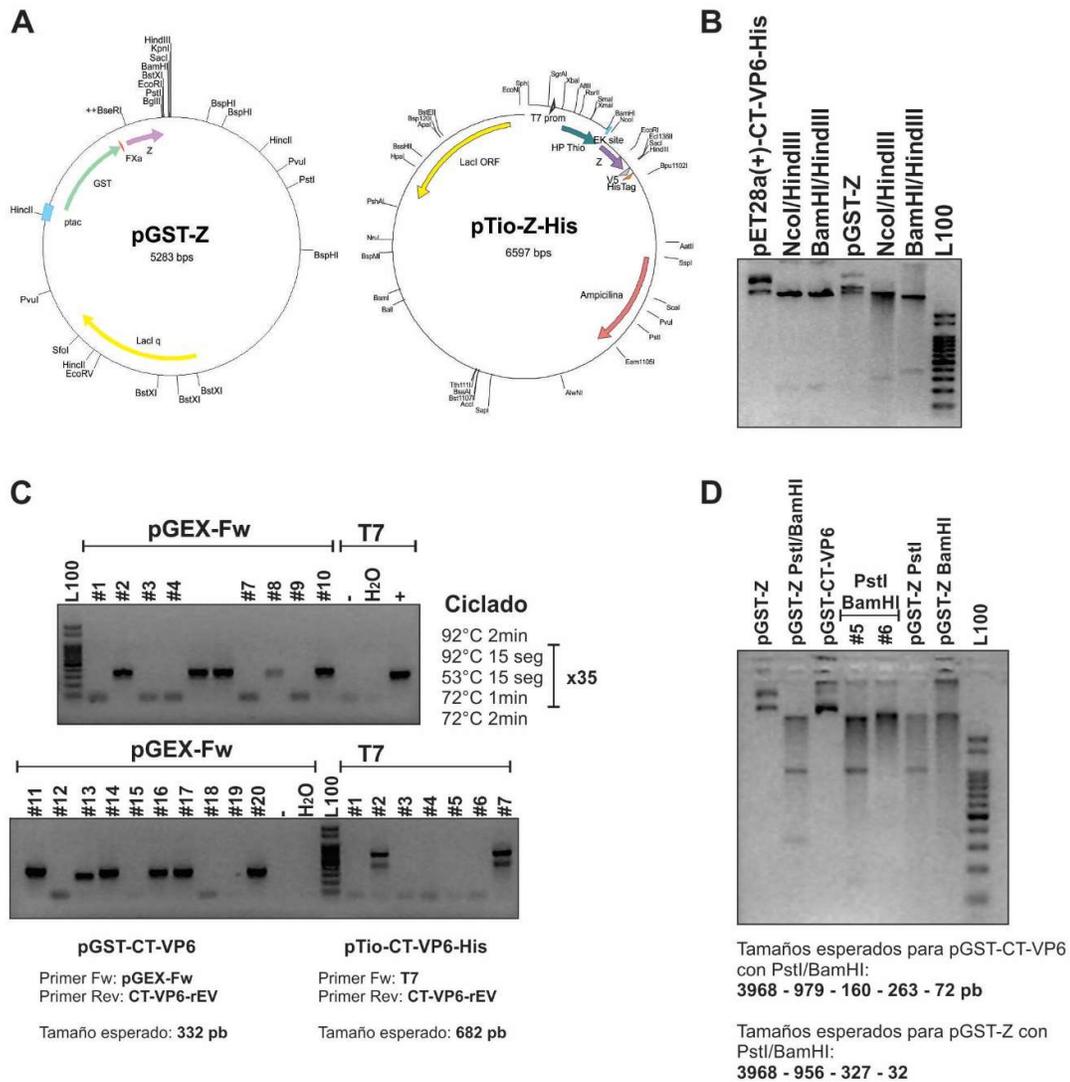
Como resultado del clonado de CT-VP6 en el vector pET28a, se obtuvo la construcción pET-CT-VP6-His, donde el marco de lectura de CT-VP6 queda fusionado por su extremo C-terminal al *tag* de histidinas presente en el vector. Este vector fue posteriormente confirmado por secuenciación automática y luego transformado en *E. Coli* cepa BL21 DE3, para permitir la expresión de los genes regulados por el promotor T7.

**Clonado de CT-VP6 en pTio-Z-His y pGST-Z (pTio-CT-VP6-His y pGST-CT-VP6)**

Paralelamente al clonado de pET-CT-VP6-His, se decidió realizar la construcción de CT-VP6 fusionada a las proteínas GST (pGST-CT-VP6) y Tioredoxina (pTio-CT-VP6-His). Ambos epítopes, al igual que el *tag* His, facilitan la posterior purificación, al mismo tiempo que podrían incrementar la solubilidad de la proteína de interés.

Para esto se utilizaron dos vectores previamente obtenidos en nuestro laboratorio, pTio-Z-His y pGST-Z. Ambas construcciones poseen a la proteína Z del virus Junín fusionado a los epítopes de purificación, por lo que se utilizó la estrategia de reemplazar el ORF de Z por el de CT-VP6. Como ventaja técnica, ambos vectores poseen resistencia al antibiótico Ampicilina, mientras que el vector pET-CT-VP6-His posee el gen para la resistencia a Kanamicina, lo que permite realizar una preselección de los clones positivos, mediante el uso de Ampicilina

Como se observa en la **figura 4.5 B**, el inserto CT-VP6 fue liberado del vector pET-CT-VP6-His con las enzimas NcoI/HindIII y BamHI/HindIII, junto con la apertura de los vectores pGST-Z (BamHI/HindIII) y pTio-Z-His (NcoI/HindIII, dato no mostrado). Luego de la evaluación de los clones mediante *colony* PCR (**figura 4.5 C**) y mapa de restricción (**figura 4.5 D**) se seleccionaron los clones pTio-CT-VP6-His #7 y pGST-CT-VP6 #5 para ser secuenciados y el plásmido construido, luego transformados en *E. Coli* cepa BL21 DE3 y BL21 pLys.



**Figura 4.5: Clonado de CT-VP6 en los plásmidos pTio-Z-His y pGST-Z.A.**

Esquema de los vectores pTio-Z-His y pGST-Z. **B.** Digestión de pET28a(+)-CT-VP6 con NcoI/HindIII y BamHI/HindIII, junto con la reacción de pGST-Z con BamHI/HindIII. **C.** *Colony PCR* de colonias al azar, luego de la ligación y transformación de los clonados de pGST-CT-VP6 y pTio-CT-VP6-His. En ambos casos se utilizó el primer CT-VP6-Rev, con el oligonucleótido pGEX-Fw para la evaluación de pGST-CT-VP6 y con T7-Prom para pTio-CT-VP6-His. **D.** Mapa de restricción con las enzimas PstI y BamHI de los clones seleccionados, #5 y #6, para pGST-CT-VP6. Se incluyó en el análisis por digestión al vector de partida, pGST-Z (sin digerir) y digerido con las enzimas PstI, BamHI y PstI/BamHI. En la región inferior de la imagen se encuentra el patrón de bandas de digestión esperado para cada vector.

#### 4.1.2 Clonados de CT-VP6 en vectores eucariotas

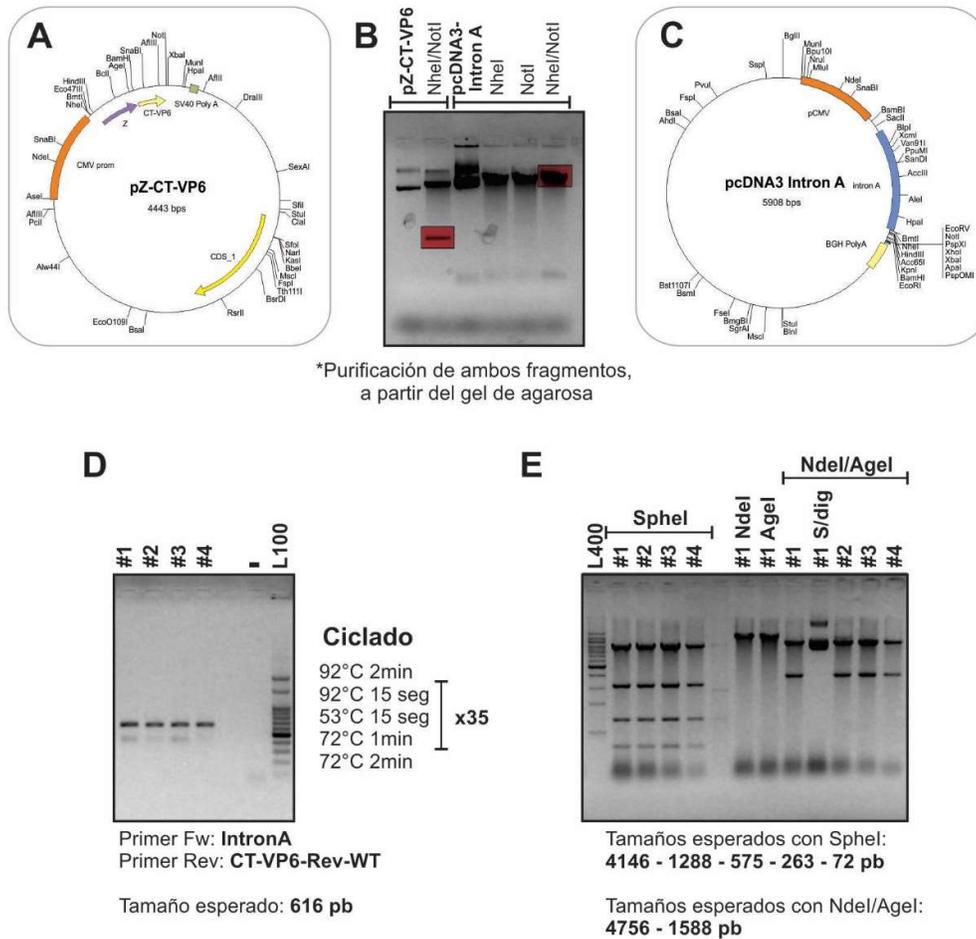
En este apartado, la secuencia codificante para CT-VP6 corresponde a la versión *wild type* de la cepa de Rotavirus murina EC, es decir no posee los codones optimizados para *E. Coli*. La misma fue obtenida a partir de los vectores pDonr221VP6EC (gentilmente cedido por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Nacional de Quilmes) y pZ-CT-VP6, previamente obtenido en nuestro laboratorio.

##### **Clonado de Z-CT-VP6 en pcDNA3.1-IntronA (pIntA-Z-CT-VP6)**

Como ya se mencionó previamente en la introducción, la proteína Z del virus Junín es capaz de generar VLPs mediante su sola expresión, aun estando fusionada a otra proteína heteróloga. Para comprobar que es funcional fusionada a la proteína CT-VP6, se realizó la fusión de CT-VP6 a Z en un vector eucariota, pcDNA3.1-IntronA (gentilmente cedido por el Dr. Branco de la Universidad de Tulane, USA).

Este vector de expresión posee el promotor de la proteína IE1 del virus CMV, junto con una región del Intrón A. El gen de IE1 del virus CMV posee 4 exones y 3 intrones. El mayor de los intrones, el intrón A, se encuentra en la región 5' del gen, y posee uno de los sitios más fuertes para la unión del factor nuclear 1 (NF1). Se ha demostrado empíricamente que la presencia del Intrón A, a continuación del promotor de IE1 de CMV (**figura 4.6 C**), aumenta la actividad promotora en células de mamífero, pudiendo esto ser consecuencia de la unión a NF1 (Chapman *et al.*, 1991).

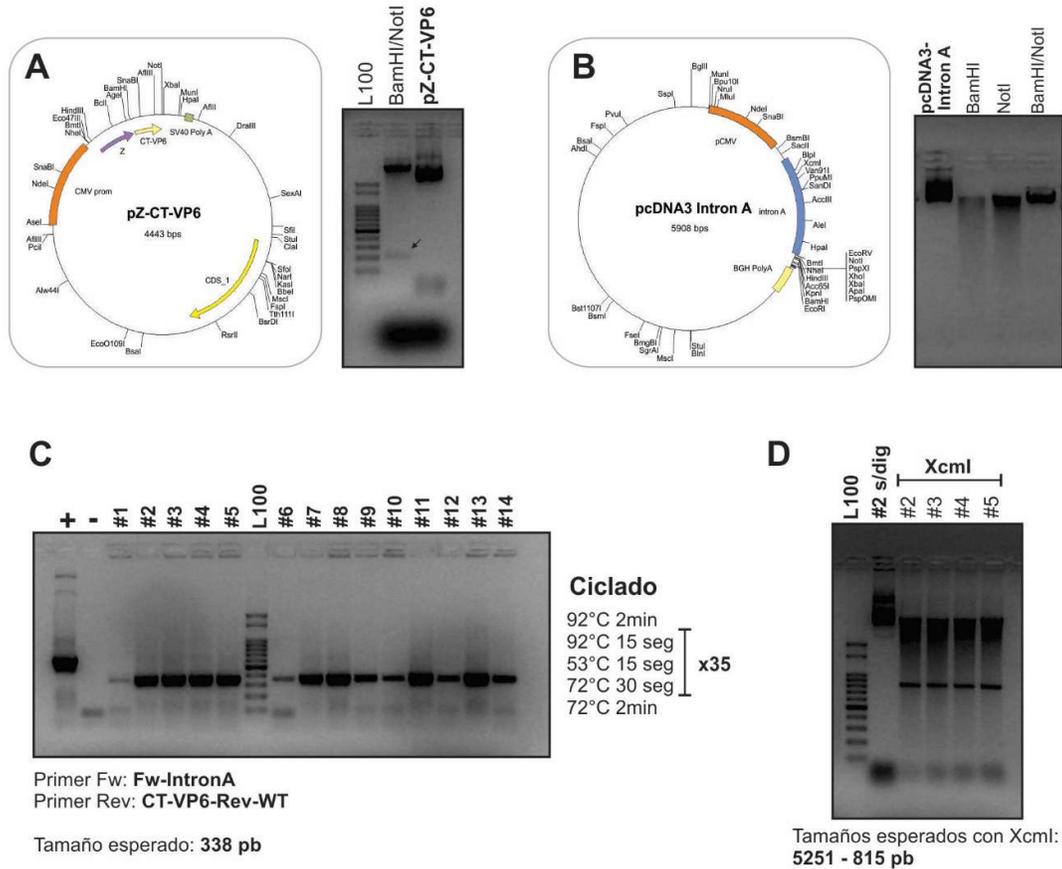
Para comenzar con la construcción del vector pIntA-Z-CT-VP6, se realizó la digestión de pZ-CT-VP6 y pcDNA3.1-Intron A con las enzimas NheI y NotI. Los fragmentos liberados de esta reacción fueron purificados del gel de agarosa por *GeneClean* y luego utilizados para el evento de ligación (**figura 4.6 B**). Cuatro clones al azar fueron analizados por *colony PCR* (**figura 4.6 D**), mapa de restricción con las enzimas SphI y NdeI/Agel (**figura 4.6. E**) y confirmada su identidad por secuenciación automática.



**Figura 4.6: Clonado de Z-CT-VP6 en el plásmido pcDNA3.1-IntronA. A** Esquema del vector pZ-CT-VP6. **B.** Electroforesis en gel de agarosa de la digestión enzimática de pZ-CT-VP6 y pcDNA3.a-IntronA con NheI y NcoI. Los fragmentos resaltados en rojo fueron purificados del mediante *genecllean*, para su posterior uso. **C.** Esquema del vector pcDNA3.1-Intron A. **D.** Resultado del *Colony* PCR de 4 colonias al azar utilizando los *primers* Fw-IntronA y CT-VP6-WT. **E.** Mapa de restricción de las colonias seleccionadas, utilizando las enzimas Sphel y NdeI/Agel. En la región inferior de la imagen se encuentra señalado el patrón de bandasesperado para cada enzima utilizada. L400 corresponde al *Ladder*400pb (Productos Bio-lógicos SA).

**Clonado de CT-VP6 en pcDNA3.1-Intron A (plntA-CT-VP6)**

Luego de obtener el plásmido plntA-Z-CT-VP6, se realizó la construcción plntA-CT-VP6 (sin fusión a Z). Se realizó un *GeneClean* del inserto liberado con las enzimas BamHI y NotI (208pb) y del vector pcDNA3.1- IntronA previamente digerido (**figura 4.7 A y B**).



**Figura 4.7: Clonado de CT-VP6 en el plásmido pcDNA3.1-IntronA.** **A** Esquema del vector pZ-CT-VP6, junto con la digestión del mismo con BamHI y NotI. **B.** Esquema del vector pcDNA3.1-IntronA, junto con la digestión del mismo con BamHI y NotI. **C.** Electroforesis en gel de agarosa del *colony* PCR de 14 colonias al azar con los *primers* Fw-Intron-A y Ct-VP6-Rev-WT. **D.** Mapa de restricción de las colonias #2, #3, #4 y #5 con la enzima XcmI.

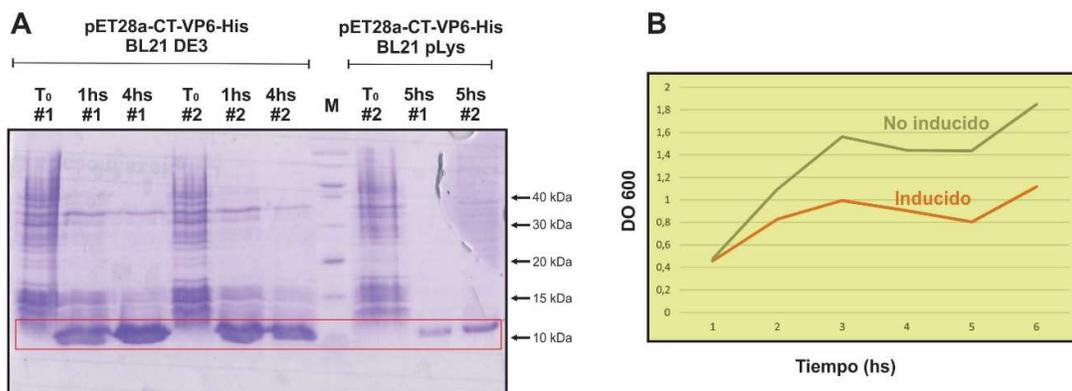
Los clones obtenidos se evaluaron por *colony PCR* (**figura 4.7 C**) y mapa de restricción con la enzima XcmI (**figura 4.7 D**). Los clones positivos deberían liberar dos bandas de 5251pb y 815pb.



**Figura 4.8: Clonado del péptido 368-397 fusionado a Z en pcDNA3.1-Intron A.**  
**A** Esquema correspondiente a la hibridación de los oligonucleótidos sintéticos largos con extremos parciales compatibles con el producto de digestión de las enzimas BamHI y NotI. **B.** Esquema del vector pIntA-Z-CT-VP6 junto al producto de digestión del mismo con las enzimas BamHI y NotI. **C.** Colony PCR de 14 clones al azar, con los *primers* Fw-Intron-A y CT-VP6-Rev-WT. **D.** Mapa de restricción de los clones #7 y #10, utilizando la enzima Sphel, junto con el patrón de bandas esperado para los clones positivos. L50 corresponde al *Ladder* 50 b de Productos Bio-lógicos.

#### 4.1.3 Expresión de CT-VP6-His en *E. Coli*

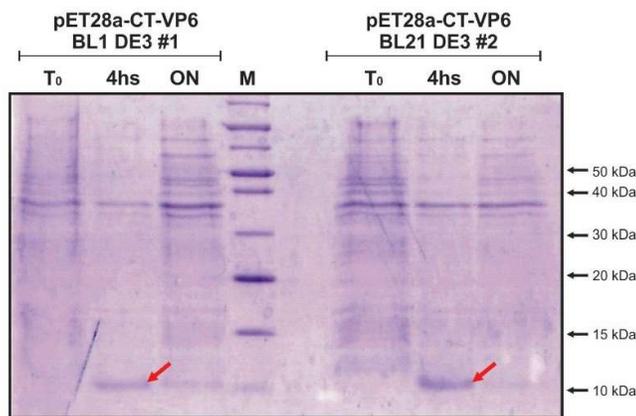
Con el objetivo de obtener la proteína CT-VP6-His pura para los posteriores ensayos de inmunización, se evaluó la expresión de la misma utilizando el vector pET28a(+)-CT-VP6-His #3 en *E. Coli* cepa BL21 DE3 y BL21 pLys. En la **figura 4.9 A** se observa el resultado de la cinética de expresión para la proteína CT-VP6-His (9 kDa) en dos clones de las cepas BL21 pLys y BL21 DE3, con una inducción de IPTG 1mM final. En el recuadro rojo de la figura se muestra la región donde se espera obtener la sobreexpresión de CT-VP6-His, siendo ésta significativamente mayor en la cepa BL21 DE3 que en la BL21 pLys. En consecuencia, se continuó trabajando en la cepa BL21 DE3. Por otro lado, en la **figura 4.9 B** se muestra un gráfico de crecimiento, medido por DO<sub>600</sub>, en función del tiempo de un cultivo de pET28a(+)-CT-VP6-His #3 en *E. Coli* cepa BL21 DE3 inducido y no inducido. En el mismo se observa un retardo en el crecimiento del cultivo inducido con respecto al no inducido, probablemente como consecuencia del gasto energético involucrado en la sobreexpresión de CT-VP6-His.



**Figura 4.9: Expresión de CT-VP6 en *E. Coli*.** **A.** SDS-PAGE del resultado de la cinética de expresión de CT-VP6-His de dos clones seleccionados al azar en *E. Coli* BL21 DE3 y BL21 pLys. El recuadro rojo indica la zona correspondiente al

peso molecular donde se espera observar la banda de sobreexpresión. (M) corresponde al marcador de peso molecular *PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder*, (Thermo). **B.** Cinética de crecimiento (medido por  $DO_{600}$ ) en función del tiempo (en horas), de un clon inducido vs. no inducido, de pET28a(+)-CT-VP6-His #3 en *E. Coli* BL21 DE3.

Para evaluar si mayores tiempos de expresión, resultaban en una mayor producción de CT-VP6-His, se evaluó la inducción de dos clones en la cepa BL21 DE3 luego de 4 hs y 16 hs (*overnight*, ON). El resultado mostrado en la **figura 4.10** evidencia que la expresión de CT-VP6-His es óptima luego de 4 hs, dado que en la condición de 16 hs, la presencia de la proteína parece estar disminuida.



**Figura 4.10: Expresión de CT-VP6 en *E. Coli*.** SDS-PAGE de dos clones de pET28a-CT-VP6-His#3 inducidos, luego de 4hs y 16hs (ON). Las flechas rojas indican la sobreexpresión de cada cultivo luego de 4 hs.

A partir de los resultados detallados previamente en la **figura 4.9** y la **figura 4.10**, se seleccionó como condición de expresión 4 horas de expresión a 37°C utilizando 1mM de IPTG en la cepa BL21 DE3.

#### 4.1.4 Lisis celular

Luego de optimizar la expresión, fue necesario evaluar la solubilidad de CT-VP6 en diferentes condiciones de lisis. Para esto se evaluaron rupturas celulares, químicas biológicas y físicas, las cuales se encuentran detalladas en el capítulo 2 de Materiales y Métodos (página 33)

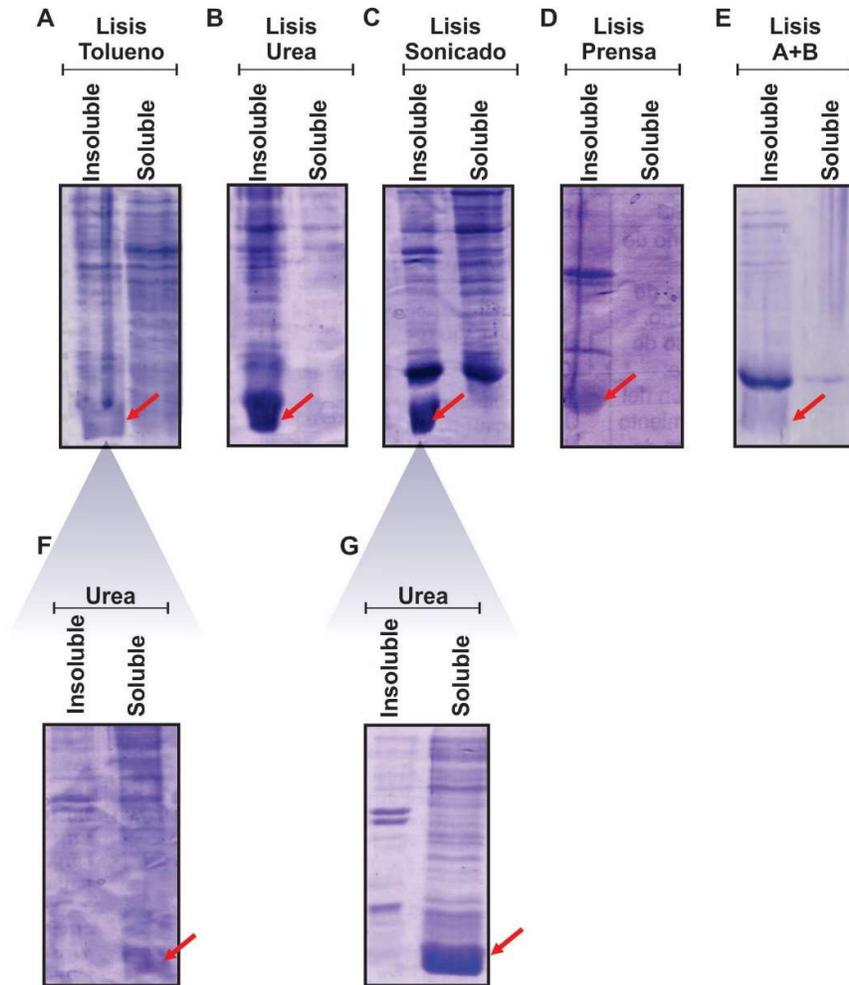
### ***Lisis por métodos químicos***

De modo de realizar una permeabilización química, se evaluó un protocolo de ruptura basado en solventes orgánicos, en particular, tolueno (Robert *et al.*, 1965). El fundamento del mismo se basa en una permeabilización suave de la membrana plasmática, de manera que la misma no se destruye, sino que colapsa formando poros por donde las proteínas del citoplasma son liberadas al medio sin afectar significativamente su conformación nativa. Como se observa en la **figura 4.11 A** una proporción de la proteína CT-VP6-His se encuentra en la fracción soluble, sin embargo al escalar el volumen de cultivo, para obtener mayor cantidad de proteína, la lisis no fue eficiente ni reproducible (datos no mostrados).

Por otro lado, también se evaluó un protocolo de lisis química utilizando Urea. En este caso el caótrolo desnatura las proteínas de membrana mediante la interrupción de la estructura del agua, lo que resulta en el debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas, logrando así la desestabilización de la membrana plasmática. Como resultado de este tipo de lisis, la mayoría de las proteínas presentes en la muestra son desnaturalizadas (**figura 4.11 B**). En el caso de CT-VP6-His no fue posible su correcta solubilización, aún en presencia de Urea.

### ***Lisis por método enzimático***

La lisis mediante métodos enzimáticos se basa en la utilización de enzimas proteolíticas específicas de algunos de los componentes de la membrana celular, como lisozima, proteinasa K, lipasas, entre otras. En este caso se evaluó un protocolo de lisis A+B, donde se utilizó una solución conteniendo detergente y Lisozima para obtener una lisis celular controlada. En este trabajo en particular, este protocolo no resultó muy adecuado, debido a que el peso molecular de la Lisozima (14,3kDa) se confunde con el de la proteína de interés, dificultando la visualización de CT-VP6-His en las electroforesis de geles de poliacrilamida (**figura 4.11 E**). De igual manera, según lo observado en la **figura 4.11 E**, CT-VP6 resulta en su mayoría en la fracción insoluble



**Figura 4.11: SDS-PAGE de los diferentes protocolos de lisis celular evaluados. A.** Lisis con *buffer* tolueno, **B.** Lisis con *buffer* de Urea, **C.** Lisis por sonicación, **D.** Lisis por *French Press*. **E.** Lisis con *buffer* A+B. **F.** Solubilización de la fracción insoluble obtenida en (A), mediante la utilización de un *buffer* con Urea. **G.** Solubilización de la fracción insoluble obtenida en (C), mediante la utilización de un *buffer* con Urea. Las flechas rojas indican la presencia de la proteína CT-VP6-His.

### ***Lisis por métodos físicos***

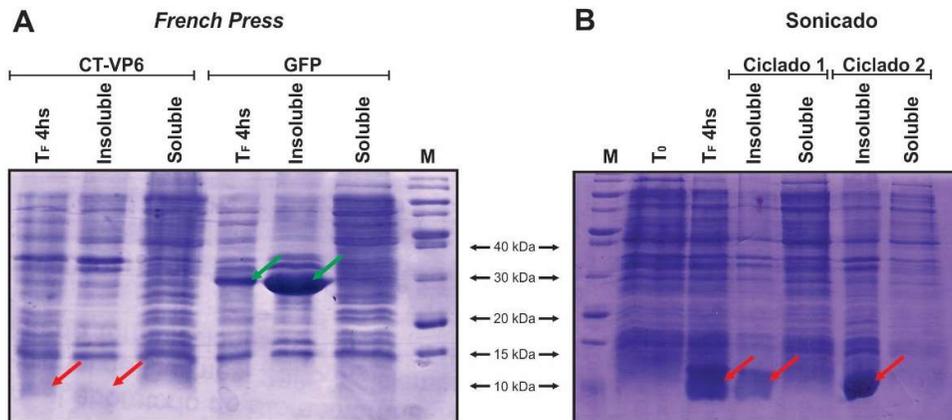
La ruptura celular por métodos físicos es ampliamente utilizada, pero poseen algunas desventajas. Dado que las células sufren una ruptura completa, todos los materiales intracelulares se liberan al medio, lo que produce una mezcla de componentes solubles más compleja y viscosa, como producto de la liberación de los ácidos nucleicos. Por otro lado, métodos de ruptura mecánicos exponen las células y su

contenido a condiciones extremas de temperatura y/o presión, produciendo en muchos casos la desnaturalización del producto.

En este trabajo se evaluó la lisis celular mediante ultrasonido (**figura 4.11 C**). Se estudiaron dos tipos de ciclados, por un lado el ciclado denominado 1, donde se utilizó un *buffer* 50 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 8,2; 300 mM de NaCl; 20 mM imidazol. El mismo se utilizó en una proporción de 50 ml de *buffer* por pellet correspondiente a 1 litro de cultivo bacteriano luego de 4 hs de expresión, con 5 ciclos de sonicación durante 3 minutos, con 50% de potencia y 30 segundos de pausa entre cada ciclo. Por otro lado, el ciclado denominado 2, utilizado en la misma proporción, corresponde a la utilización del *buffer*  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM, NaCl 30 mM,  $\beta$ -mercaptoethanol 10 mM y Tween 20 0.2% con 3 ciclos de 30 segundos al 50% de potencia, con 40 segundos de pausa (**figura 4.12 B**). Como se observa en la **figura 4.12 B**, en ambas condiciones CT-VP6-His se encuentra en la fracción insoluble, aunque el ciclado 1 resulta en una ruptura celular significativamente mayor, con respecto al ciclado 2., evidenciado por la presencia de mayor cantidad de proteínas totales en la fracción soluble.

De manera de obtener datos cuantitativos de la ruptura celular por sonicación, utilizando el ciclado 1, se realizó una medición de las proteínas totales presentes en la fracción soluble, entre cada pulso (**figura 4.13**). Estos datos son una medida indirecta de la eficiencia de la ruptura celular a cada ciclo.

Por otro lado se evaluó un método físico mecánico, el cual rompe la membrana plasmática de las células a través del pasaje de las mismas por una válvula estrecha a alta presión (*French Press*) (**figura 4.11 D**). Este último método fue evaluado también para células de *E. Coli* DH5 $\alpha$  expresando la proteína GFP, de manera de comparar la eficiencia respecto a las células que expresan CT-VP6-His (**figura 4.12 A**). En ambos casos, las proteínas de interés resultaron mayoritariamente en la fracción insoluble.



**Figura 4.12: Lisis celular por métodos físicos.** **A.** SDS-PAGE de la ruptura celular por *French Press* de los cultivos correspondientes a la expresión de CT-VP6-His y GFP. **B.** Resultado de la ruptura bacteriana por sonicado del cultivo correspondiente a la expresión de CT-VP6-His, utilizando el ciclado 1 y el 2. En ambos casos se incluyó una muestra correspondiente al cultivo previo a la lisis (Tf 4hs)



**Figura 4.13. Ruptura celular por sonicado.** Medición de proteínas totales (mg/ml) en la fracción soluble luego de cada ciclo de sonicación, utilizando el ciclado denominado 1.

### ***Lisis por método mixto***

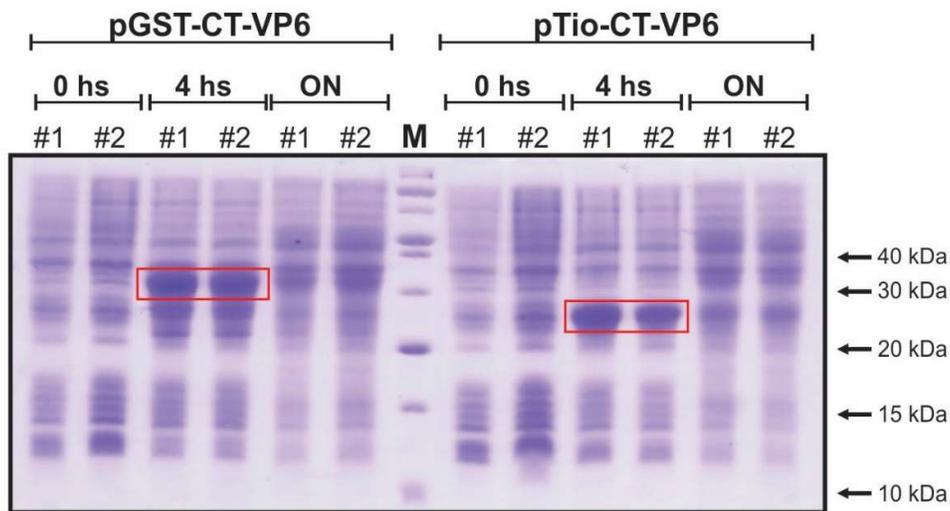
A partir de los resultados obtenidos para la evaluación de los métodos de ruptura celular, donde en todos los casos evaluados la proteína CT-VP6-His fue encontrada en la fracción insoluble, se decidió realizar una ruptura por un método mixto. El mismo consistió en la solubilización de la fracción insoluble obtenida por la lisis química con

tolueno (**figura 4.11 A**) y la obtenida por sonicación (**figura 4.11 C**), mediante la utilización de una solución de Urea 8M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM y Tris-Cl 10mM en agitación, durante 16 hs (**figura 4.11 F y G**).

El método seleccionado como óptimo para la obtención de CT-VP6 soluble, fue la combinación del método por sonocado seguido de la resuspensión de la fracción insoluble utilizando un buffer de Urea 8M.

#### 4.1.5. Expresión de Tio-CT-VP6-His y GST-CT-VP6 en *E. Coli*

Como alternativa a la expresión de CT-VP6-His en *E. Coli*, se obtuvieron los vectores pTio-CT-VP6-His y pGST-CT-VP6 para la expresión de Tio-CT-VP6-His (23,9kDa) y GST-CT-VP6 (33,8kDa), respectivamente. Si bien fue posible producir a la proteína CT-VP6-His, se ensayó la expresión de las construcciones alternativas para su posible utilización en ensayos futuros.



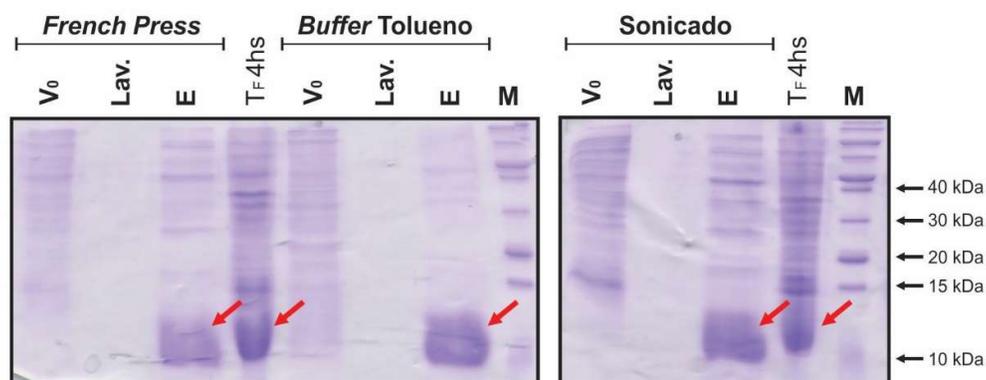
**Figura 4.14:** SDS-PAGE de la cinética de expresión de pGST-CT-VP6 y pTio-CT-VP6-His en *E. Coli* BL21 DE3, a las 0hs, 4hs y 16hs (ON) para dos clones seleccionados al azar cada construcción. Los recuadros rojos indican las bandas de sobreexpresión para cada vector.

Como se muestra en la **figura 4.14**, luego de 4hs de expresión es posible observar las bandas de sobreexpresión correspondientes a cada construcción, con el peso esperado para cada una de las proteínas. Y al igual que sucedía con CT-VP6-His, luego de 16hs de expresión la proteína no se observa con gran intensidad.

#### 4.1.6. Purificación de CT-VP6-His

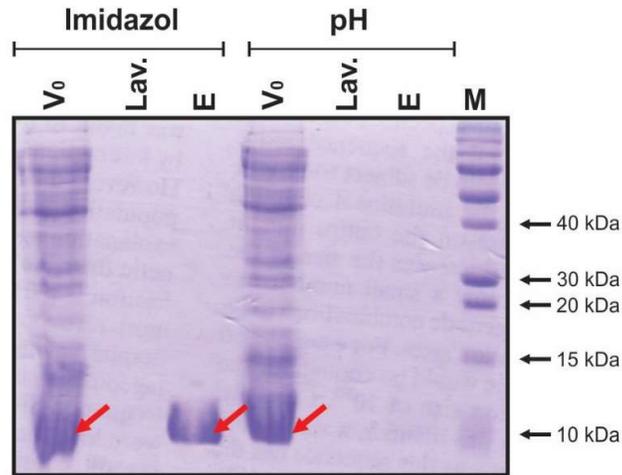
La purificación de CT-VP6-His se llevó a cabo a partir de la expresión de pET28a(+)-CT-VP6-His #3 en *E. Coli* BL21 DE3, utilizando una resina de Ni<sup>+2</sup>(IMAC, Qiagen). Si bien se ensayó la purificación por cromatografía en columna, la cinética de unión de la proteína a la matriz requería del uso de flujos de corrida muy bajos. Por este motivo, y para maximizar la eficiencia de purificación se continuó trabajando en *batch*.

Como se mencionó previamente en la sección 4.1.4., la proteína CT-VP6-His obtenida por los diferentes métodos de ruptura celular se encontró mayoritariamente en la fracción insoluble. Sin embargo, se decidió ensayar la purificación de la proteína nativa a partir de las fracciones solubles, a pesar de que esta tuviera un bajo rendimiento global (**figura 4.15**). En los tres casos evaluados (*French Press*, *buffer* tolueno y sonicado) se logró purificar CT-VP6-His, sin embargo el rendimiento fue muy bajo, teniendo en cuenta las futuras aplicaciones.



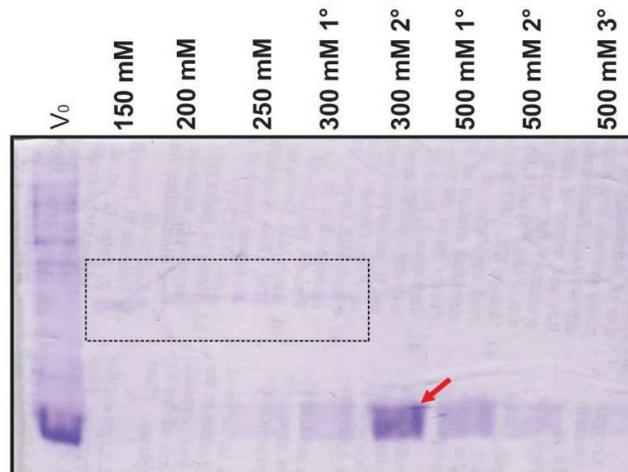
**Figura 4.15:** SDS-PAGE correspondiente a la purificación de CT-VP6-His por IMAC en *batch*, a partir de las fracciones solubles obtenidas por *French Press*, Lisis con *buffer* Tolueno y Sonicación. (V<sub>0</sub>) Volumen no retenido en la resina IMAC, (Lav.) lavado de la resina con PBS, (E) Elución con 500mM de imidazol, (T<sub>F</sub> 4hs) muestra correspondiente al pellet del cultivo luego de 4hs de expresión.

Por otro lado, a partir de la muestra insoluble luego del sonicado y solubilizada con Urea, se purificó mediante resina IMAC y se analizó la elución de CT-VP6-His con Imidazol y cambio de pH (**figura 4.16**). En la misma se puede observar que la condición de 300mM de Imidazol es capaz de eluir la proteína de la matriz, mientras que el cambio de pH de 8 a 4,5 no logra separar la proteína adsorbida de la matriz.



**Figura 4.16:** SDS-PAGE de la evaluación de dos condiciones de elución, a partir de la proteína CT-VP6-His retenida en la matriz. Una condición es el cambio de concentración de Imidazol de 20mM a 300mM, mientras que la segunda condición es el cambio de pH de 8 a 4,5. Las flechas rojas señalan la proteína CT-VP6-His.

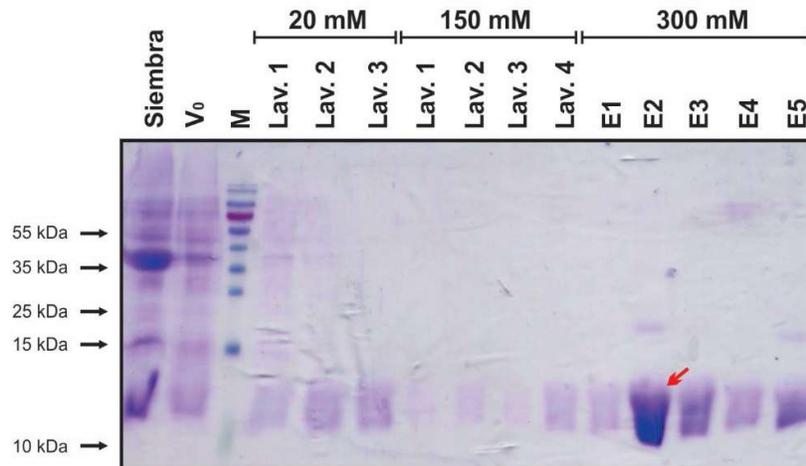
Para analizar la concentración de Imidazol mínima necesaria para la elución de CT-VP6-His, se evaluaron concentraciones crecientes del reactivo, sobre una resina previamente incubada con el lisado del cultivo (**figura 4.17**). En la misma se observa que a concentraciones de Imidazol menores a 300 mM se evidencia la presencia de proteínas no específicas (recuadro), mientras que a partir de concentraciones mayores a 300 mM de Imidazol comienza la elución de CT-VP6-His, sin la visualización de otras proteínas.



**Figura 4.17:** Electroforesis en gel de poliacrilamida del análisis de las condiciones de elución de CT-VP6-His. V<sub>0</sub> representa el volumen no retenido en la matriz,

mientras que las concentraciones de Imidazol se muestran en la figura (desde 150mM a 500mM). La flecha roja indica la condición de mayor elución, mientras que en el recuadro se señala la presencia de algunas proteínas inespecíficas.

Una vez analizados todos los parámetros de purificación, se realizó el escalado de la expresión y aislamiento de CT-VP6-His. El resultado del mismo se muestra en la **figura 4.18** donde se evidencia la purificación de la proteína CT-VP6-His.

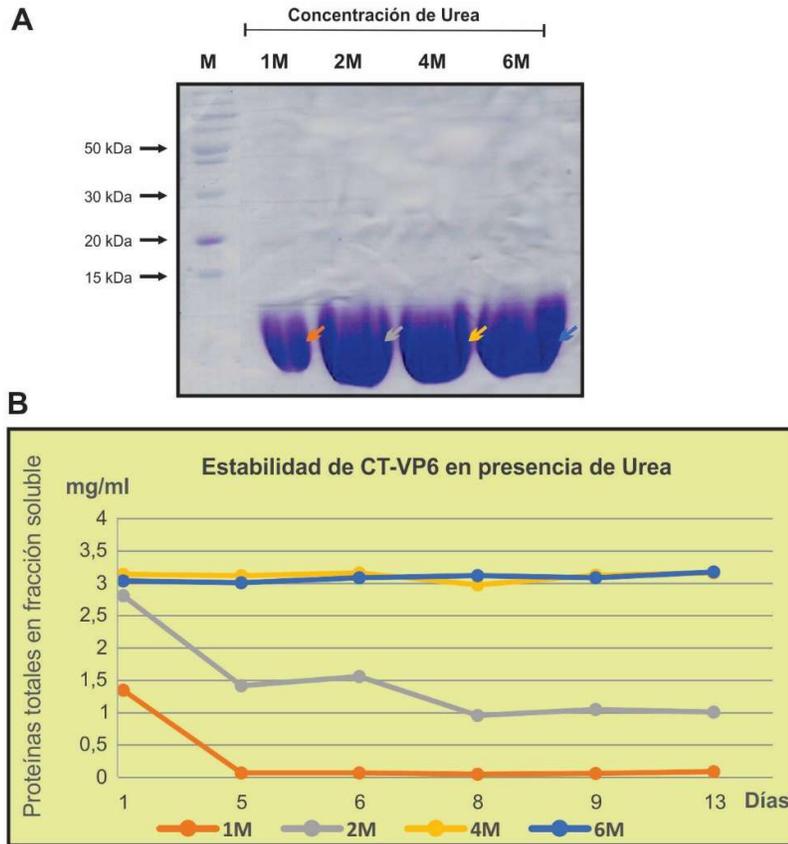


**Figura 4.18:** SDS-PAGE de la purificación de CT-VP6-His por IMAC en *batch*. En la parte superior de la figura se indican las concentraciones de Imidazol utilizadas en cada condición. La flecha roja indica la muestra de mayor concentración de CT-VP6-His. (M) corresponde al marcador de peso molecular *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, (Thermo).

#### 4.1.7. Estabilidad de CT-VP6-His purificada

Si bien se logró obtener CT-VP6-His purificada, la misma contiene en su fracción de elución Urea 8M. Debido a que la misma será utilizada en ensayos de inmunización en ratones, se desea que la misma posea la menor cantidad de caótrofo posible (menor a 1M, “*Methods and procedures of antibody production (rabbits, rats and mice) by University of Massachusetts Animal Care Staff*”). Por este motivo se analizó la elución de la proteína en presencia del *buffer* de elución con distintas concentraciones de caótrofo (1M, 2M, 4M y 6M) (**figura 4.19 A**). Como se observa en la figura es posible la elución de la proteína en todas las condiciones ensayadas. Sin embargo luego al transcurrir el tiempo se observó que algunas de las condiciones presentaban un

precipitado. Por este motivo, se analizó la estabilidad de la proteína en el buffer de elución correspondiente, a través de la medición de proteínas totales solubles en cada muestra (**figura 4.19 B**). Se observa que a menor concentración de Urea, la solubilidad en el tiempo de la proteína era menor. En función de estos resultados, se continuó trabajando con el *buffer* de elución de Urea 4M, dado que en esta condición la proteína no disminuía su proporción soluble en función del tiempo.

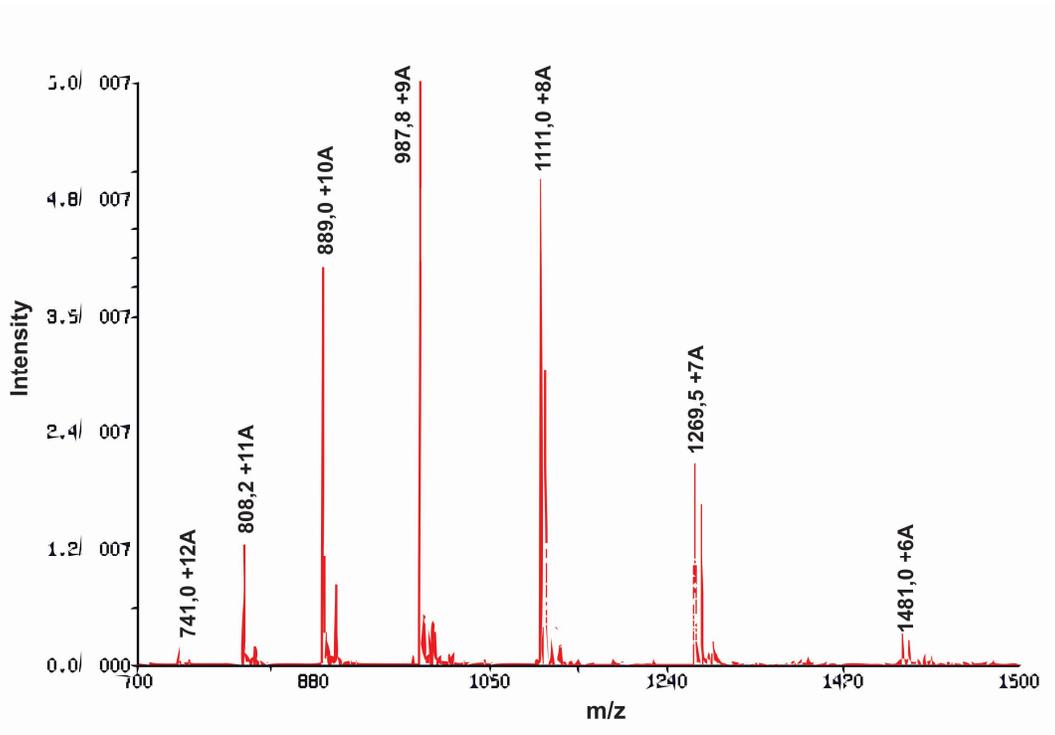


**Figura 4.19:A.** SDS-PAGE de la elución de CT-VP6-His de la matriz de Ni<sup>2+</sup> con buffers de elución con concentraciones variantes de Urea (1M, 2M, 4M y 6M). Cada elución se indica con una flecha del color correspondiente al utilizado en el siguiente gráfico. **B.** Gráfico de estabilidad en función del tiempo, representado por la medición de proteínas totales solubles (mg/ml) en función de los días transcurridos a 4°C.

#### 4.1.8. Análisis por espectrometría de masa

Como consecuencia del bajo peso molecular de la proteína CT-VP6-His, la resolución obtenida a partir de la electroforesis en geles de poliacrilamida no permite afirmar la pureza de la muestra o la coincidencia con el peso molecular esperado. Es por este

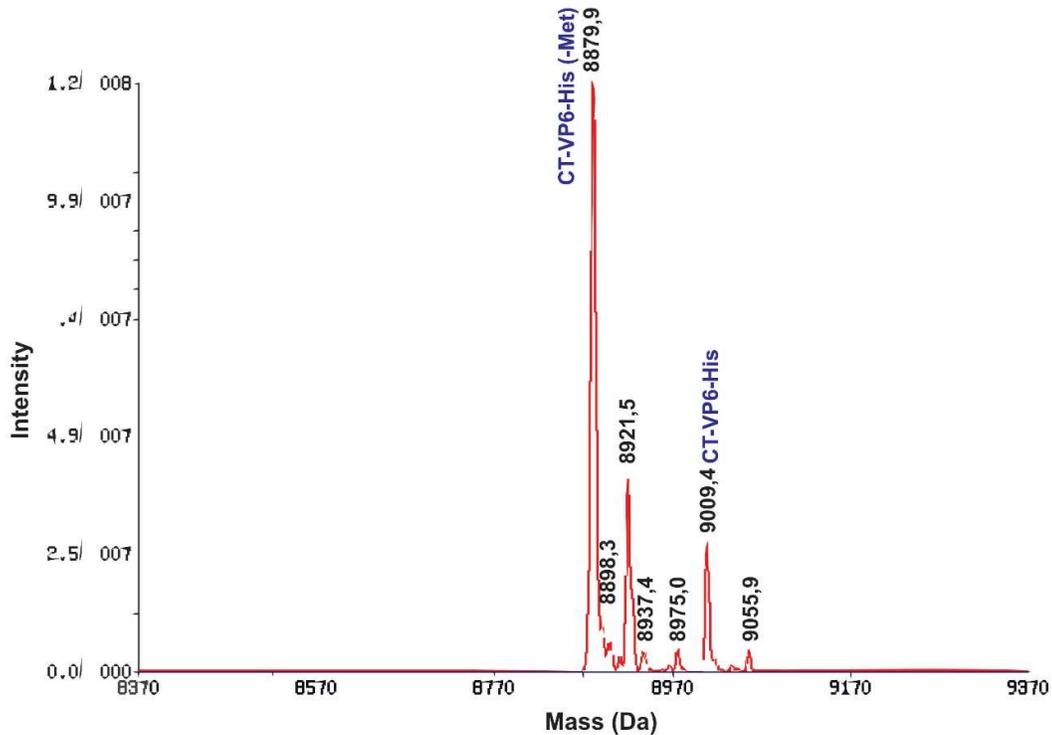
motivo, que en este trabajo se decidió realizar un análisis por espectrometría de masa que permita confirmar la pureza e identidad de la muestra, a partir de la fracción purificada por IMAC en *batch*.



**Figura 4.20** Espectro de masa ESI de la proteína purificada CT-VP6, donde se representa la intensidad de los picos en función de la relación m/Z.

En la **figura 4.20** se muestra el espectro de masa ESI, donde se observa el perfil de ionización de la proteína. La misma presenta un pico mayoritario para cada ionización, siendo este un perfil típico de ionización para una proteína pura. Por otro lado, a partir de los datos deconvolucionados del espectro ESI, es posible calcular el peso molecular de la misma. Si bien el peso molecular teórico estimado para la proteína CT-VP6-His es de 9009,2 Da, la figura 4.21 presenta un pico mayoritario de peso molecular estimado de 8879,9 Da, y un pico minoritario de 9009,4 Da (**figura 4.21**). Este último, es coincidente con el peso teórico de CT-VP6-His, aunque la diferencia entre el peso molecular del pico mayoritario de 9009,4 Da y el pico secundario, 8879,9 Da, podría explicarse como la escisión de la metionina inicial de la proteína, lo cual representaría una pérdida de 132 Da. Esto es un mecanismo común en proteínas recombinantes expresadas en *E. Coli*, y se encuentra favorecido en presencia de una glicina adyacente (entre otros aminoácidos), como en el caso de CT-VP6-His (Hirel *et al.*, 1989, Ayala Bretón & de Regil Hernández 2004). Por otro lado los picos

minoritarios de 8921,5 y 9055,9 Da, podrían ser consecuencia de una acetilación de ambas formas proteicas (Zhang *et al.*, 2009).



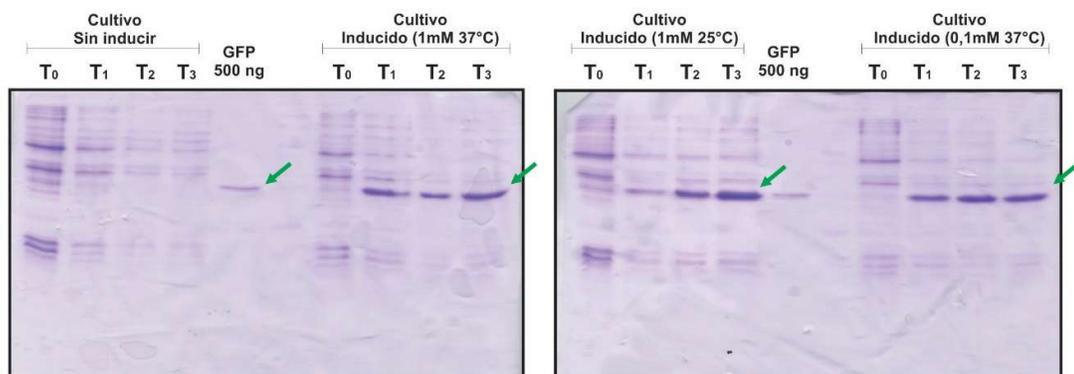
**Figura 4.21.** Espectro de masa deconvolucionado, donde se muestra la intensidad de la señal de cada pico, en función de la masa representada en Daltons. En azul se señala la posible identidad de cada pico, los cuales corresponderían a proteína CT-VP6-His y el producto de la misma sin la metionina inicial del péptido (CT-VP6-His-Met).

El análisis de espectrometría de masa indica la pureza de la muestra obtenida, dado que no se observa señal de picos correspondientes a pesos moleculares que no coincidan con el esperado, y confirma la identidad de la proteína purificada a partir de la coincidencia con el peso teórico esperado. Aunque es importante señalar que la proteína mayoritaria corresponde a CT-VP6-His con la pérdida de la metionina terminal.

## 4.2 Producción de GFP en *E. Coli*

### 4.2.1 Expresión de GFP

Con el objetivo de obtener GFP purificada para los ensayos de inmunización, se evaluó la expresión de GFP en *E. Coli* cepa DH5 $\alpha$  a partir del vector pQE-GFP-His (gentilmente cedido por el Dr. Marcos Bilen). Se analizaron 4 condiciones de expresión con el objetivo de optimizar la eficiencia de producción: 1mM IPTG a 37°C, 1mM IPTG a 25°C, 0,1mM IPTG a 37°C, y un control sin inducir (**figura 4.22**). Como se observa en la figura, las tres condiciones de inducción evidenciaron un buen nivel de expresión de la proteína de interés. Se escogió la condición de IPTG 1mM a 37°C, durante 4 horas, para los siguientes ensayos.



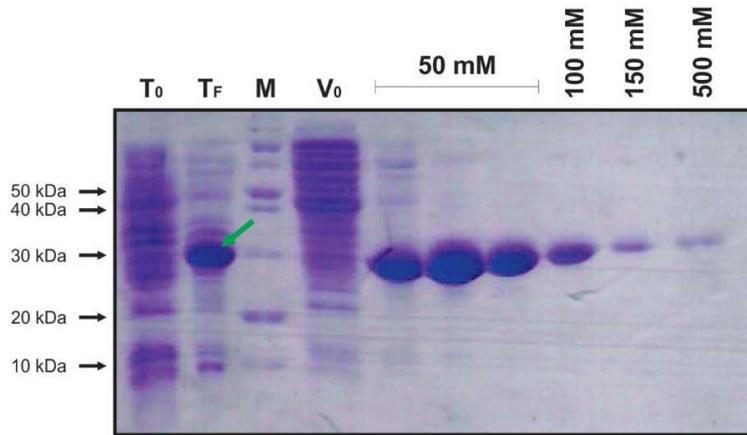
**Figura 4.22:** SDS-PAGE del resultado de la puesta a punto de la expresión de GFP. Se evaluaron las condiciones 1mM IPTG a 37°C, 1mM IPTG a 25°C, 0,1mM IPTG a 37°C, y un control sin inducir; tomando muestras a las 0hs (T<sub>0</sub>), 1hs (T<sub>1</sub>), 2hs (T<sub>2</sub>) y 4 hs (T<sub>3</sub>). Como patrón del peso molecular esperado se utilizó 500ng de proteína GFP previamente purificada en nuestro laboratorio.

### 4.2.2. Purificación de GFP

A partir de la fracción celular del cultivo se realizó una ruptura por sonicación en el *buffer* NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM pH 8,2; NaCl 300mM e imidazol 20mM con 3 ciclos de 30 segundos al 50% de potencia del equipo, con 40 segundos de pausa entre cada ciclo. La fracción soluble obtenida luego de centrifugar el lisado celular fue utilizada para los posteriores pasos de purificación por cromatografía de afinidad, IMAC.

Se seleccionó una estrategia de purificación en *batch* con matriz de agarosa unida a Ni<sup>+2</sup> (Qiagen), en condiciones nativas, es decir sin la presencia de agentes caotrópicos. En la **figura 4.23** se muestra el resultado correspondiente al escalado de la expresión y la posterior purificación, con eluciones de Imidazol desde 50mM a

500mM. Mientras que en la **tabla 4.1** se muestra la cuantificación de proteínas totales y actividad (RFU) de cada paso de la purificación de GFP.



**Figura 4.23:** SDS-PAGE del escalado de la expresión de GFP y su posterior purificación en *batch*. La flecha verde indica la banda de sobreexpresión obtenida. Mientras que en la parte superior de la figura se indican las concentraciones de Imidazol de cada muestra evaluada.

Operación	Volumen (ml)	Actividad Enzimática (RFU/ml)	Proteínas Totales (mg/ml)	Actividad Específica (RFU/mg)
<b>Fracción soluble</b>	25	1825,1	14,92	122,3
<b>E1 50mM</b>	1	6257,1	2,73	2292,0
<b>E2 50mM</b>	1	9310,6	1,45	6421,1
<b>E3 50mM</b>	1	5492,2	0,6	9153,7
<b>E4 100mM</b>	1	2333,8	0,23	10147,0
<b>E5 150mM</b>	1	648,7	0,06	10811,7

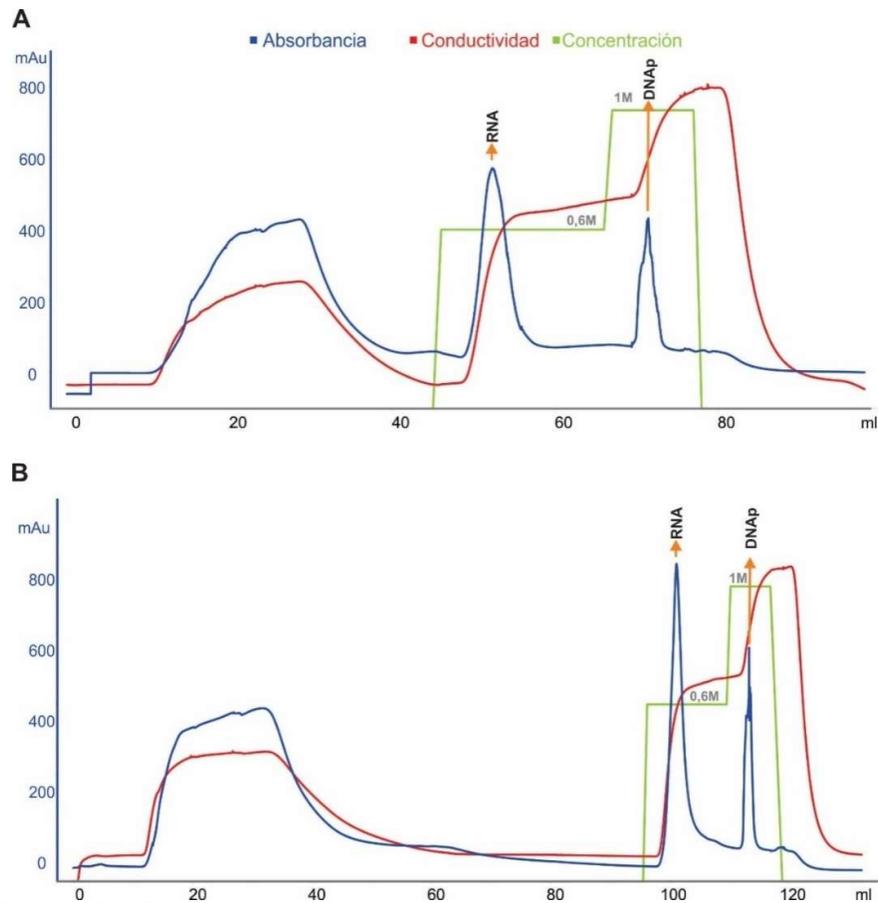
**Tabla 4.1** Cuantificación de proteínas totales y actividad enzimática de cada paso de la purificación de GFP.

### 4.3. Producción de plásmidos ultrapuros

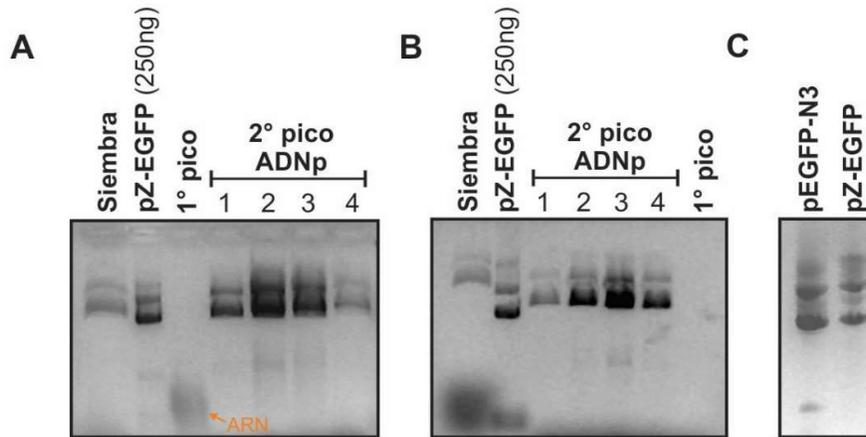
Para la obtención de plásmidos a una escala mayor, para ser utilizados en los ensayos de inmunización en animales, se utilizó el método de lisis alcalino (*Midiprep*) seguido de diferentes métodos de purificación: cromatografía de intercambio iónico débil, DEAE ó extracción orgánica /PEG8000. Ambos protocolos se encuentran detallados en el capítulo 2 de Materiales y Métodos (página 32)

### 4.3.1. Cromatografía de intercambio iónico DEAE

Para la purificación de plásmidos mediante cromatografía se utilizó una columna de DEAE de 1ml (BIA *Separations*), la cual fue sembrada con el producto de la lisis bacteriana de un cultivo expresando el plásmido de interés (pZ-EGFP y pEGFP-N3). El perfil cromatográfico obtenido para cada plásmido se muestra en la **figura 4.24**, junto con una electroforesis en gel de agarosa de las fracciones en la **figura 4.25**.



**Figura 4.24:** Perfil cromatográfico de la purificación plasmídica por columna de intercambio iónico DEAE de los plásmidos pEGFP-N3 (A) y pZ-EGFP (B). En ambos casos el lavado y la elución se realizaron mediante cambios en la conductividad del *buffer* (línea verde), es decir mediante cambios en la concentración de NaCl. La línea azul representa los valores de absorbancia, medidos en mAu a 280nm, mientras que la conductividad del *buffer* se señala con la línea roja (mS/cm). Con flechas naranjas se indican los picos correspondientes al ARN y a ADN plasmídico.



**Figura 4.25:** Electroforesis en gel de agarosa de las fracciones correspondientes a la purificación plasmídica por columna de intercambio iónico DEAE del vector pZ-EGFP (A) y del vector pEGFP(B). (C) Purificación de los vectores pZ-EGFP y pEGFP mediante PEG-8000.

#### 4.3.2. Extracción orgánica/PEG8000

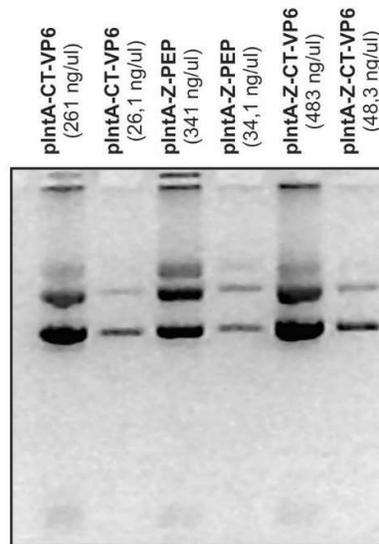
A partir del ADN obtenido mediante el método de lisis alcalina se purificó el ADNp mediante una extracción orgánica con cloroformo seguido de una precipitación con polietilenglicol (PEG) 8000, a partir de los mismos cultivos antes detallados (pZ-EGFP y pEGFP). El resultado obtenido se muestra en la **figura 2.24 C**, mientras que en la **tabla 4.2** se indican los valores cuantitativos para la purificación correspondiente a pEGFP.

	Cultivo (ml)	Elución ( $\mu\text{g}$ totales)	Precipitación ( $\mu\text{g}$ totales)	Rendimiento ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ cultivo)
<b>Ext. Org.+ PEG 8000</b>	23	-	315	13,7
<b>DEAE</b>	19	429,4	383,4	20,2

**Tabla 4.2.** Datos cuantitativos de la purificación del vector pEGFP, mediante las técnicas de extracción orgánica + PEG800 y DEAE.

Mediante absorbancia a 260<sub>nm</sub> y 280<sub>nm</sub>, se evaluó que la calidad de ambas preparaciones en cuanto a la presencia de proteínas. La misma fue equivalente para ambos métodos (>1,8), sin embargo a partir de los datos cuantitativos se observó que el rendimiento global del método por columna de DEAE fue 47% mayor que el basado en la extracción orgánica y precipitación con PEG8000.

Teniendo en cuenta la cantidad de ADNp a utilizar, los costos y el tiempo, para las siguientes preparaciones (pIntA-CT-VP6, pIntA-Z-PEP y pIntA-Z-CT-VP6), se continuó trabajando con el método de extracción orgánica + PEG8000 (**figura 4.26**).

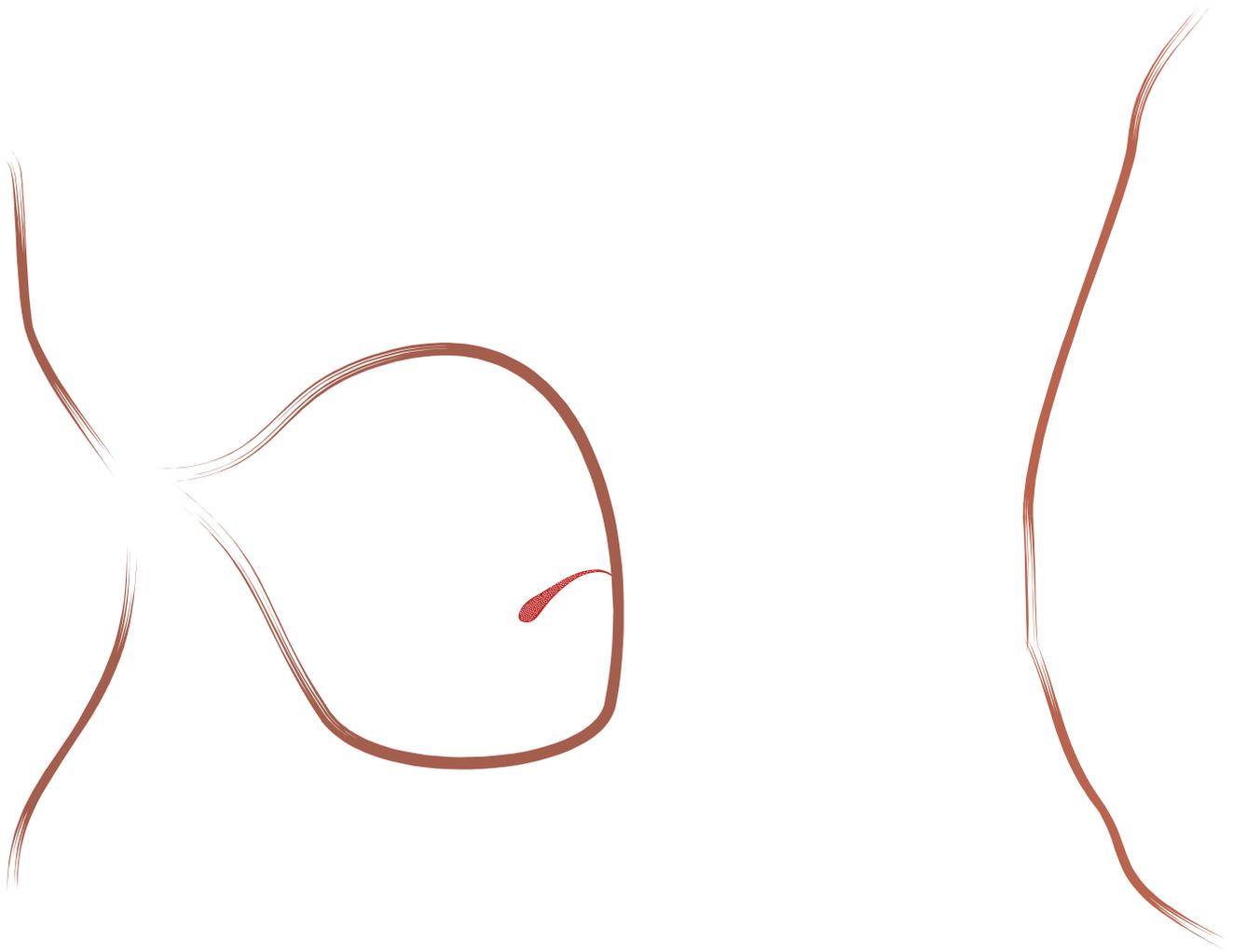


**Figura 4.26:** Purificación de los vectores pIntA-CT-VP6, pIntA-Z-PEP y pIntA-Z-CT-VP6 mediante extracción orgánica y precipitación con PEG8000.



# CAPÍTULO 5

## ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

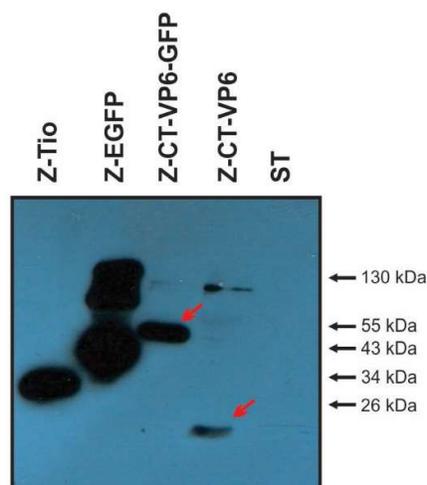




## 5. ESTUDIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

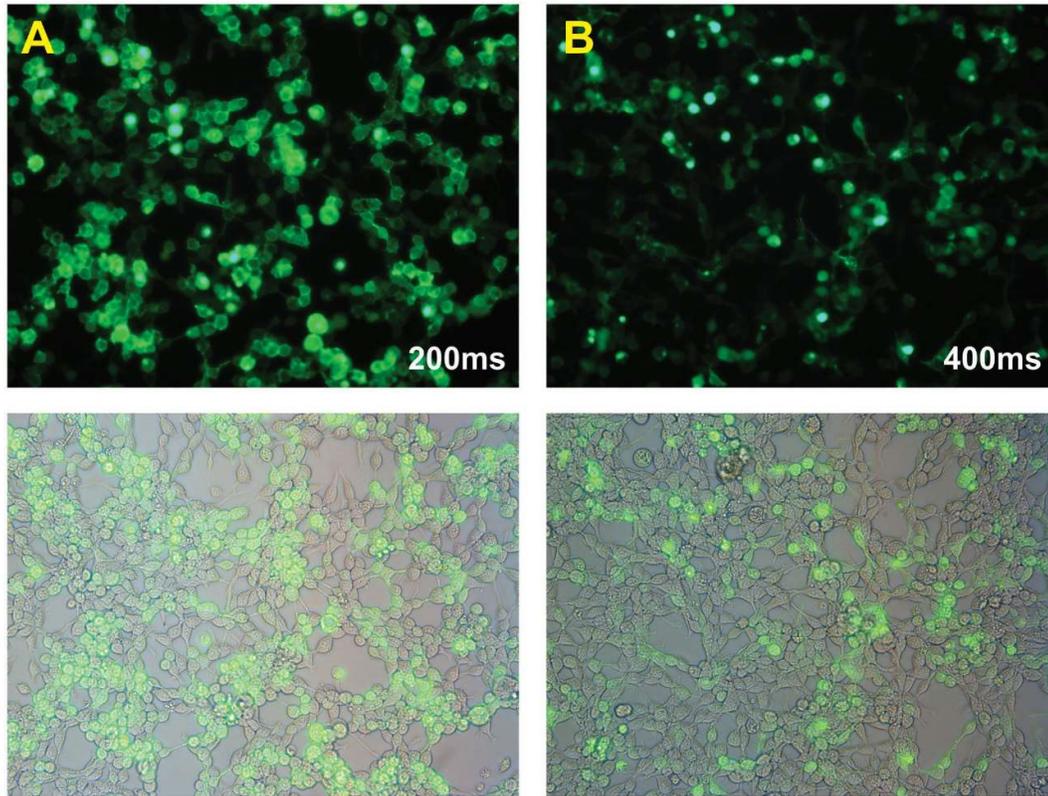
### 5.1. Estudios *In vitro*

De manera de comprobar la funcionalidad de los vectores construidos para la expresión de CT-VP6 en células de mamífero, se transfectaron células de mamífero COS-7, con los plásmidos pIntA-Z-CT-VP6 (para la expresión de CT-VP6) y pZ-CT-VP6-GFP (para la expresión de CT-VP6-GFP, previamente obtenido en nuestro laboratorio). Mediante *western blot*, utilizando anticuerpos anti Z, se analizó la expresión de cada proteína de fusión. Como se observa en la **figura 5.1** fue posible observar expresión de Z-CT-VP6 (17,9 kDa) y Z-CT-VP6-GFP (45,3 kDa). Ésta última proteína de fusión fue construida con el objetivo de evaluar la localización celular, y si la presencia del dominio CT-VP6 ó GFP afectaba la normal localización de Z (**figura 5.2**).



**Figura 5.1.** *Western Blot* con anticuerpos  $\alpha$ -Z de la fracción celular correspondiente a la transfección de pZ-CT-VP6 y pZ-CT-VP6-EGFP. Como control positivo del ensayo de transfección se utilizó el vector pZ-EGFP, el cual codifica para la proteína Z-EGFP de 37,8kDa, Como positivo del ensayo de inmunodetección se utilizó la proteína Z-Tio purificada (27,3 kDa), mientras que se utilizó como control negativo células COS-7 sin transfectar (ST).

A partir de esta metodología de fluorescencia, no se detectan diferencias significativas entre Z-EGFP (utilizada como control de la localización celular de Z) y Z-CT-VP6-GFP, en cuanto a su distribución, aunque si se observan diferencias significativas en el nivel de expresión. Sin embargo, es necesario realizar estudios más detallados utilizando microscopía confocal para poder determinar la localización celular con certeza (**figura 5.2**).



**Figura 5.2.** Microscopía de fluorescencia de células COS-7 transfectadas con pZ-GFP (A) expuestas a 200ms y pZ-CT-VP6-GFP (B) expuestas a 400ms:

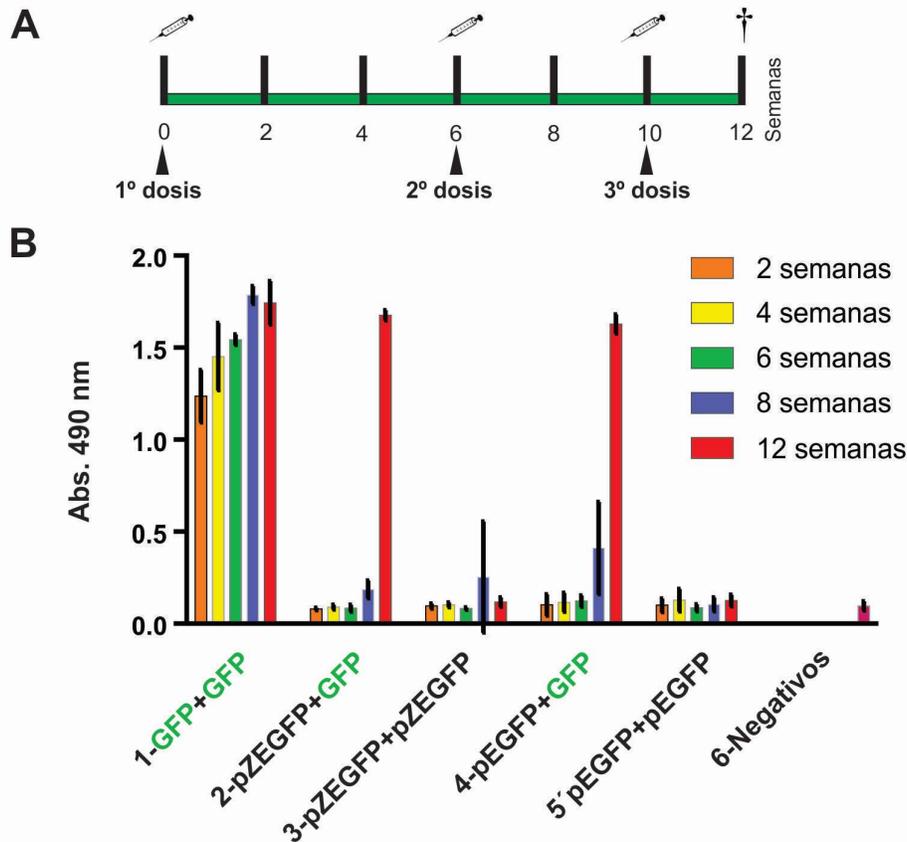
## 5.2. Estudios *in vivo*

Para evaluar la capacidad de estimulación de la respuesta inmune del sistema de vehiculización de antígenos basado en la proteína Z, para el dominio terminal de VP6, se realizaron ensayos de inmunización en ratones Blab/C de 6 -8 semanas. Los mismos fueron realizados en colaboración con el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Nacional de Quilmes (Lic. Marcelo Arguelles) y con la ayuda de la Dra. Leticia Bentancor.

### 5.2.1. Ensayo de inmunización en ratones para GFP

En trabajos previos, utilizando la proteína E de Dengue vehiculizada con Z, nuestro grupo de trabajo había demostrado que una estrategia de inmunización en ratones mixta, basada en ADN y proteína purificada, era capaz de generar altos títulos de anticuerpos contra uno de los péptidos evaluados y neutralizar la entrada viral *In vitro* (Mareze *et al.*, 2015). En este trabajo se estableció un protocolo de inmunización

similar, inoculando el vector para la expresión del antígeno de interés fusionado a la proteína Z, y luego un refuerzo del antígeno soluble purificado a las 6 semanas. Se utilizaron como adyuvante de la dosis de ADN, al monofosforil lípido A (MPLA) y como adyuvante del antígeno proteico al adyuvante incompleto de Freud (INF).



**Figura 5.3** Ensayo de inmunización en ratones para el antígeno GFP. **A.** Esquema de inmunización. **B.** ELISA para la detección de IgG $\alpha$ -GFP a partir de los sueros obtenidos (en una dilución 1/100) de las sangrías de las semanas 2, 4, 6, 8 y 12. En el eje Y se señala la absorbancia a 490 nm, de cada sangría correspondientes a cada grupo (eje X). Los colores de la leyenda indican la semana de cada sangría, y en letras verdes se indican las inmunizaciones con el antígeno proteico soluble GFP.

De manera de realizar la puesta a punto del esquema de inmunización y confirmar así la efectividad de la metodología propuesta se realizó un primer ensayo utilizando como antígeno a la proteína GFP fusionada a Z. Este sistema fue previamente utilizado y evaluado en trabajos anteriores en nuestro laboratorio, por lo que se tenía información previa sobre la estimulación de la respuesta inmune a partir de VLPs quiméricas de Z-

EGFP (Borio *et al.*, 2012). Se utilizaron los vectores codificantes para las proteínas Z-GFP (pZ-EGFP) y GFP (pEGFP-N3), y la proteína GFP previamente purificada, según el esquema de inmunización mixto (ADN y proteína) detallado en la **figura 5.3 A**. El mismo se encuentra descrito en el capítulo de Materiales y métodos (página 36), adaptado del esquema utilizado en Mareze *et al.*, 2015

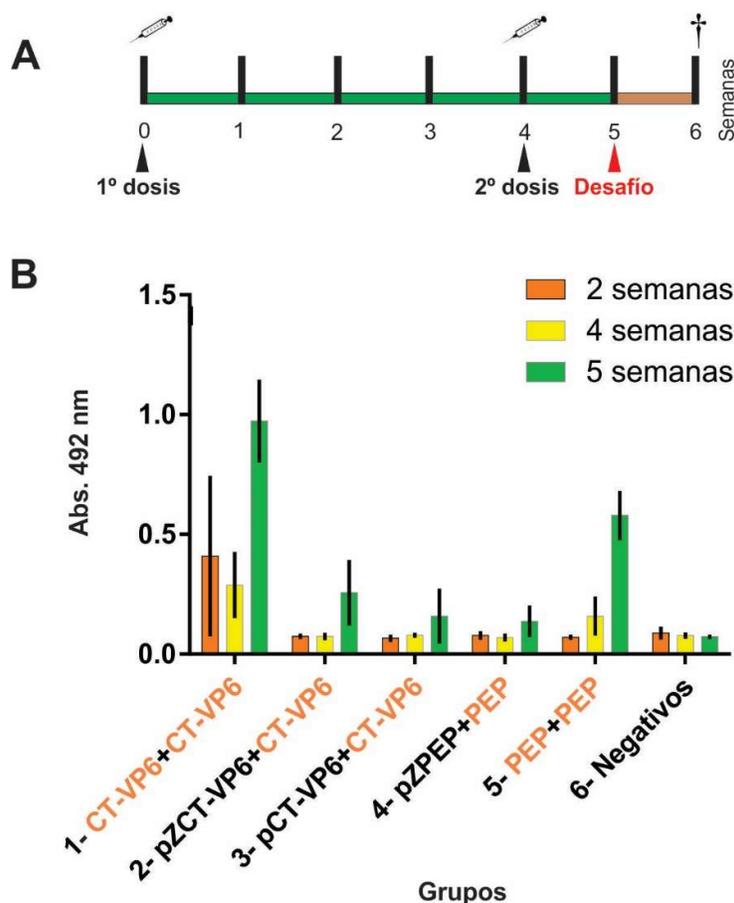
Durante el periodo del ensayo se tomaron muestras de sangre cada semana, y se realizó un ELISA para la detección de Inmunoglobulinas de tipo G  $\alpha$ -GFP a partir del suero obtenido. Como se observa en la **figura 5.3 B**, el grupo 5 obtuvo una señal similar a la del grupo control negativo (grupo 6), evidenciando que la expresión de GFP-Z a partir del ADN inoculado no es capaz de despertar respuesta humoral detectable. Del mismo modo, el grupo 3 no desarrolló respuesta contra el antígeno GFP vehiculizado en las VLPs quiméricas a partir de la expresión del ADN codificante. Por otro lado los grupos 2 y 4 tuvieron un comportamiento similar, donde se logró respuesta luego de la 3<sup>er</sup> dosis con antígeno puro. Y por último, como se esperaba para la proteína GFP pura (grupo 1), se evidenció una respuesta significativa contra el antígeno desde la 1<sup>er</sup> dosis.

### **5.2.2. Ensayo de inmunización en ratones para CT-VP6**

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo de inmunización para el antígeno GFP, se realizó el diseño del esquema de inmunización para CT-VP6, al cual se incluyó una etapa de desafío contra Rotavirus murino cepa EC.

Para esto se utilizaron, por un lado, los vectores pIntA-Z-CT-VP6 (para la expresión de fusión Z-CT-VP6), pIntA-CT-VP6 (para la expresión de CT-VP6 sin fusión a Z) y la proteína purificada CT-VP6.

Por otro lado, teniendo en cuenta trabajos previos que demuestran que el sistema de vehiculización de pequeños péptidos basado en Z es capaz de estimular la repuesta inmune en ratones (Mareze *et al.*, 2015), se ensayaron los vectores pIntA-Z-PEP (para la expresión de Z fusionada al péptido 368-397) y el péptido sintético PEP 368-397

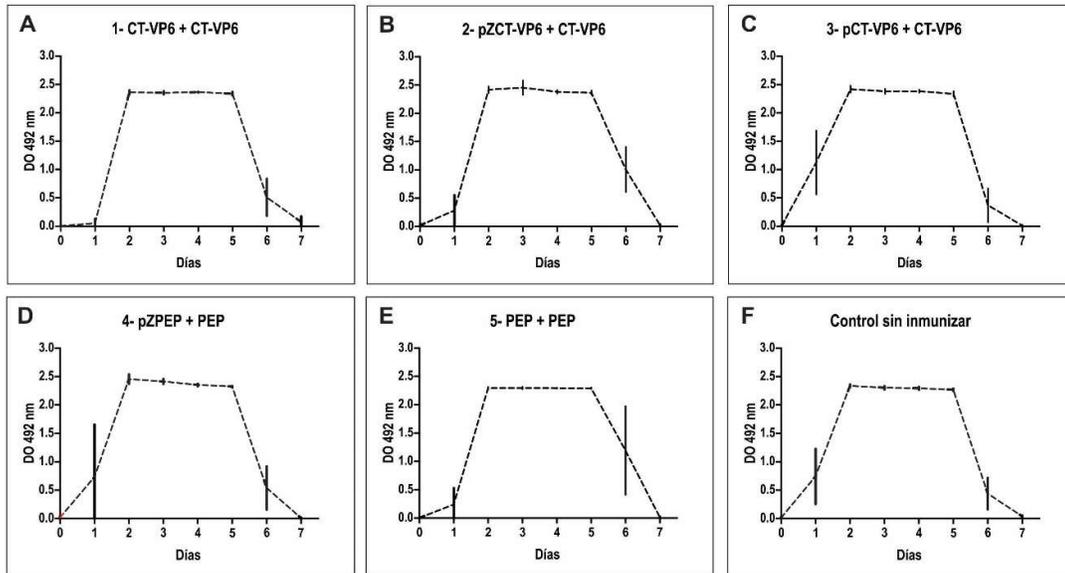


**Figura 5.4** Ensayo de inmunización en ratones para el antígeno CT-VP6. **A.** Esquema de inmunización, donde el fragmento marrón indica la recolección de las heces de los individuos. **B.** ELISA para la detección de IgG $\alpha$ -CT-VP6 a partir de los sueros obtenidos (en una dilución 1/100) de las sangrías de las semanas 2, 4, 6. En el eje Y se señala la absorbancia a 490nm, de cada sangría correspondientes a cada grupo (eje X). Los colores de la leyenda indican la semana correspondiente a cada sangría. En letras naranjas se indican las inmunizaciones correspondientes al antígeno proteico soluble CT-VP6 o PEP 369-397.

Al igual que en el primer ensayo de inmunización, se realizó la sangría de los animales en las semanas 2, 4 y 5, y a partir de los sueros obtenidos se realizó un ELISA para la detección de IgG $\alpha$ -CT-VP6 (**figura 5.4**). En el mismo se observó una respuesta humoral significativa para el grupo 1, inmunizado en ambas dosis con proteína soluble CT-VP6, y una menor pero significativa respuesta en el grupo 5, inmunizado en ambas ocasiones con el péptido 368-397 soluble. En los grupos 2, 3 y 4, los cuales tuvieron

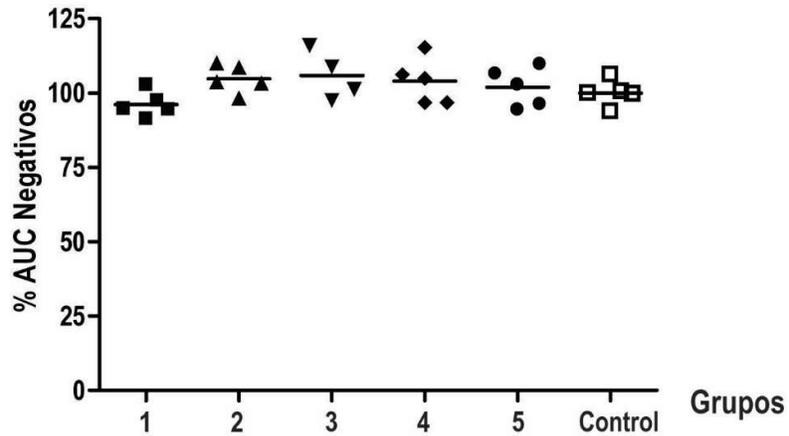
una primer dosis de ADN, se vió una baja pero significativa respuesta en la última sangría, previa al desafío.

Para evaluar de manera indirecta la respuesta celular, se realizó un desafío de los grupos de ratones a la 5<sup>ta</sup> semana con Rotavirus murino cepa EC, seguido de la medición de virus excretado en las heces de los individuos durante los 7 siguientes días (**figura 5.5**). En todos los casos evaluados se observaron curvas de excreción similares, con los máximos de excreción entre los días 2 y 5.



**Figura 5.5. Curvas de excreción promedio por grupo.** Titulación de virus por ELISA de captura, utilizando suero policlonal de cabra anti-rotavirus. En el eje Y se representa la absorbancia a 492nm, mientras que en el eje X se señalan los días posteriores al desafío de los animales. La titulación se realizó para el grupo 1- CT-VP6 + CT-VP6 (**A**), grupo 2- pZCT-VP6 + CT-VP6 (**B**), grupo 3- pCT-VP6 + CT-VP6 (**C**), grupo 4- pZPEP + PEP (**D**), grupo 5- PEP + PEP (**E**) y el grupo control correspondiente a animales infectados, sin inmunización previa (**F**).

Otro modo de analizar el resultado obtenido de la titulación de virus posterior al desafío, es mediante el porcentaje de reducción del área bajo la curva para cada animal de cada grupo, con respecto al grupo “sin infectar”, el cual correspondería al 100% de protección (**figura 5.6**).



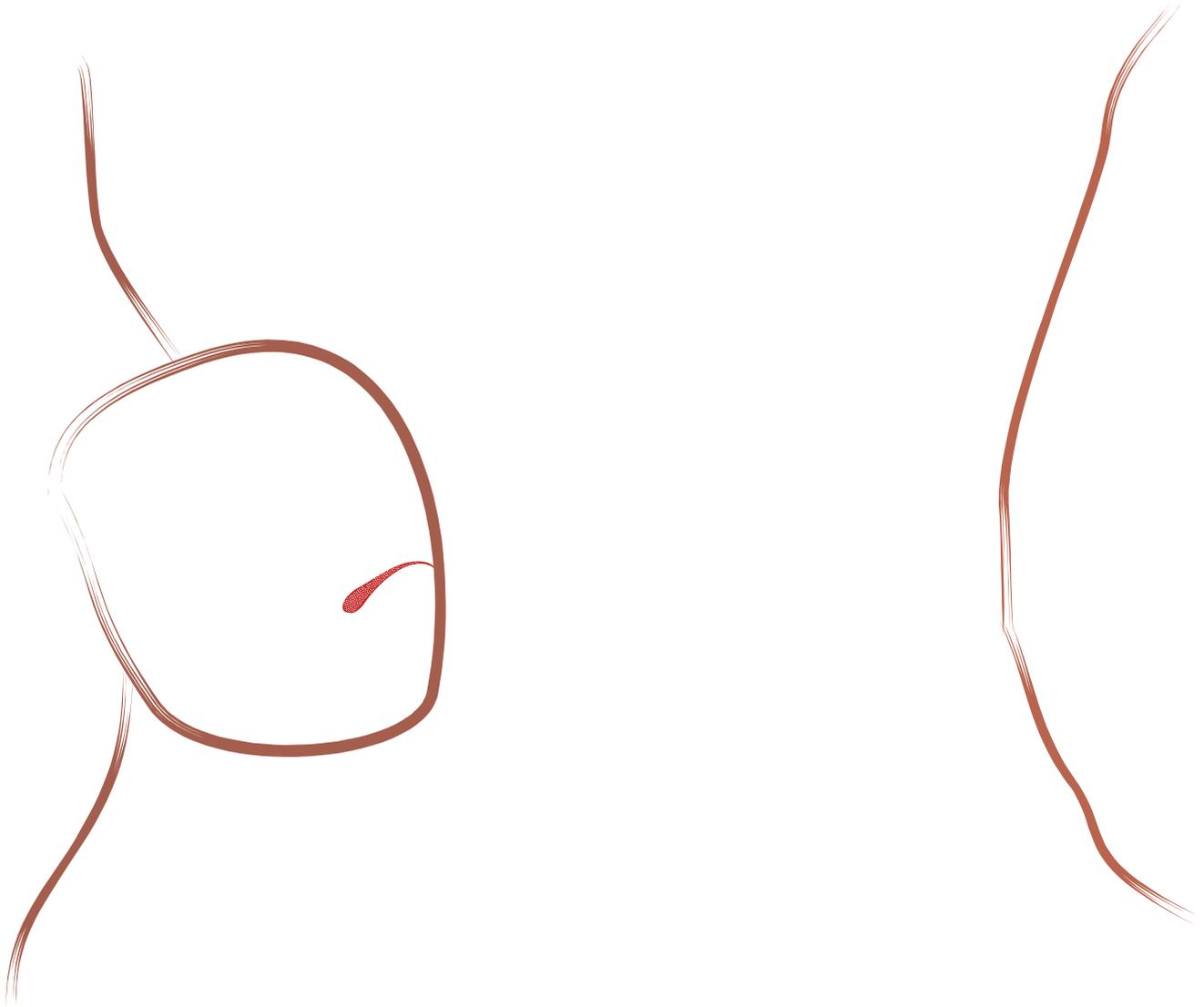
**Figura 5.6. Porcentaje de reducción del área bajo la curva (AUC), con respecto del grupo “sin infectar”, es decir el porcentaje de protección. El grupo control corresponde al grupo infectado sin inmunización previa.**

En ninguno de los casos se observó una diferencia significativa en la reducción del AUC, excepto una leve disminución en el grupo 1, lo que coincide con la respuesta humoral más elevada observada en el análisis por ELISA directo.



# CAPÍTULO 6

## DISCUSIÓN





## 6-DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Este trabajo tuvo como objetivo principal el desarrollo y evaluación de una vacuna contra rotavirus murino, basada en VLPs derivadas de la proteína Z del virus Junín conteniendo antígenos específicos del virus. El sistema propuesto, está basado en una vacuna a ADN que contiene la información para la expresión intracelular de la proteína Z fusionada a antígenos de VP6. Una vez que las moléculas de ADN ingresan al núcleo de la célula, comenzaría la transcripción y luego la traducción de la proteína de fusión Z-antígeno. A su vez, la presencia de Z induciría la brotación y liberación de VLPs, que luego estimularían el desarrollo de una respuesta inmune específica contra los antígenos contenidos en la vesícula.

Para la construcción y evaluación del sistema, en cultivos de células y en animales, se utilizó información de trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación y colaboradores. Sin embargo, y teniendo en cuenta las características intrínsecas del virus, para este trabajo fue necesario diseñar estrategias alternativas y generar nuevas herramientas para llevar a cabo el desarrollo del sistema.

Basados en la literatura e información preexistente del virus de Rotavirus murino, se escogió como antígeno de prueba a la proteína de la cápside intermedia de la partícula viral (VP6). Esta proteína es muy conservada entre los grupos de Rotavirus y la más abundante en la partícula viral. Particularmente, se escogió el dominio C-terminal de la misma, el cual fue descrito como uno de los más antigénicos. Conociendo que el sistema basado en VLPs de la proteína Z ha resultado exitoso en la estimulación de respuesta inmune al ser utilizado con pequeños péptidos, se decidió ensayar en paralelo con un dominio interno de la región C-terminal de VP6 (PEP 368-397, de 29 aminoácidos). A partir de la secuencia de los antígenos seleccionados se realizó un análisis bioinformático básico del perfil de hidrofobicidad y predicción de estructuras secundarias para complementar la información de la cual se disponía. Este análisis reveló que CT-VP6 presentaba un perfil mayoritariamente hidrofílico, lo que correspondería a regiones de la proteína expuestas en un ambiente acuoso, y podría estar asociada a su característica antigénica. Estos datos reforzaron los fundamentos de selección del antígeno.

Para la construcción del sistema, y evaluación del mismo, fue necesario obtener la proteína CT-VP6 pura. La misma sería utilizada en los ensayos con ratones, para realizar los refuerzos en la estrategia de inmunización. Y por otro lado, sería utilizada para la obtención de anticuerpos anti VP6.

Para poder expresar CT-VP6 de forma recombinante en *E. coli*, fue necesario optimizar los codones del gen *wild type*. Esto significaba la mutación de 56 nucleótidos, para lo que se diseñó y optimizó una estrategia de síntesis de genes *in vitro*. Se logró obtener el gen sintético y confirmar sus modificaciones mediante secuenciación, para que luego el mismo fuese utilizado como material de partida para posteriores clonados.

Para evaluar el mejor sistema de expresión en *E. coli* se clonó CT-VP6 en tres sistemas (pET, pTio y pGST), los cuales presentaban diferencias esencialmente en los promotores y dominios de purificación. Se obtuvo buenos niveles de expresión para los tres sistemas, aunque se continuó trabajando con pET, por una razón de costos, disponibilidad de reactivos en el laboratorio y tamaños del dominio de purificación.

Teniendo en cuenta la utilidad de CT-VP6 en los futuros ensayos de inmunización, se intentó purificar la proteína en condiciones nativas. Para esto se ensayaron varios métodos de lisis, aunque no se logró obtener la proteína de forma soluble. En vista de estos resultados, se decidió solubilizar los cuerpos de inclusión de CT-VP6 y purificar la proteína en condiciones desnaturalizante utilizando una matriz IMAC. A partir de esta estrategia se obtuvo CT-VP6 con un grado de pureza mayor al 98% (determinado por SDS-PAGE, y espectrometría de masa) y con un rendimiento global de 2,5 mg por litro de cultivo.

El análisis de la proteína CT-VP6 mediante espectrometría de masa reveló que la misma se encontraba mayoritariamente en dos formas. Una de ellas sin la metionina inicial, y la otra, en su versión completa. Este procesamiento ha sido previamente descrito como frecuente en proteínas expresadas en *E. coli*, especialmente en aquellas que presentan como segundo residuo (luego de la metionina) Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, Val ó Cys, como es el caso de CT-VP6. Por otro lado, se observó la existencia de una fracción de la proteína con una posible acetilación. De acuerdo a diferentes publicaciones, esta modificación es habitual para *E. coli* en los residuos de lisina con un contexto aminoacídico similar al de CT-VP6 (Val68, Lys69, Leu70).

El sistema propuesto en este trabajo consiste en una vacuna a ADN, siendo esta elección una decisión basada principalmente en los costos operativos y de producción de este tipo de vacunas, y en la flexibilidad del sistema para realizar modificaciones para futuras nuevas variantes virales. Por otro lado, en trabajos previos del LIGBCM-AVEZ se obtuvieron resultados prometedores utilizando esta estrategia con antígenos derivados de la proteína E del virus Dengue.

Por lo tanto, teniendo en cuenta las características del sistema propuesto, fue necesario optimizar un método de purificación de ácidos nucleicos, de manera de obtener el ADN

plasmídico correspondiente a los vectores construidos a gran escala y ultrapuro. Para esto se analizó un método convencional de purificación de ácidos nucleicos basado en extracción orgánica y posterior precipitación con PEG8000, y un método cromatográfico basado en resinas de DEAE. Ambas metodologías resultaron satisfactorias en cuanto a la calidad del ADNp obtenido. Sin embargo, la purificación mediante resina de DEAE permitió obtener un rendimiento 47% mayor al obtenido por extracción orgánica y posterior precipitación con PEG8000, junto con una mayor proporción del plásmido en su conformación superenrollada.

Previo al ensayo del sistema, en un modelo animal, fue necesario evaluar la funcionalidad de sus componentes en cultivo de células eucariotas. Para esto se realizaron ensayos de expresión transitoria utilizando los plásmidos que codifican para la expresión de las proteínas de fusión Z-CT-VP6 y Z-CT-VP6-EGFP. Mediante *western blot* fue posible comprobar la expresión de ambas proteínas en células COS7, pero no se pudo confirmar la expresión de CT-VP6 y Z-PEP368-397, como tampoco la presencia de VLPs en el sobrenadante de cultivo a partir de la transfección de pZ-CT-VP6 y pZ-PEP368-397. Por trabajos previos con otros antígenos sabemos que los niveles de expresión de Z fusionada a otra proteína varían dependiendo de las características del péptido (tamaño, carga, estructura), y de la línea celular utilizada. Debido a reparaciones en el equipo asociado a este ensayo no se pudo confirmar la presencia de VLPs a partir de la expresión de los plásmidos diseñados. Por otro lado, se debe tener en cuenta que la no detección de VLPs, utilizando *western blot*, no implica la ausencia real de las vesículas, y son necesarios ensayos complementarios como TEM, para confirmar este resultado.

Una vez obtenidas las herramientas y componentes necesarios para evaluar el sistema de vehiculización basado en Z en animales, se realizó la puesta a punto de la estrategia de inmunización con el antígeno GFP previamente evaluado en nuestro laboratorio. En este ensayo se evaluó al antígeno en un esquema mixto de inmunización, utilizando ADN codificante para la producción de VLPs quiméricas y el antígeno proteico puro (GFP) para realizarlos refuerzos. Esta estrategia basada en una vacuna a ADN, tiene como principales ventajas respecto a una vacuna de VLPs, la eliminación de la etapa de producción de las VLPs y la bioseguridad de las mismas. Las VLPs producidas en células eucariotas en cultivo poseen en su interior y en la membrana proteínas y otras moléculas derivadas de la célula hospedadora (Buonaguro *et al.*, 2011, Borio *et al.*, manuscrito en preparación), que podrían conllevar a efectos secundarios. Al utilizar ADN codificante para la producción de VLPs que contienen en su interior el antígeno de interés, las mismas son generadas dentro del individuo, eliminando la presencia de

componentes celulares heterólogos y disminuyendo la posibilidad de efectos no buscados.

Como resultado del ensayo con el antígeno GFP, se observó una elevada respuesta humoral en el control positivo de inmunización (con proteína pura en presencia de adyuvante). Los grupos 2 y 4, inmunizados con ADN y refuerzos con proteína soluble (GFP), evidenciaron respuesta luego del refuerzo con el antígeno soluble, lo que podría indicar que este asociada solo a este tipo de estímulo, y no de la dosis previa de ADN. Los grupos inmunizados exclusivamente con ADN no tuvieron respuesta, lo que es de esperar según lo expuesto en bibliografía y trabajos previos. Las vacunas a ADN suelen tener una mayor respuesta en protocolos de inmunización con refuerzos de antígenos puros, vectores virales o VLPs, (Grunwald & Ulbert, 2015). Por este motivo, en el siguiente esquema de inmunización evaluado, los grupos de inoculación exclusiva con ADN, no fueron incluidos.

En el segundo ensayo de inmunización, ahora utilizando el antígenos (CT-VP6, ó PEP 368-397) del virus Rotavirus, se realizaron modificaciones en el esquema de inmunización (se disminuyó el tiempo en la estrategia de inmunización) se incluyó una etapa de desafío contra el virus. Además, para evaluar distintos dominios del antígeno y el tamaño del mismo, se incluyó como segundo antígeno el péptido 368-397 (3,4 kDa). Nuevamente, se realizó un protocolo mixto de inoculación de ADN y luego refuerzo con antígenos solubles, se evaluó la estimulación de la respuesta inmune y la protección contra la infección del virus. Similar a lo observado para GFP, la mayor respuesta humoral obtenida fue a partir de la inmunización con CT-VP6 pura o, en segundo lugar con péptido puro. Sin embargo, en el grupo 2 inoculado con ADN para la producción de VLPs de Z-CT-VP6 y proteína pura CT-VP6, se observó diferencia significativa con respecto al grupo control. Nuevamente, no es posible determinar si esta señal es consecuencia de la dosis con ADN inicial o productos del refuerzo con proteína recombinante. Es necesario repetir los ensayos para obtener mayor certeza de los resultados obtenidos.

Por otro lado, en cuanto a la protección de la infección viral con Rotavirus murino EC luego de la inmunización, no se observó diferencias significativas con respecto al control en ninguno de los casos. Tampoco pudimos ver resultados positivos de protección con los grupos 1 y 5 (inoculación con antígeno CT-VP6 y PEP368-397, respectivamente), los cuales además de estimular respuesta humoral, estaban descriptos en bibliografía que eran capaces de disminuir la carga viral en las heces de los animales (Choi *et al.*, 2000). Esta diferencia observada con respecto a los autores mencionados, podría explicarse a partir de algunas diferencias realizadas en el protocolo de inmunización.

Una de ellas corresponde a la vía de administración de las dosis, en este trabajo se utilizó la vía intramuscular, mientras que en el artículo se aplicó la vía intranasal. Por otro lado, el antígeno recombinante utilizado en la publicación posee un agregado de secuencia heteróloga correspondiente al dominio de purificación MBP (*Maltose binding protein*), lo que facilitó la purificación del antígeno en condiciones nativas. Teniendo en cuenta que los grupos control (1 y 5) no se comportaron como tal, no podemos concluir respecto de la funcionalidad del sistema ensayado, y consideramos necesario repetir el experimento considerando las modificaciones del protocolo realizadas.

Por último, con respecto a lo observado en la estimulación de la respuesta humoral a partir del esquema de inmunización mixto con el péptido 368-397, no sería correcto asegurar que el sistema de vehiculización basado en Z no es apto para antígenos de Rotavirus. En el artículo de [Mareze et al., \(2015\)](#) donde se evaluaron antígenos del virus Dengue en este mismo sistema, se seleccionaron dos péptidos, uno de ellos tuvo como resultado la estimulación significativa de la respuesta humoral y producción de anticuerpos neutralizantes, mientras que el otro péptido no tuvo resultados significativos en ninguno de los dos casos. Esto indicaría la relevancia del antígeno seleccionado para el esquema de inmunización aplicado. Por otro lado, nos muestra que es necesario estudiar con mayor detalle las características de los antígenos usados para poder predecir los requerimientos mínimos necesarios para el buen funcionamiento del sistema de vehiculización.



# ANEXO



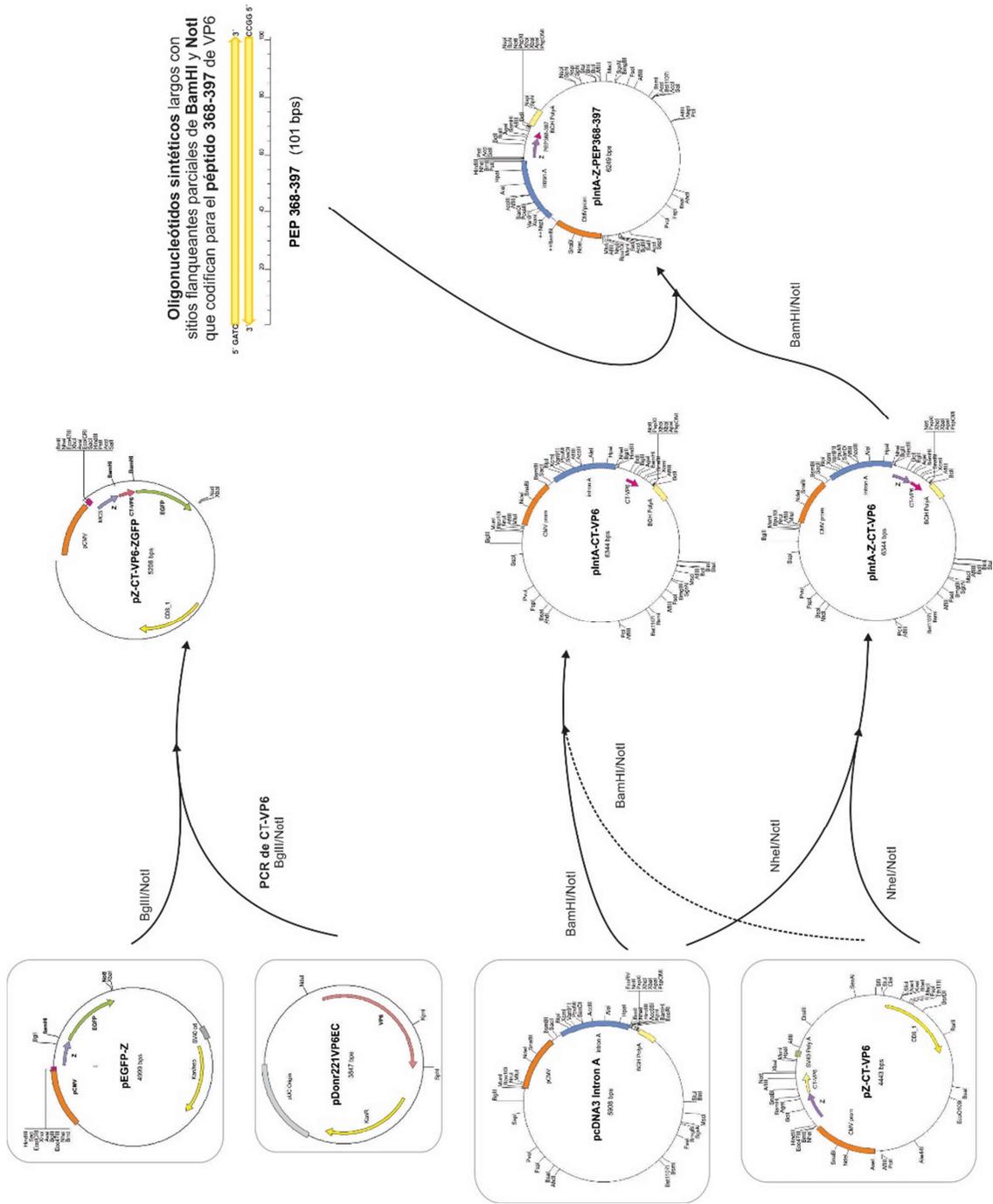
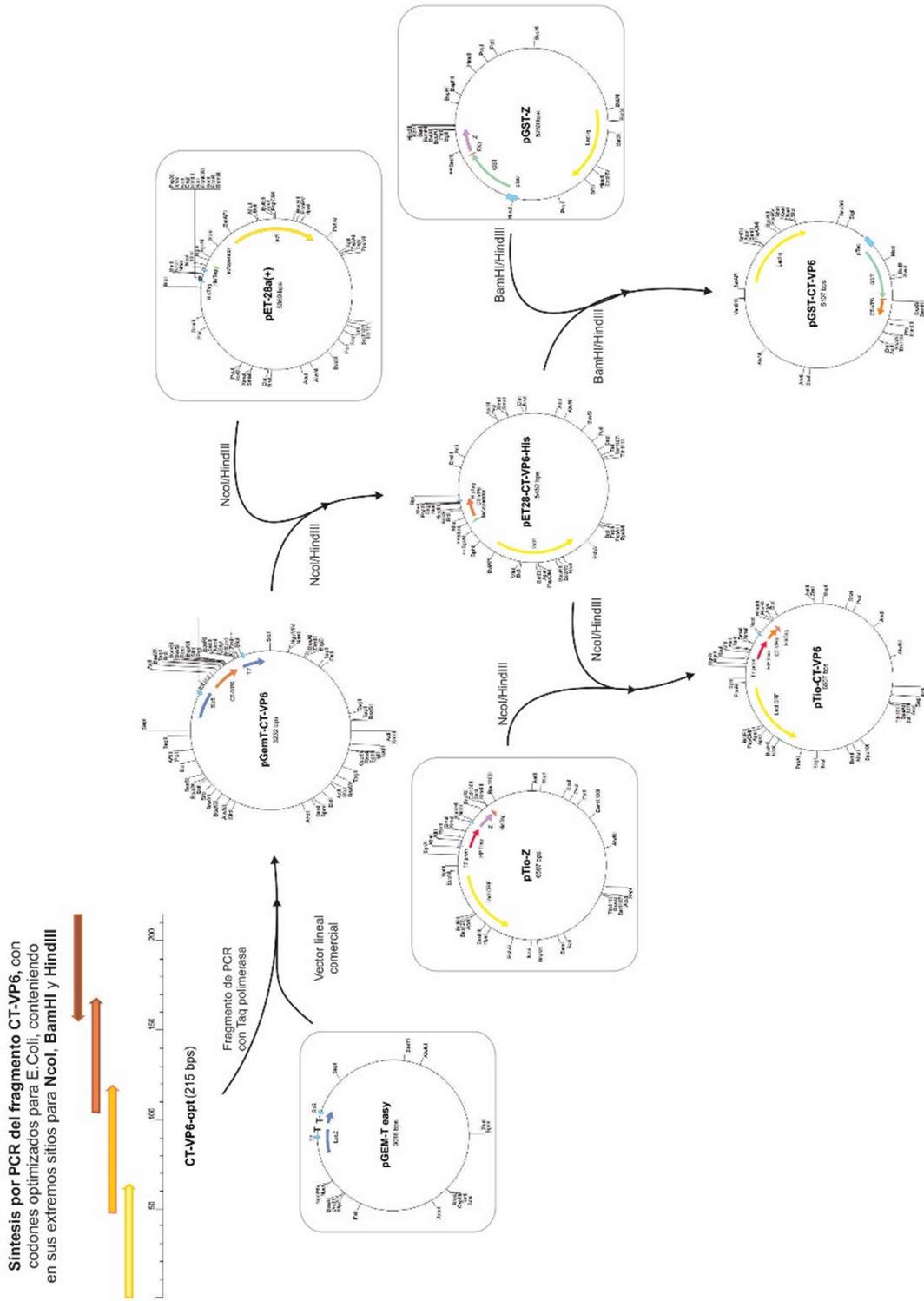
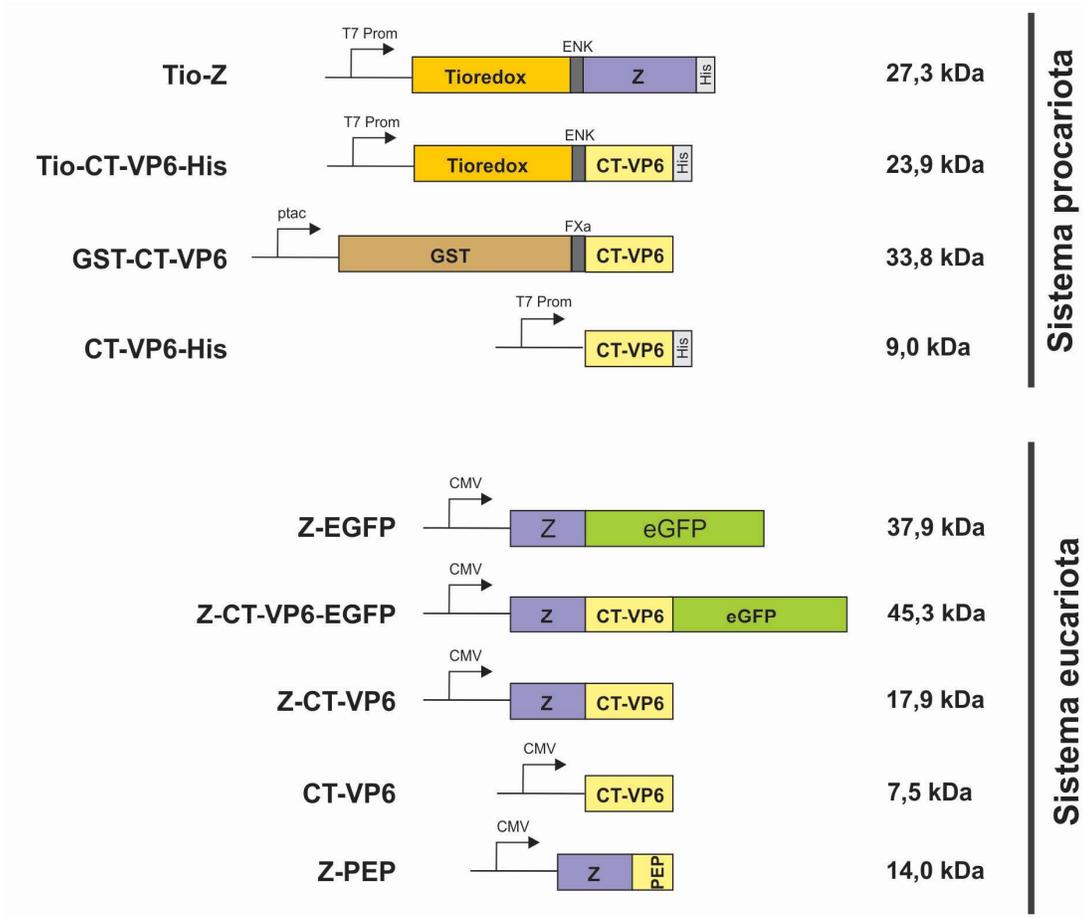


Figura i: Resumen de los clonados en vectores eucariotas. Las construcciones recuadradas corresponden a vectores previamente obtenidos en nuestro laboratorio.



**Figura ii:** Resumen de clonados en vectores procariotas. Las construcciones recuadradas corresponden a vectores previamente obtenidos en nuestro laboratorio.



**Figura iii.** Esquema de las proteínas utilizadas en este trabajo, tanto para su expresión en sistemas eucariotas (293T o COS-7), como sistemas procariotas (*E. Coli*)



# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFIA

Abraham, J., Corbett, K.D., Farzan, M., Choe, H., Harrison, S.C. Structural basis for receptor recognition by New World hemorrhagic fever arenaviruses. *Nature structural & molecular biology* 17, 438-444. **2010**.

Argüelles M.H., Villegas G.A., Castello A., Abrami A., Ghiringhelli P.D., Semorile L., Glikmann G. VP7 and VP4 genotyping of human group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Microbiol* 38(1), 252-259. **2000**.

Arribáizaga, R. A. Una nueva enfermedad epidémica a germen desconocido, hipertermia nefrotóxica, leucopénica y enantemática. *El día Médico*. 27, 1204-1210. **1955**.

Auperin, D.; Compans, R.W., Bishop, D.H.L. Nucleotide sequence conservation at the 3' termini of the virion RNA species of New World and Old World arenaviruses. *Virology*. 121, 200-203. **1982b**.

Auperin, D.; Dimock, K., Cash, P., Rawls, W.E. & Bishop, D.H.L. Analysis of the genome of prototype Pichinde arenavirus and a virulent derivative of Pichinde Munchique. Evidence for sequence conservation at the 3' termini of their viral RNA species. *Virology*. 116, 363-367. **1982a**.

Auperin, D.D., Romanowski, V., Galinski, M., Bishop, D.H. Sequencing studies of pichinde arenavirus S ARN indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S ARN. *J Virol*. 52, 897-904. **1984**.

Ayala Bretón C., de Regil Hernández R. Métodos en bioquímica – Secuenciación de proteínas por espectrometría de masas. Instituto de biotecnología UNAM. **2004**.

Barton, L.L., Peters, C.J., Ksiazek, T.G. Lymphocytic choriomeningitis virus: an unrecognized teratogenic pathogen. *Emerg Infect Dis*. 1, 152-153. **1995**.

Beyer, W.R., Popplau, D., Garten, W., von Laer, D., Lenz, O. Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J Virol*. 77, 2866-2872. **2003**.

Bieniasz, P.D. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology*. 344, 55-63. **2006**.

Borden, K.L., Campbell Dwyer, E.J., Salvato, M.S. An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. *J Virol*. 72, 758-766. **1998**.

Borio CS, Bilen MF, Argüelles MH, Goñi SE, Iserte JA, Glikmann G, Lozano ME. Antigen vehiculization particles based on the Z protein of Junin virus. *BMC Biotechnol*. 12:80. **2012**.

Buchmeier, M.J.; Lewicki, H.A.; Tomori, O. & Oldstone, M.B.A. Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis and Pichinde viruses: generation, characterization and crossreactivity with other arenaviruses. *Virology*. 113, 73-85. **1981**.

Campbell Dwyer, E.J., Lai, H., MacDonald, R.C., Salvato, M.S., Borden, K.L. The lymphocytic choriomeningitis virus RING protein Z associates with eukaryotic initiation factor 4E and selectively represses translation in a RING-dependent manner. *J Virol*. 74, 3293-3300. **2000**.

Cao, W., Henry, M.D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J.H., Ravkov, E.V., Nichol, S.T., Compans, R.W., Campbell, K.P., Oldstone, M.B. Identification of alpha-dystroglycan as a

receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* 282, 2079-2081. **1998**.

Chapman B.S., Thayer R.M., Vincent K.A., and Haigwood N.L. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 19(14): 3979–3986. **1991**.

Dalton, A.J.; Rowe, W.P.; Smith, G.H.; Wilsnack, R.E. & Pugh, W.E. Morphological and cytochemical studies on lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Virology.* 2, 1465-1478. **1968**.

Deshaies, R.J., Joazeiro, C.A. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual review of biochemistry.* 78, 399-434. **2009**.

Djavani, M., Rodas, J., Lukashevich, I.S., Horeish, D., Pandolfi, P.P., Borden, K.L., Salvato, M.S. Role of the promyelocytic leukemia protein PML in the interferon sensitivity of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol.* 75, 6204-6208. **2001**.

Djavani, M., Topisirovic, I., Zapata, J.C., Sadowska, M., Yang, Y., Rodas, J., Lukashevich, I.S., Boque, C.W., Pauza, C.D., Borden, K.L., Salvato, M.S. The proline-rich homeodomain (PRH/HEX) protein is down-regulated in liver during infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol.* 79, 2461-2473. **2005**.

Dubensky, T. W., Campbell, B. A., Villarreal, L. P. Direct transfection of viral and plasmic DNA into the liver or spleen of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 7529–7533. **1984**.

Eschli, B., Quirin, K., Wepf, A., Weber, J., Zinkernagel, R., Hengartner, H. Identification of an Nterminal trimeric coiled-coil core within arenavirus glycoprotein 2 permits assignment to class I viral fusion proteins. *J Virol.* 80, 5897-5907. **2006**.

Everett, R.D., Chelbi-Alix, M.K. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie.* 89, 819-830. **2007**.

Fan, L., Briese, T., Lipkin, W.I. Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction. *J Virol.* 84, 1785-1791. **2010**.

Farazi, T.A., Waksman, G., Gordon, J.I. The biology and enzymology of protein Nmyristoylation. *J Biol Chem.* 276, 39501-39504. **2001**.

Ferraro B, Morrow MP, Hutnick NA, Shin TH, Lucke CE, and Weiner DB. Clinical Applications of DNA Vaccines: Current Progress. *Clin Infect Dis.* 2011 Aug 1;53(3):296-302.

Franze Fernández, M.T.; Zetina, C.; Iapalucci, S.; Lucero, M.A.; Boissou, C.; López, R.; Rey, O.; Daheli, M.; Cohen, G. & Zalein, M. Molecular structure and early events in the replication of Tacaribe Arenavirus S RNA. *Virus Research.* 7, 309-324. **1987**.

Freemont, P.S., Hanson, I.M., Trowsdale, J. A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell.* 64(3):483-4. **1991**.

Fynan, E. F., Webster, R. G., Fuller, D. H., Haynes, J. R., Santoro, J. C., Robinson, H. L. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 11478–11482. **1993**.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server. John M. Walker. *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, 571-607. **2005**.

Ghiringhelli, P.D., Rivera-Pomar, R.V., Lozano, M.E., Grau, O., Romanowski, V. Molecular organization of Junin virus S ARN: complete nucleotide sequence, relationship with other

members of the *Arenaviridae* and unusual secondary structures. *J Gen Virol.* 72 (Pt 9), 2129-2141. **1991**.

Gish, W., States, D.J. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genet.* 3, 266-272. **1993**.

Gómez, R. M., Jaquenod de Giusti, C., Sanchez Vallduvi, M. M., Frik, J., Ferrer, M. F., Schattner, M. Junín virus. A XXI century update. *Microbes and Infection.* 13, 303–311. **2011**.

González, S.A., Affranchino, J.L. Assembly of double-layered virus-like particles in mammalian cells by coexpression of human rotavirus VP2 and VP6. *Journal of General Virology.* 76, 2357-2360. **1995**.

Grgacic E.V., Anderson D.A. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* 40, 60–65. **2006**.

Groothuis T.A., Neefjes J. The many roads to cross-presentation. *J. Exp. Med.* 202, 1313–1318. **2005**.

Grunwald, T., Ulbert, S. Improvement of DNA vaccination by adjuvants and sophisticated delivery devices: vaccine-platforms for the battle against infectious diseases. *Clinical and Experimental Vaccine Research.* 4, 1-10. **2015**.

Gschwender, H.H.; Brummund, M.; Lehmann-Grube, F. Lymphocytic choriomeningitis virus. I. Concentration and purification of the infectious virus. *Journal of Virology.* 15, 1317-1322. **1975**.

Günther, S., Lenz, O. Lassa virus. *Critical reviews in clinical laboratory sciences.* 41, 339-390. **2004**.

Hastie, K.M., Kimberlin, C.R., Zandonatti, M.A., MacRae, I.J., Sapphire, E.O. Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsARN-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108, 2396-2401. **2011**.

Hershey, J.W. Expression of initiation factor genes in mammalian cells. *Biochimie.* 76, 847-852. **1994**.

Hirel PH., Schmitter M.J., Dessen P., Fayat G., Blanquet S. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(21):8247-51. **1989**.

Iapalucci, S., López, N., Franze Fernández, M.T. The 3' end of the Tacaribe arenavirus subgenomic RNAs. *Virology.* 182, 269-278. **1991**.

Jackson R.W., DeMoss J.A. Effects of toluene on *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 90 (5):1420-5. **1965**.

Kentsis, A., Dwyer, E.C., Perez, J.M., Sharma, M., Chen, A., Pan, Z.Q., Borden, K.L. The RING domains of the promyelocytic leukemia protein PML and the arenaviral protein Z repress translation by directly inhibiting translation initiation factor eIF4E. *JouARNI of molecular biology* 312, 609-623. **2001**.

Knipe D.M., Howley-Fields P. "Virology" 6<sup>th</sup> edition. **2013**.

Kranzusch, P.J., Whelan, S.P. arenavirus Z protein controls viral ARN synthesis by locking a polymerase-promoter complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 19743-19748. **2011**.

Lenz, O., ter Meulen, J., Klenk, H.D., Seidah, N.G., Garten, W. The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 12701-12705. **2001**.

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

Leung, W.C., Rawls, W.E. Virion-associated ribosomes are not required for the replication of Pichinde virus. *Virology*. 81, 174-176. **1977**.

Levingston Macleod, J.M., D'Antuono, A., Loureiro, M.E., Casabona, J.C., Gomez, G.A., Lopez, N. Identification of two functional domains within the arenavirus nucleoprotein. *J Virol*. 85, 2012-2023. **2011**.

Lukashevich, I.S., Rodas, J.D., Tikhonov, I., Zapata, J.C., Yang, Y., Djavani, M., Salvato, M.S. LCMV-mediated hepatitis in rhesus macaques: WE but not ARM strain activates hepatocytes and induces liver regeneration. *Archives of virology*. 149, 2319-2336. **2004**.

Mareze, V.A., Borio, C.S., Bilén, M.F., Fleith, R., Mirazo, S., Mansur, D.S., Arbiza, J., Lozano, M.E., Bruña-Romero, O. Test in mice of a dengue vaccine candidate made of chimeric Junin virus-like particles and conserved dengue virus envelope sequences. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2015**.

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

McDonald, B., Martin-Serrano, J. No strings attached: the ESCRT machinery in viral budding and cytokinesis. *J Cell Sci*. 122, 2167-2177. **2009**.

Methods and procedures of antibody production (rabbits, rats and mice) approved by University of Massachusetts Animal Care Staff.

Michele A. Kutzler\* and David B. Weiner, DNA vaccines: ready for prime time?. *Nat Rev Genet*. 2008 Oct; 9(10): 776–788.

Morin, B., Coutard, B., Lelke, M., Ferron, F., Kerber, R., Jamal, S., Frangeul, A., Baronti, C., Charrel, R., de Lamballerie, X., Vornrhein, C., Lescar, J., Bricogne, G., Gunther, S., Canard, B. The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an ARN endonuclease essential in mARN transcription. *PLoS Pathog* **2010**.

Murphy, F.A., Webb, P.A., Johnson, K.M., Whitfield, S.G., Chappell, W.A. Arenoviruses in Vero cells: ultrastructural studies. *J Virol*. 6, 507-518. **1970**.

Murphy, F.A., Whitfield, S.G. Morphology and morphogenesis of arena-viruses. *Bulletin WHO*. 52, 409-419. **1975**.

Murphy, F.A.; Webb, P.A.; Johnson, K.M., Whitfield, S.G. Morphological comparison of Machupo with lymphocytic choriomeningitis virus: basis for a new taxonomic group. *Journal of Virology*. 4, 535-541. **1969**.

Naskalska, A., Pyrc, K. Virus Like Particles as Immunogens and Universal Nanocarriers. *Polish Journal of Microbiology*. 64, 3-13. **2015**.

Ofodile, A.; Padnos, M.; Molomot, N., Duffy, J.L. Morphological and biological characteristics of the M-P strain of lymphocytic choriomeningitis virus. *Infect. Immun*. 7, 309-315. **1973**.

Ortiz-Riano, E., Cheng, B.Y., de la Torre, J.C., Martinez-Sobrido, L. The C-terminal region of lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein contains distinct and segregable functional domains involved in NP-Z interaction and counteraction of the type I interferon response. *J Virol*. 85, 13038-13048. **2011**.

Parent, L.J., Bennett, R.P., Craven, R.C., Nelle, T.D., Krishna, N.K., Bowzard, J.B., Wilson, C.B., Puffer, B.A., Montelaro, R.C., Wills, J.W. Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J Virol.* 69, 5455-5460. **1995**.

Parodi, A.S.; Rugiero, H.R.; Greenway, D.J.; Mettler, N.E.; Martínez, A.; Boxaca, M., de la Barrera, J.M. Aislamiento del virus Junín (FHE) de los ácaros de las zonas epidémicas (*Echinolaeps echidnius* Berlese). *Prensa Médica Argentina.* 46, 2242-2244. **1959b**.

Pérez, M.; Greenwald, D.L.; de la Torre, J.C. Myristoylation of the RING finger Z protein is essential for arenavirus budding. *J Virol.* 78(20):11443-8. **2004**.

Pesavento, J.B., Crawford, S.E., Estes, M.K., Venkataram Prasad, B.V. Rotavirus Proteins: Structure and Assembly. *CTMI.* 309, 189-219. **2006**.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. UCSF Chimera, a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 1605-12. **2004**.

Pfau, C.J. Biochemical and biophysical properties of the arenaviruses. *Progress in medical virology. Fortschritte der medizinischen Virusforschung. Progres en virologie medicale.* 18, 64-80. **1974**.

Pinschewer, D.; Perez, M. & de la Torre, J.C. Role of the Virus Nucleoprotein in the Regulation of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Transcription and RNA Replication. *Journal of Virology,* p. 3882–3887 Vol. 77, N° 6. **2003**.

Radoshitzky, S.R., Abraham, J., Spiropoulou, C.F., Kuhn, J.H., Nguyen, D., Li, W., Nagel, J., Schmidt, P.J., Nunberg, J.H., Andrews, N.C., Farzan, M., Choe, H. Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* 446, 92-96. **2007**.

Radoshitzky, S.R., Bao, Y., Buchmeier, M.J., Charrel, R.N., Clawson, A.N., Clegg, C.S., DeRisi, J.L., Emonet, S., Gonzalez, J.P., Kuhn, J.H., *et al.* Past, present, and future of arenavirus taxonomy. *Arch. Virol.* **2015**.

Rawls, W.E., Buchmeier, M.J. Arenaviruses: purification and physicochemical nature. *Bulletin WHO.* 52, 393-401. **1976**.

Rhoads, R.E., Joshi, B., Minich, W.B. Participation of initiation factors in the recruitment of mARN to ribosomes. *Biochimie.* 76, 831-838. **1994**.

Rivera Pomar, R.V., Manzella, E.M., Ghiringhelli, P.D., Grau, O., Romanowski, V. Patterns of transient expression of the arenavirus nucleocapsid protein gene in transfected cells. *Microscopía Electrónica y Biología Celular.* 15, 41-56. **1991**.

Rodrigo, W.W., Ortiz-Riano, E., Pythoud, C., Kunz, S., de la Torre, J.C., Martinez-Sobrido, L. Arenavirus nucleoproteins prevent activation of nuclear factor kappa B. *J Virol.* 86, 8185-8197. **2012**.

Romanowski, V., Matsuura, Y., Bishop, D.H.L. Complete sequence of the S RNA of lymphocytic choriomeningitis virus (WE strain) compared to that of Pichinde arenavirus. *Virus Research.* 3, 101- 114. **1985**.

Rowe, W.P., Pugh, W.F., Webb, P.A., Peters, C.J. Serological relationships of the Tacaribe complex of viruses to lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Virology.* 5, 289-292. **1970b**.

Rowe, W.P., Pugh, W.F., Webb, P.A., Peters, C.J. Serological relationships of the Tacaribe complex of viruses to lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Virology*. 5, 289-292. **1970b**.

Saade, F., Petrovsky, N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Review Vaccines*. 11, 189-209. **2012**.

Sanchez, A.B., de la Torre, J.C. Genetic and biochemical evidence for an oligomeric structure of the functional L polymerase of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol*. 79, 7262-7268. **2005**.

Shao, J., Liang, Y., Ly H. Human hemorrhagic fever causing arenaviruses: molecular mechanisms contributing to virus virulence and disease pathogenesis. *Pathogens* ISSN 2076-0817. **2015**

Shatkin, A.J. mRNA cap binding proteins: essential factors for initiating translation. *Cell* 40, 223-224. **1985**.

Shedlock, D.J., Weiner, D.B. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *Journal of Leukocyte Biology*. 68, 793-806. **2000**.

Sonenberg, N. Regulation of translation and cell growth by eIF-4E. *Biochimie* 76, 839-846. **1994**.

Speir, R.W., Wood, O., Liebhaber, H., Buckley, S.M. Lassa fever, a new virus disease of man from west Africa. IV. Electron microscopy of Vero cell cultures infected with Lassa virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 19, 692-694. **1970**.

Spiropoulou, C.F., Kunz, S., Rollin, P.E., Campbell, K.P., Oldstone, M.B. New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor. *J Virol*. 76, 5140-5146. **2002**.

Strecker, T., Eichler, R., Meulen, J., Weissenhorn, W., Dieter Klenk, H., Garten, W., Lenz, O. Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]. *J Virol* 77, 10700-10705. **2003**.

Strecker, T., Maisa, A., Daffis, S., Eichler, R., Lenz, O., Garten, W. The role of myristoylation in the membrane association of the Lassa virus matrix protein Z. *Virol J* 3, 93. **2006**.

Tang, D. C., DeVit, M., Johnston, S. A. Genetic immunization is a simple model for eliciting an immune response. *Nature*. 356, 152–154. **1992**.

Topcu, Z., Mack, D.L., Hromas, R.A., Borden, K.L. The promyelocytic leukemia protein PML interacts with the proline-rich homeodomain protein PRH: a RING may link hematopoiesis and growth control. *Oncogene* 18, 7091-7100. **1999**.

Tortorici, M.A.; Albariño, C.G.; Posik, D.M.; Ghiringhelli, P.D.; Lozano, M.E.; Rivera Pomar, R.V.; Romanowski, V. Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity in vivo. *Virus Research* 73, 41–55. **2001<sup>a</sup>**

Tortorici, M.A.; Albariño, C.G.; Posik, D.M.; Ghiringhelli, P.D.; Lozano, M.E.; Rivera Pomar, R.V.; Romanowski, V. Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity in vivo. *Virus Research* 73, 41–55. **2001a**.

Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., DeWitt, C. M., Friedman, A., Hawe, L. A., Leander, K. R., Martinez, D., Perry, H. C., Shiver, J. W., Montgomery, D. L., Liu, M. A. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 259, 1745–1749. **1993**.

- Urata, S., de la Torre, J.C. Arenavirus budding. *Adv Virol.* 2011 Article ID: 180326, 9. **2011.**
- Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Yokosawa, H., Yasuda, J. Cellular factors required for Lassa virus budding. *J Virol.* 80, 4191-4195. **2006.**
- Vieth, S., Torda, A.E., Asper, M., Schmitz, H., Gunther, S. Sequence analysis of L ARN of Lassa virus. *Virology.* 318, 153-168. **2004.**
- Volpon, L., Osborne, M.J., Capul, A.A., de la Torre, J.C., Borden, K.L. Structural characterization of the Z RING-eIF4E complex reveals a distinct mode of control for eIF4E. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107, 5441-5446. **2010.**
- Wang, J., Danzy, S., Kumar, N., Ly, H., Liang, Y. Biological Roles and Functional Mechanisms of arenavirus Z Protein in Viral Replication. *J Virol.* **2012.**
- Ward, R.L., McNeal, M.M. VP6: A Candidate Rotavirus Vaccine. *Journal of Infectious Diseases.* 202, 101-107. **2010.**
- Wilda, M., Lopez, N., Casabona, J.C., Franze-Fernandez, M.T. Mapping of the tacaribe arenavirus Z-protein binding sites on the L protein identified both amino acids within the putative polymerase domain and a region at the N terminus of L that are critically involved in binding. *J Virol.* 82, 11454-11460. **2008.**
- Will, H., Cattaneo, R., Koch, H. G., Darai, G., Schaller, H., Schellekens, H., van Eerd, P. M., Deinhardt, F. Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees. *Nature.* 299, 740-742. **1982.**
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., Felgner, P. L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 247, 1465-1468. **1990.**
- Wolff, S., Becker, S., Groseth, A. Cleavage of the Junin virus nucleoprotein serves a decoyfunction to inhibit the induction of apoptosis during infection. *J Virol.* **2012.**
- Xing, J., Ly, H., Liang, Y. The Z proteins of pathogenic but not non-pathogenic arenaviruses inhibit the RIG-I-like receptor (RLR) dependent interferon production. *American Society for Microbiology.* **2014.**
- Xu, D., Zhang, Y. Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. *Proteins.* 80, 1715-1735. **2012.**
- York, J., Romanowski, V., Lu, M., Nunberg, J.H. The signal peptide of the Junin arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex. *J Virol* 78, 10783-10792. **2004.**
- Zhang J, Sprung R, Pei J, Tan X, Kim S, Zhu H, Liu CF, Grishin NV, Zhao Y. Lysine acetylation is a highly abundant and evolutionarily conserved modification in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics.* 8(2):215-25. **2009.**
- Zhao, Q., Chen, W., Chen, Y., Zhang, L., Zhang, J., Zhang, Z. Self-Assembled Virus-Like Particles from Rotavirus Structural Protein VP6 for Targeted Drug Delivery. *Bioconjugate Chemistry.* 22, 346-352. **2011.**



# **AGRADECIMIENTOS**



## AGRADECIMIENTOS

Llegando al final de este importante paso en mi vida, quiero agradecer a todos los que me acompañaron en el camino. Siento que empecé hace poco tiempo la carrera y hace menos, a trabajar con esto y ahora estoy viendo el final.

Llegué a un laboratorio con muchas personas, pero obviamente a la primera que conocí fue a mi directora **Cris**. Con ella logré todo lo que sé actualmente, nunca había pensado que podía llegar a aprender tantas cosas. Es muy fanática de lo que hace y me llegó a contagiar ese fanatismo por tener el resultado de un ensayo lo antes posible. Como un ejemplo de desesperación por saber un resultado, quise buscar maneras de tinción y destinción de un gel de poliacrilamida, más rápido que lo que lo hace el Coomassie Blue. Así con muchas cosas más. También me animó cuando me mandaba alguna de las tantas, con una historia personal contándome lo que le pasó alguna vez. No solo eso, tuvimos charlas que me hicieron pasar buenos momentos. Como muchos deben saber, empezó siendo una y se duplicó, e igualmente siguió con la misma energía.

También podemos hablar de mi co-director y futuro director, **Marcos**, que en encrucijadas o en momentos que hacía falta otra opinión, escuchaba todo lo que teníamos para decir y aportaba buenas y nuevas ideas. Además de haber escuchado varias preguntas cuando desaparecía Cris.

En el laboratorio cuando llegué estaban Mati, Agus, Pri, Ivi, Sole y Ro, después volvió San que es una persona muy divertida y admiro como puede encontrar los momentos de seriedad y de entretenimiento. **Mati**, mi compañero de mesada, siempre dispuesto a ayudar con cualquier pregunta y con su cara inmutable, logra tirar la justa, lo que hace que todos riámos. **Agus** con el compartí mesada y también un viaje a La Feliz, donde nos cocinó de todo (gran cocinero), participamos de alguna ocasional previa en el viaje (todos los días) y nos reímos muchísimo. **Pri**, recibió muchas veces alcohol 70/agua destilada en sus lentes, se enojó siempre pero con mucho humor. **Ivi** la persona que abría el laboratorio, que se acostaba a las 6 de la tarde y estaba ahí, y con una energía nunca vista en otra persona lograba una atmosfera genial. **Ro**, con su risa inconfundible a diez cuadras de distancia. (Es muy satisfactorio decir algo y que todo el mundo se entere de que fue gracioso lo que dijiste). **Sole**, que al principio pensé que me retaba, es su instinto materno el que le sale y la buena onda y las risas que compartimos me hicieron pasar gratos momentos. Aclaro que absolutamente todos me ayudaron cuando tuve dudas o me decían “no pasa nada” cuando algo salía mal. Después llegaron **Ceci** y **Juan** que cuando están juntos son un murmullo de quejas y risas, los dos aportaron muy buena onda al laboratorio, con sus ironías y demás.

Ahora pasamos a la gente que conocí cursando, que hicieron que trascurriesen los días de cursada mucho más relajado y divertido: **Vicky** (que pasamos desde que nos conocimos prácticamente las 24 hs. del día juntos y nos reímos desde ese momento hasta ahora), **Rocío** y **Jair** (que fueron de las primeras personas que conocí en la facultad y pudimos llegar al final juntos), **Juli** y **Andy** (que nunca los vi por separado y son los dos muy divertidos), **Cami** (que la conocí mejor recientemente y descubrí que es una gran persona) y **Lucha** (que me abandonó a mitad de camino, pero que compartí mil cosas y la pasamos muy bien juntos).

A mi familia que me pudo soportar con mal humor, cuando llegaba a casa después de no haber logrado nada en días o meses sin resultado. Que siempre estuvieron con buen ánimo e interesados en lo que hacía, preguntando todo y tratando de entenderlo. Tengo que admitir que lograron entender bastante de lo que les explicaba.

También quiero agradecer a **Marcelo A.** del laboratorio de virología e inmunología, que con muy buena predisposición aportó singular ayuda con ensayos que me hubieran llevado muchísimo tiempo y él sin ninguna duda los realizó.

A **Leti**, que en las inmunizaciones y sangrías siempre estuvo, con muy buena energía y siempre alegre. No solo vi como hacía todo, sino que aprendí de ella como es el trabajo con ratones.

Espero no olvidarme de nadie, pero conocí mucha gente nueva en el pasillo de los laboratorios, que lograron que hasta las caminatas por el mismo o las esperas para calentar la comida se hacían llevaderas.

Tal vez, con el tiempo olvide alguna de las cosas que aprendí. Lo seguro es que no se borrarán de mi memoria los excelentes momentos pasados y, sobre todo, la humana calidad de cuántos conocí en este inolvidable laboratorio.

**AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

A las instituciones que financiaron este trabajo a través de becas y subsidios

Universidad Nacional de Quilmes, **UNQ**.

Consejo Interuniversitario nacional, **CIN**.

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, **CONICET**.

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, **ANPCyT**.

