



Universidad Autónoma de Madrid



**Universidad Autónoma de Madrid**

**Departamento de Biología Molecular**

**Facultad de Ciencias**

**Bases estructurales de la cápsida del  
virus de la bursitis infecciosa para el  
desarrollo de futuras aplicaciones  
biotecnológicas**

**- TESIS DOCTORAL -**

**Elena Pascual Vega**

**Madrid, 2013**





Universidad Autónoma de Madrid



# Universidad Autónoma de Madrid

## Departamento de Biología Molecular

### Facultad de Ciencias

Memoria presentada para optar al grado de Doctor  
en Ciencias Biológicas por

**Elena Pascual Vega**

Universidad Autónoma de Madrid

Enero de 2013

#### **DIRECTORES DE TESIS:**

**Dr. José Ruiz Castón**

C.N.B.-C.S.I.C.

**Dr. José López Carrascosa**

C.N.B.-C.S.I.C.



CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA





El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (C.N.B.-C.S.I.C.) bajo la dirección conjunta de los Drs. José Ruiz Castón y José López Carrascosa. Su financiación corrió a cargo de una beca del Consejo Superior de Investigaciones Científicas dentro del programa J.A.E. Predoc.



## AGRADECIMIENTOS

Difícil recoger en unas líneas tantas personas que han contribuido, de forma directa o indirecta, a que este trabajo haya sido posible, y, sobre todo, a hacer de este largo camino de la tesis una experiencia muy positiva y gratificante. Tantas personas que no olvidar y anécdotas que recordar con todo el cariño...

En primer lugar, agradecer sinceramente a mis directores de tesis, Pepe Castón y Pepe Carrascosa, por haberme guiado en todo este proceso, y haber conseguido que, entre todos, hayamos sido capaces de dar forma a este proyecto del cual me siento orgullosa partícipe. Gracias por darme la oportunidad de formar parte de este gran grupo.

También quiero agradecer a todas las personas que nos han ayudado en diferentes momentos a la hora de diseñar o realizar experimentos, conseguir materiales y sobre todo de las cuales he recibido grandes lecciones profesionales y personales. Dentro de este grupo destacar a Paco Rodríguez, de quien he recibido una gran base de biología molecular en general, y muy especialmente por su ayuda con los clonajes. A Leonor Kremer y Mercedes Llorente por su asesoramiento en los aspectos inmunológicos, y por estar siempre dispuestas a discutir experimentos y resultados más allá de lo requerido por su servicio. También a Amelia Nieto y Ariel Rodríguez, por su contribución en los experimentos con el virus de la gripe, y a Esther Blanco y Juan Bárcena por su ayuda en esta última etapa. Además agradecer a Nuria Verdaguer, con quien he compartido muchos ratos agradables (científicos y extracientíficos), por su entusiasmo contagioso y su forma única de entender la ciencia.

De todos los compañeros con los que he coincidido en estos años, agradezco especialmente a los integrantes de la “minilínea” (ya no tan mini): Mariana, Ana, Carlos, Josué, Nerea y Dani. Por el día a día, por el continuo interés en los experimentos, por el consultorio psicológico, las risas, las “frikadas”, los cigarros y no cigarros... También una mención especial a mis “compis” de comidas, hoy buenos amigos: Jorge, Sara, Srdja, Jose, Josué y Bego, por darme un pequeño respiro diario, por las tertulias políticas, las risas, las frases célebres, por todo lo que he aprendido sobre Cuba, y, por supuesto, por todos los momentos compartidos fuera del labo, que espero sigamos manteniendo muchos años. También un recuerdo especial a Alvarito, miembro nucleador de este grupo durante varios años. A todos los integrantes de los “sótanos”, aparte de los ya mencionados: Encarna, Mar, María, Ana C., Rebeca, Vero, Marta, Alina, Ana B., Borja, Jaime, Marina, Elías, Sonia, M<sup>a</sup> Ángeles, Charo, José Jesús, Ricardo, JoseMari, Rocío, Javi Conesa, Michele, Lucía, Javi Chichón, MariJose, por ser grandes compañeros. Y a todos los integrantes pasados y presentes del 117, Idoia, Diego, Aitor, Ana, Loly, Laura, Romy, Antonio y Fernando, por adoptarme de vez en cuando y por todas las cosas que he aprendido con ellos.

Un apartado muy especial para mis grandes apoyos fuera del labo. A mis amigas “de toda la vida”, por no tenerme en cuenta mi desaparición del mapa en el último año, por intentar comprenderme y por seguir estando ahí, siempre dispuestas a echar unas risas, un café, unas cervecitas o lo que haga falta. A mis primos, tíos, abuelos (con especial cariño a los que he perdido en estos años), y a toda mi familia de Málaga en general, por su cariño. A los peques, mis sobrinitos Jimena y Juanito, que son la alegría de las comidas y cenas en Casa Abu. A mi madre y a mi hermano y Silvia, por los esfuerzos que les he pedido, sobre todo, en esta última etapa, y en general por apoyarme, confiar en mí y transmitirme fuerza y alegría. Y para terminar el apartado, una merecida mención especial a Jorge, por su apoyo constante, su confianza, por ayudarme a superar todos los momentos difíciles y a disfrutar de los buenos, por transmitirme serenidad y por tantas otras cosas que no podría reflejar aquí.

Por último, quiero dedicar todo este trabajo a mi padre, porque sé que nadie como él estaría orgulloso de ello, por haber sido un ejemplo para todos y porque gracias a él hoy soy lo que soy. Gracias, Papá. Y gracias a todos.

## ABREVIATURAS

<b>3D:</b>	tridimensional	<b>IPNV:</b>	virus de la necrosis pancreática infecciosa
<b>3DR:</b>	reconstrucción tridimensional	<b>kb:</b>	kilobase
<b><math>\alpha</math>-XX:</b>	anticuerpo anti-XX	<b>ME:</b>	microscopía electrónica
<b>aa:</b>	aminoácido	<b>MOI:</b>	multiplicidad de infección
<b>AAV:</b>	virus adeno-asociado	<b>mRNA:</b>	ácido ribonucleico mensajero
<b>ATCC:</b>	colección americana de tipos celulares ( <i>American Type Cell Collection</i> )	<b>MW:</b>	peso molecular
<b>BSA:</b>	seroalbúmina bovina	<b>MWM:</b>	marcador de peso molecular
<b>BrEt:</b>	bromuro de etidio	<b>NMR:</b>	resonancia magnética nuclear
<b>crioME:</b>	criomicroscopía electrónica	<b>N-terminal:</b>	Amino terminal
<b>C-terminal:</b>	carboxilo terminal	<b>ORF:</b>	fase abierta de lectura
<b>CTF:</b>	función de transferencia de contraste	<b>pb:</b>	par de bases
<b>DNA:</b>	ácido desoxiribonucleico	<b>PBS:</b>	tampón fosfato salino
<b>dsRNA:</b>	ácido ribonucleico de cadena doble	<b>PCR:</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>DMEM:</b>	medio de Eagle modificado por Dulbecco	<b>PDB:</b>	base de datos de proteínas ( <i>Protein Data Bank</i> )
<b>dNTP:</b>	desoxinucleótido trifosfato	<b>PEG:</b>	polietilenglicol
<b>DTT:</b>	ditiotreitól	<b>PFU:</b>	unidad formadora de placa
<b>DXV:</b>	virus X de Drosophila	<b>PIPES:</b>	piperazina-N,N-bis(acido 2-etanosulfónico)
<b>EDTA:</b>	ácido etilendiaminotetraacético	<b>RdRp:</b>	RNA polimerasa RNA dependiente
<b>ELISA:</b>	ensayo por inmuabsorción ligado a enzimas ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )	<b>RNA:</b>	ácido ribonucleico
<b>EGFP:</b>	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	<b>RNasa:</b>	ribonucleasa
<b>FCS:</b>	suero fetal de ternero	<b>RNP:</b>	ribonucleoproteína
<b>FSC:</b>	<i>Fourier Shell Correlation</i>	<b>rBV:</b>	baculovirus recombinante
<b>HBV:</b>	virus de la hepatitis B	<b>rVV:</b>	virus vaccinia recombinante
<b>hp.i.:</b>	horas postinfección	<b>T:</b>	número de triangulación
<b>HT:</b>	cola de histidinas ( <i>Histidine Tag</i> )	<b>TBE:</b>	tampón Tris-Borato-EDTA
<b>IBDV:</b>	virus de la bursitis infecciosa ( <i>Infectious Bursal Disease Virus</i> )	<b>TMV:</b>	virus del mosaico del tabaco ( <i>Tobacco mosaic virus</i> )

**Tris:** tri-(hidroximetil)-aminometano

**SDS:** dodecil sulfato sódico

**SDS-PAGE:** electroforesis en geles  
desnaturalizantes de poliacrilamida

**ssRNA:** RNA de cadena simple

**SVP:** partícula subviral

**UTR:** región no traducida

**UV:** ultravioleta

**VLP:** pseudopartícula viral

**WB:** inmunodetección de proteínas en  
membrana (*Western blot*)

## CÓDIGOS DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS

<b>Alanina</b>	Ala, A	<b>Leucina</b>	Leu, L
<b>Arginina</b>	Arg, R	<b>Lisina</b>	Lys, K
<b>Ácido aspártico</b>	Asp, D	<b>Metionina</b>	Met, M
<b>Asparagina</b>	Asn, N	<b>Fenilalanina</b>	Phe, F
<b>Cisteína</b>	Cys, C	<b>Prolina</b>	Pro, P
<b>Ácido Glutámico</b>	Glu, E	<b>Serina</b>	Ser, S
<b>Glicina</b>	Gly, G	<b>Tirosina</b>	Tyr, Y
<b>Glutamina</b>	Gln, Q	<b>Treonina</b>	Thr, T
<b>Histidina</b>	His, H	<b>Triptófano</b>	Trp, W
<b>Isoleucina</b>	Ile, I	<b>Valina</b>	Val, V



# ÍNDICE

<b>Abstract</b>	1
<b>1. Introducción</b>	
<b>1.1. Virus: vacunas y aplicaciones biotecnológicas</b>	6
1.1.1. Estructura y función de la cápsida viral	6
1.1.2. Aplicaciones biotecnológicas de los virus	7
1.1.3. Propiedades generales de las VLPs	10
1.1.4. Vacunas basadas en VLPs	12
1.1.5. VLPs como presentadoras de antígenos exógenos	13
<b>1.2. El Virus de la Bursitis Infecciosa (IBDV)</b>	15
1.2.1. La bursitis infecciosa	15
1.2.2. Organización genómica de IBDV	16
1.2.3. Componentes estructurales de IBDV	17
1.2.4. Estructura atómica de VP2	20
1.2.5. Polimorfismo estructural de la proteína de la cápsida de IBDV	21
<b>2. Objetivos</b>	29
<b>3. Materiales y Métodos</b>	33
<b>3.1. Material biológico</b>	33
3.1.1. Animales	33
3.1.2. Células procariontas	33
3.1.3. Células eucariotas	33
3.1.4. Plásmidos	33
3.1.5. Virus	34
3.1.6. Anticuerpos	34
<b>3.2. Manipulación y obtención de vectores recombinantes</b>	34
3.2.1. Amplificación de fragmentos por PCR	34
3.2.2. Reacciones de restricción enzimática	34
3.2.3. Reacciones de ligación de fragmentos de DNA	34
3.2.4. Generación de plásmidos recombinantes	35
3.2.5. Generación de baculovirus recombinantes	38
<b>3.3. Infecciones y expresión de proteínas</b>	38

3.3.1.	Infección con rBVs	38
3.3.2.	Infección con rVVs	38
3.3.3.	Infección con IBDV	39
3.3.4.	Titulación de stocks de rVV e IBDV	39
3.3.5.	Transformación bacteriana y expresión de HT-EGFP	39
<b>3.4.</b>	<b>Purificación de proteínas y ensamblados virales</b>	39
3.4.1.	Purificación de ensamblados derivados de la expresión con rBVs	40
3.4.2.	Purificación de ensamblados derivados de la expresión con rVV	40
3.4.3.	Purificación de viriones de IBDV	41
3.4.4.	Purificación de HT-EGFP	41
<b>3.5.</b>	<b>Análisis bioquímico</b>	41
3.5.1.	Análisis electroforético en geles desnaturalizantes de poliacrilamida	41
3.5.2.	Análisis electroforético en geles nativos de agarosa	42
3.5.3.	Electrotransferencia e inmunodetección	42
3.5.4.	Determinación de la concentración de proteína total	42
3.5.5.	Cuantificación de la incorporación de proteínas de fusión	42
<b>3.6.</b>	<b>Microscopía electrónica</b>	42
3.6.1.	Tinción negativa	43
3.6.2.	Criomicroscopía electrónica	43
3.6.3.	Procesamiento digital de imágenes	44
<b>3.7.</b>	<b>Inmunizaciones y desafío viral de ratones</b>	44
3.7.1.	Inmunización de ratones	45
3.7.2.	Ensayos de ELISA	45
3.7.3.	Ensayos de desafío de ratones con el virus de la gripe A/PR8	46
3.7.4.	Análisis cuantitativo por <i>dot blot</i>	46
3.7.5.	Ensayos de seroneutralización del virus de la gripe en placa	47
<b>4.</b>	<b>Resultados</b>	
<b>4.1.</b>	<b>Obtención de cápsidas quiméricas de IBDV utilizando como modelo la proteína EGFP</b>	51
4.1.1.	Construcción y expresión de proteínas de fusión con EGFP en los extremos N y C-terminales de HT-VP2-466	51
4.1.2.	Purificación de estructuras derivadas de EGFP-HT-VP2-466	53
4.1.3.	Optimización del ensamblaje de cápsidas quiméricas de EGFP-HT-VP2-466	55

4.1.4.	Criomicroscopía electrónica y reconstrucción tridimensional de VLPs quiméricas que contienen EGFP-HT-VP2-466	58
4.1.5.	Inmunización de ratones con VLPs quiméricas de EGFP-HT-VP2-466	60
<b>4.2.</b>	<b>Obtención de cápsidas quiméricas de HT-VP2-466 que contienen antígenos del virus de la gripe A/PR8</b>	<b>63</b>
4.2.1.	Diseño y construcción de proteínas de fusión de antígenos del virus de la gripe A/PR8 con HT-VP2-466	63
4.2.2.	Ensamblaje de VLPs quiméricas a partir de proteínas de fusión de HT-VP2-466 con antígenos del virus de la gripe	65
4.2.3.	Optimización del ensamblaje de VLPs quiméricas de HA-CAP, HA2-CAP, HA2L-CAP y M2L-CAP	67
4.2.4.	Inmunización de ratones con cápsidas quiméricas que contienen antígenos del virus de la gripe A/PR8	68
4.2.5.	Respuesta de los ratones inmunizados con cápsidas quiméricas de HA2 y M2 frente al desafío con el virus de la gripe	70
4.2.6.	Titulaciones de anticuerpos frente al virus de la gripe	72
4.2.7.	Evaluación del título de anticuerpo específico frente a M2	74
4.2.8.	Evaluación de la capacidad neutralizante frente a la infección viral <i>in vitro</i> del suero de ratones inmunizados con VLPs quiméricas de HA2 y M2	75
<b>4.3.</b>	<b>Ensamblaje <i>in vitro</i> de cápsidas T=13 a partir de la proteína HT-VP2-466</b>	<b>76</b>
4.3.1.	Desensamblaje de la cápsida de IBDV	76
4.3.2.	Desensamblaje/reensamblaje de cápsidas T=13 HT-VP2-466	78
4.3.3.	Incorporación de ácidos nucleicos en cápsidas HT-VP2-466	79
<b>5.</b>	<b>Discusión</b>	
5.1.	Ensamblaje de cápsidas quiméricas de HT-VP2-466 a partir de proteínas de fusión	84
5.2.	Respuesta humoral inducida frente a los antígenos fusionados con HT-VP2-466	87
5.3.	VLPs de IBDV que incorporan proteínas del virus de la gripe A/PR8 como potenciales candidatos vacunales	88
5.4.	Ensamblaje <i>in vitro</i> de cápsidas HT-VP2-466	94
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>99</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>103</b>



# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aplicaciones biotecnológicas basadas en cápsidas virales	8
<b>Figura 2.</b> Estructuras de VLPs utilizadas con fines biotecnológicos	11
<b>Figura 3.</b> Organización genómica de IBDV	17
<b>Figura 4.</b> Estructura de la cápsida de IBDV	19
<b>Figura 5.</b> Estructura atómica de VP2	21
<b>Figura 6.</b> Estructuras derivadas de la expresión de formas de (p)VP2 de diferente longitud	22
<b>Figura 7.</b> Esquema de los elementos implicados en el polimorfismo estructural de pVP2	24
<b>Figura 8.</b> Regiones implicadas en la formación de cápsidas HT-VP2-466 y modelo de la cápsida quimérica HT-VP2-466-EGFP	52
<b>Figura 9.</b> Generación de proteínas de fusión de HT-VP2-466 con EGFP	54
<b>Figura 10.</b> Purificación en gradientes de sacarosa de ensamblados de FB/HT-VP2-466 y FB/EGFP-HT-VP2-466	55
<b>Figura 11.</b> Obtención de cápsidas mixtas por coinfección de EGFP-HT-VP2-466: HT-VP2-466 en relaciones de coinfección 1:1, 3:1 y 5:1.	57
<b>Figura 12.</b> Criomicroscopía electrónica y reconstrucción 3D de cápsidas HT-VP2-466 y EGFP-HT-VP2-466	59
<b>Figura 13.</b> Análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de los antígenos utilizados en los experimentos de inmunización de ratones con cápsidas quiméricas que incorporan EGFP	60
<b>Figura 14.</b> Titulación mediante ELISA de los sueros de los ratones inmunizados en presencia de AF	61
<b>Figura 15.</b> Titulación mediante ELISA de los sueros de los ratones inmunizados en ausencia de adyuvante.	63
<b>Figura 16.</b> Diseño de las construcciones de fusión de HT-VP2-466 con antígenos del virus de la gripe.	65
<b>Figura 17.</b> Expresión y purificación de ensamblados derivados de la expresión de proteínas de fusión de HT-VP2-466 con antígenos del virus de la gripe.	66
<b>Figura 18.</b> Incorporación de HA-CAP y HA2-CAP en cápsidas mixtas mediante coinfección	68
<b>Figura 19.</b> Análisis de las VLPs quiméricas que contienen antígenos del virus de la gripe	69
<b>Figura 20.</b> Evolución del peso de los ratones sometidos a desafío con virus de la gripe A/PR8	71
<b>Figura 21.</b> Supervivencia de los ratones sometidos a desafío con el virus de la gripe	72

<b>Figura 22.</b> Caracterización por <i>dot blot</i> de los sueros de los ratones inmunizados con VLPs quiméricas que contienen antígenos del virus de la gripe	74
<b>Figura 23.</b> Evaluación del título de anticuerpo específico frente a M2 mediante ELISA	75
<b>Figura 24.</b> Ensayos de neutralización <i>in vitro</i> del virus de la gripe.	76
<b>Figura 25.</b> Seguimiento del desensamblaje y reensamblaje de la partícula de IBDV	77
<b>Figura 26.</b> Seguimiento del desensamblaje y reensamblaje de cápsidas HT-VP2-466	78
<b>Figura 27.</b> Encapsidación de ácidos nucleicos durante el reensamblado de cápsidas HT-VP2-466	79
<b>Figura 28.</b> Curvatura de los pentámeros y hexámeros en la cápsida viral	85
<b>Figura 29.</b> Comparación entre las cepas de virus de la gripe A/PR8 utilizadas para la generación de las construcciones de fusión y el desafío viral	92

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> VLPs analizadas para el desarrollo de vacunas animales	13
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos empleados para la generación de construcciones de fusión de la proteína HT-VP2-466 con EGFP	36
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos empleados para la introducción de dianas de restricción <i>NotI</i> en pFastBacHT-VP2-466	37
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos empleados para la generación de construcciones de fusión de HT-VP2-466 con antígenos del virus de la gripe A/PR8	38
<b>Tabla 5.</b> Incorporación de proteína de fusión en cápsidas mixtas	57
<b>Tabla 6.</b> Composición de las muestras utilizadas para la inmunización de ratones, expresadas por individuo y dosis	60
<b>Tabla 7.</b> Título promedio de anticuerpo específico en los sueros de ratones inmunizados en presencia de AF	61
<b>Tabla 8.</b> Título promedio de anticuerpo específico detectado en los sueros de ratones inmunizados en ausencia de adyuvantes externos	63
<b>Tabla 9.</b> Eficiencia del ensamblaje de proteínas de fusión por coinfección con CAP y M2-CAP	67
<b>Tabla 10.</b> VLPs quiméricas que contienen diferentes antígenos del virus de la gripe A/PR8 utilizadas para la inmunización de ratones	69
<b>Tabla 11.</b> Título total de anticuerpo detectado en los sueros de los ratones inmunizados con cápsidas quiméricas que contienen proteínas de gripe	73



## ABSTRACT

*Infectious bursal disease virus* (IBDV) is a polypliod, bisegmented dsRNA virus with a single, non-enveloped ~70-nm-diameter capsid with a T=13I lattice. The capsid structural units are trimers of a single protein, VP2 (441 residues). The VP2 precursor form (pVP2) is encoded as part of the polyprotein NH<sub>2</sub>-pVP2-VP4-VP3-COOH; VP4 is the viral protease, able to cleave its own N and C termini, and VP3 is a multifunctional protein with scaffolding and dsRNA-binding activities. The pVP2 71-residue C-terminal domain, which is proteolytically processed, bears the molecular switch that controls VP2 polymorphism, the <sup>443</sup>GFKDIIRAIR<sup>452</sup> amphipathic  $\alpha$ -helix. In the absence of VP3, pVP2 intermediates with this  $\alpha$ -helix assemble into genuine virus-like particles (VLP) only when expressed with an N-terminal His tag (chimeric protein HT-VP2-466).

T=13 HT-VP2-466 capsids are optimal for insertion of heterologous proteins, as they are very spacious (~77,900 nm<sup>3</sup> cargo space). We explored new HT-VP2-based chimeric capsids, using the enhanced green fluorescent protein (EGFP) fused at its N-terminal end as the initial model. As EGFP-HT-VP2-466 expression in a recombinant baculovirus system is inefficient for VLP assembly, we improved VLP yield by coexpressing EGFP-HT-VP2-466 and HT-VP2-466 proteins from two recombinant baculoviruses at various ratios; larger amounts of EGFP-HT-VP2-466 protein were assembled as VLP. Stoichiometric analysis estimated that ~240 EGFP-HT-VP2-466 copies/virion are incorporated. EGFP is incorporated with a native structure, as VLP are fluorescent. Three-dimensional cryo-electron microscopy of EGFP-containing VLP showed that EGFP molecules are located at the inner capsid surface. Chimeric EGFP-VLP particles also elicit antibodies to native EGFP when mice are immunized with purified particles. As these chimeric VLP are excellent “nanoboxes” for carrying macromolecules to living cells, other epitopes of interest derived from the murine influenza virus A/PR8 were inserted. We selected fragments of hemagglutinin (HA) and matrix (M2) proteins, both of which elicit antibodies with broad neutralizing activity. Several HA- and M2-derived chimeric capsids were used to immunize mice. Mice immunized with VLP containing HA2 (the stalk subunit), an M2 fragment, or HA2 and an M2 fragment simultaneously, produced antibodies that recognized murine influenza virus A/PR8 and/or the M2 peptide, and were fully protected against viral challenge.

Finally, we established an in vitro disassembly/self-assembly system of T=13 VLP to generate capsids similar to virions. HT-VP2-466 (empty) capsids can be disassembled and reassembled by dialysis. No previous reports indicated the reversibility of the IBDV assembly process. Furthermore, HT-VP2-466 VLP can encapsidate heterologous DNA by non-specific confinement during assembly.

These results establish a basis for future biotechnological applications based on the IBDV capsid and its ability to incorporate exogenous proteins and nucleic acids.



# **1. Introducción**



## **1.1. Virus: vacunas y aplicaciones biotecnológicas**

### **1.1.1. Estructura y función de la cápsida viral**

Los virus representan un paradigma en la optimización de recursos, ya que tienen que realizar todas sus funciones vitales mediante un reducido número de proteínas codificadas por genomas relativamente pequeños. En su forma más simple, un virus está formado por un pequeño segmento de ácido nucleico contenido en una cápsida proteica que lo protege del ambiente exterior durante su fase extracelular. Las partículas virales varían enormemente en tamaño y forma, así como también en el número y naturaleza de las macromoléculas de las que se componen. Sin embargo, desempeñan funciones similares y se rigen por unos principios generales.

La función primaria de la cápsida viral es proteger el genoma frente a agentes físicos y químicos presentes en el entorno. Además, a lo largo del ciclo viral la cápsida proteica tiene un papel activo en numerosos procesos, como el reconocimiento de receptores celulares específicos, la internalización y tráfico intracelular del virión y la liberación productiva de su genoma. La cápsida viral es una estructura dinámica, ya que para llevar a cabo estos procesos requiere cambios conformacionales de sus proteínas estructurales. Este dinamismo comienza desde la traducción del genoma vírico, cuando las proteínas de la cápsida deben plegarse y ensamblarse de manera eficiente y coordinada. Algunas cápsidas participan activamente en la encapsidación específica del genoma viral y en las reacciones químicas y/o cambios conformacionales necesarios para la maduración del virión y su salida de la célula. (Mateo, 2004; Flint *et al.*, 2009).

La estructura de la cápsida viral está adaptada a todas estas funciones, que pueden resultar aparentemente contradictorias. La cápsida necesita una elevada estabilidad estructural durante su fase extracelular para proteger su genoma, y, al mismo tiempo, debe ser suficientemente inestable para permitir la liberación del genoma en el interior de la célula huésped tras la interacción con los receptores celulares (Rossmann *et al.*, 1997; Chow *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998). Por tanto las cápsidas virales deben ser consideradas estructuras metaestables. En el caso de virus de organismos superiores, la superficie de la cápsida (que debe mantener una región conservada para reconocer el receptor celular) introduce variaciones en otras regiones superficiales para evadirse del reconocimiento y eliminación por el sistema inmune (Mateu, 1995). En general, los virus han desarrollado soluciones estructurales únicas frente a las numerosas presiones selectivas impuestas por las diversas funciones que sus cápsidas deben

desarrollar a lo largo del ciclo viral (Mateu, 1995; Johnson, 1996; Rossmann *et al.*, 1997; Chow *et al.*, 1997).

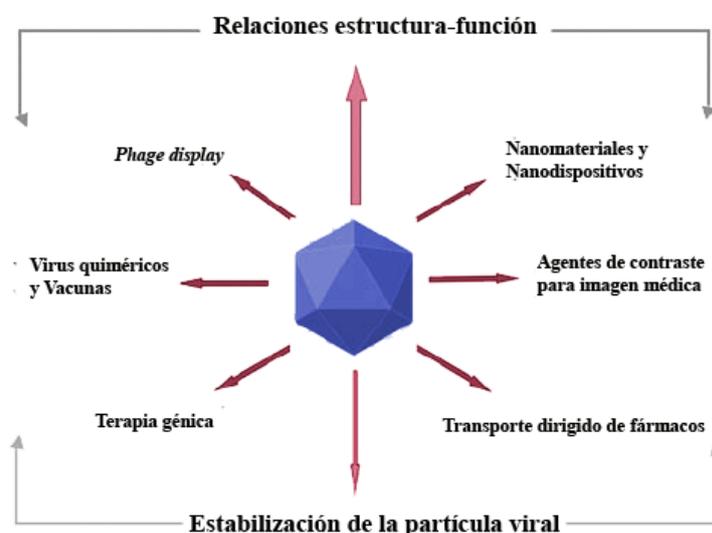
Dada la limitada capacidad codificante impuesta por el tamaño de su genoma, los virus han adoptado arquitecturas basadas en el uso de la simetría y el polimorfismo estructural de las proteínas de la cápsida. Sin considerar las envueltas lipídicas, la mayor parte de los virus presentan cápsidas con simetría helicoidal o icosaédrica (Flint *et al.*, 2009, Cann, 2012). En el primer caso las subunidades que conforman la cápsida se disponen en hexámeros planos, que proporcionan entornos idénticos, con un determinado ángulo de curvatura impuesto por las interacciones entre las subunidades y que determina el diámetro del tubo. El icosaedro es un sólido formado por veinte caras triangulares y sesenta posiciones equivalentes relacionadas por ejes de simetría rotacional de orden 2, 3 y 5. Un ensamblado icosaédrico se forma a partir de doce pentámeros (convexos) que introducen curvatura y permiten el ensamblaje de estructuras cerradas (Johnson, 2008). La cápsida icosaédrica más simple es la formada por 60 subunidades idénticas dispuestas en 12 pentámeros. La arquitectura de las cápsidas virales que están formadas por más de 60 subunidades se define según la teoría de la cuasiequivalencia (Caspar y Klug, 1962). La formación de cápsidas más grandes (a partir de múltiplos de 60 subunidades) se consigue mediante el establecimiento de interacciones cuasiequivalentes (no idénticas) entre sus subunidades, que se ensamblan tanto en pentámeros como en hexámeros. Para ello es necesaria una cierta flexibilidad conformacional de la subunidad estructural, que se consigue mediante diferentes factores denominados interruptores moleculares (*molecular switches*) y/o mediante proteínas auxiliares como proteínas de andamiaje, accesorias y/o proteasas (Dokland, 2000; Morais *et al.*, 2004). Algunas cápsidas están constituidas por distintas proteínas con conformaciones similares en lugar de una única proteína estructural con ligeras variaciones en su conformación: en este caso se habla de pseudoequivalencia.

### **1.1.2. Aplicaciones biotecnológicas de los virus**

La posibilidad de introducir modificaciones químicas y genéticas en proteínas y ácidos nucleicos, sumada al amplio conocimiento sobre la estructura y función de un número creciente de proteínas y cápsidas virales, ha permitido que en los últimos años hayan surgido numerosas aplicaciones basadas en la modificación de las propiedades de estas partículas. Las cápsidas virales pueden ser manipuladas para su uso no solo como herramientas de investigación, sino también en áreas como la medicina, la industria, la nanotecnología o la ciencia de materiales (revisado en Mateu, 2010). Así, es posible obtener virus modificados genéticamente con cambios en las superficies externa o interna de la cápsida, o bien en las zonas de contacto entre subunidades. Alternativamente, estas modificaciones pueden ser realizadas sobre

pseudopartículas virales (del inglés *virus-like particles*, VLPs), ensamblados macromoleculares estructuralmente idénticos a los virus, obtenidos generalmente a partir de la expresión recombinante de una o varias proteínas de la cápsida del virus. La manipulación de ambas superficies permite el uso de la cápsida viral modificada como transportador de biomoléculas o compuestos inorgánicos, ya sea confinados en su interior (en tal caso hablaremos de nanocontenedores) o expuestos en su superficie (denominados nanotransportadores) (Douglas y Young, 2006). La modificación de las interfases entre las subunidades proteicas persigue alterar las propiedades particulares de la cápsida tales como su estabilidad física, térmica, química y/o mecánica, para cubrir el amplio rango de exigencias impuestas por los procesos de producción, funcionalización, síntesis, almacenamiento y/o las derivadas de su uso industrial o médico (Mateu, 2010).

La caracterización estructural y funcional de numerosos virus y cápsidas virales, sumados a la ingeniería de proteínas, han proporcionado una potente herramienta para el desarrollo de multitud de aplicaciones biotecnológicas (Figura 1).



**Figura 1. Aplicaciones biotecnológicas basadas en cápsidas virales.** Los estudios de las relaciones estructura-función de virus y cápsidas virales están siendo utilizados para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas acompañados del uso de la ingeniería de proteínas. La estabilización de estas estructuras es necesaria para muchas de estas aplicaciones (*adaptado de Mateu, 2010*).

La modificación del genoma viral para introducir genes de interés, dando lugar a los denominados vectores virales, constituye hoy en día una herramienta fundamental y ampliamente utilizada en laboratorios de biología molecular. Más recientemente el mismo concepto ha sido aplicado para el desarrollo de tratamientos médicos frente a diversas

patologías genéticas humanas mediante la incorporación de genes potencialmente terapéuticos en células implicadas en estas patologías, en lo que se denominan terapias génicas (Verma y Weitzman, 2005). Estas terapias normalmente utilizan vectores tipo adenovirus, virus adeno-asociados (AAV) o retrovirus, y suelen basarse en la introducción de un gen funcional para contrarrestar los efectos de una mutación presente en el genoma del paciente. Actualmente estos vectores están siendo optimizados para minimizar peligrosos efectos secundarios. Así, se ha alterado el tropismo celular de estos virus mediante la inserción de péptidos reconocidos por receptores celulares (Asokan *et al.*, 2010) o bien por inducción de mutaciones en la superficie de la cápsida. Estas últimas con frecuencia son realizadas de manera aleatoria y posteriormente seleccionadas en función de sus propiedades, dado que los mecanismos moleculares específicos que determinan las interacciones con un determinado receptor son todavía poco conocidos (Soong *et al.*, 2000, Wu *et al.*, 2006).

Una alternativa a las terapias génicas clásicas es el uso de VLPs como vehículo para la incorporación de ácidos nucleicos foráneos (Garcea y Gissmann, 2004). Esta incorporación se puede abordar a partir de dos estrategias generales: mediante la permeabilización de la VLP por tratamientos específicos, por ejemplo un choque osmótico a baja fuerza iónica, para permitir la entrada de moléculas (Barr *et al.*, 1979), o bien mediante el ensamblaje *in vitro* de cápsidas virales a partir de sus subunidades desensambladas en presencia del ácido nucleico que se desea incorporar (Braun *et al.*, 1999). Estos procedimientos han sido también utilizados para la incorporación de moléculas más pequeñas, tales como algunos fármacos para tratamientos de quimioterapia o compuestos inorgánicos. En otros abordajes se ha modificado químicamente la superficie interna de la cápsida para que las moléculas incorporadas queden retenidas de manera estable. Por ejemplo, la carga positiva presente en la superficie interna de las cápsidas del virus del moteado clorótico del guisante (CCMV) permite la interacción y el confinamiento en su interior de algunas sales metálicas aniónicas, formando nanopartículas mineralizadas con propiedades únicas para su uso en el desarrollo de nuevos materiales (Douglas y Young, 1998). Esta carga puede ser invertida mediante ingeniería genética sin alterar el ensamblaje de las VLPs, dando lugar en este caso a un aglutinamiento de cationes metálicos (Douglas *et al.*, 2002). La capacidad de estas cápsidas de unir metales puede ser aprovechada también para su utilización como agentes de contraste específicos para imágenes de resonancia magnética (Allen *et al.*, 2005).

Las cápsidas virales y las VLPs también pueden ser modificadas para la presentación de péptidos y proteínas heterólogas en su superficie interna o externa. En este sentido la tecnología pionera fue la denominada *phage display* (Smith, 1985), que se basa en la fusión genética de

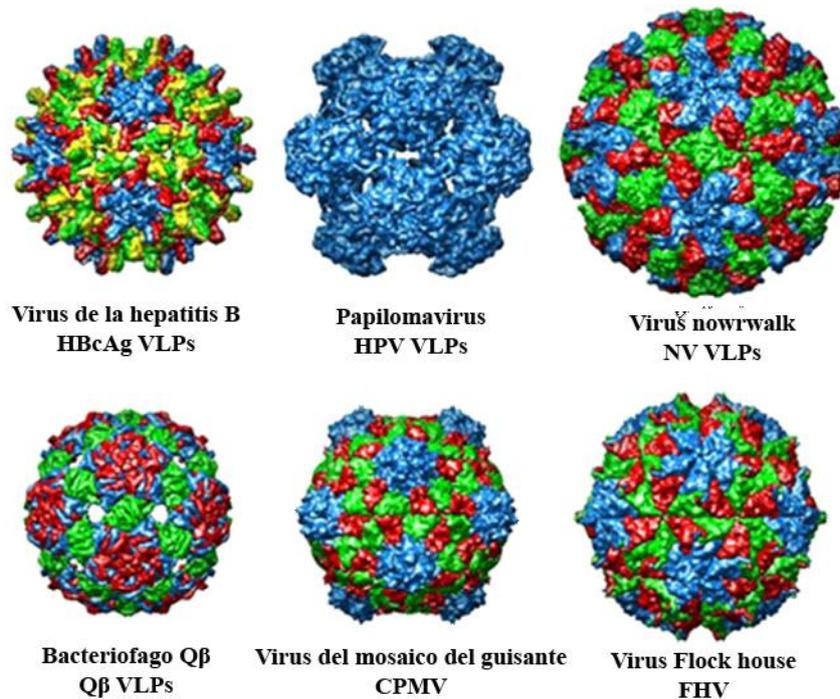
péptidos de interés sobre el gen de la proteína de la cápsida de un bacteriófago filamentoso como el fago M13. De esta manera se genera una librería de viriones que expresan diferentes péptidos en su superficie, y que son seleccionados para una propiedad específica. Este sistema constituye una plataforma muy versátil que permite el análisis simultáneo de multitud de variaciones en los péptidos presentados. En una aproximación similar, la fusión génica sobre proteínas integrantes de cápsidas virales puede ser aplicada para la generación de cápsidas quiméricas a partir de numerosas VLPs. Estas VLPs quiméricas pueden ser diseñadas y modificadas para presentar epítomos deseados en su superficie, actuando como plataformas de presentación ordenada y repetitiva que favorecen la capacidad inmunogénica del péptido heterólogo que incorporan. Este tipo de cápsidas están siendo objeto de un gran interés por su aplicabilidad como vacunas. Dada su relevancia en el contexto del presente trabajo, el uso de VLPs y de VLPs quiméricas para el desarrollo de vacunas se discutirá en profundidad en los siguientes apartados.

### **1.1.3. Propiedades generales de las VLPs**

Las VLPs son ensamblados macromoleculares que, al igual que los virus, presentan un alto grado de simetría y una geometría bien definida, normalmente icosaédrica o helicoidal (Johnson y Chiu, 2000). Las VLPs se obtienen mediante el empleo de vectores recombinantes que expresan una o varias proteínas de la superficie del virus, y, como son estructuralmente indistinguibles de los virus, mantienen propiedades como la capacidad de reconocimiento de receptores e internalización en las células, y son altamente inmunogénicas, pero al no contener genoma no son infectivas. Por todo ello las VLPs se han utilizado intensivamente para estudios básicos como la descripción de la estructura, función y ensamblaje de las cápsidas de numerosos virus, especialmente de aquellos que requieren medidas especiales de bioseguridad o que no pueden adaptarse a crecer en células en cultivo.

La capacidad de autoensamblaje de las proteínas de la cápsida viral se demostró con el virus del mosaico del tabaco (TMV) a partir de sus subunidades disociadas y RNA (Butler y Klug, 1971). Posteriormente, el desarrollo de sistemas de expresión recombinante permitió la producción eficiente de VLPs a partir una o varias proteínas en ausencia del genoma viral. Las primeras VLPs producidas de manera recombinante se obtuvieron mediante la expresión del gen del antígeno de superficie HBsAg del virus de la hepatitis B (HBV) en *Saccharomyces cerevisiae*, dando lugar a partículas subvirales de 22 nm de diámetro similares a las encontradas en plasma de individuos infectados por este virus (Valenzuela *et al.*, 1982; McAleer *et al.*, 1984), y de la proteína HBcAg del mismo virus en *Escherichia coli*, obteniendo en este caso a estructuras

similares a la nucleocápsida del virus (Miyanojara *et al.*, 1986) Desde entonces se han descrito VLPs de más de 30 virus diferentes que infectan animales y otros muchos virus de plantas (Figura 2).



**Figura 2. Estructura de VLPs utilizadas con fines biotecnológicos.** Cápsidas del virus de la hepatitis B (PDB 1QGT), del papilomavirus humano (1DZL), del virus Norwalk (1IHM), del bacteriófago Q $\beta$  (1QBE), del virus del mosaico del guisante (CPMV) (1NY7) y del virus FHV (2Z2Q)

Las VLPs pueden producirse en numerosos sistemas de expresión recombinante, incluyendo bacterias, levaduras, plantas y células de insecto y de mamífero. La expresión en bacterias y levaduras da lugar a una producción muy eficiente de proteína; sin embargo, no suelen ser apropiados debido a la complejidad que representa la correcta maduración y ensamblaje de las proteínas virales (Cox, 2012). El sistema más extendido para expresar proteínas heterólogas se basa en los baculovirus recombinantes (rBVs) en células de insecto. Este sistema proporciona un elevado rendimiento, y además introduce modificaciones post-traduccionales similares a las que se producen en células de mamífero, facilitando el correcto plegamiento de las proteínas y la formación de estructuras. Este sistema permite el ensamblaje de VLPs complejas derivadas de la coexpresión de varias proteínas (Noad y Roy, 2003). Además, se trata de una tecnología rápida y sencilla, fácilmente escalable (Maranga *et al.*, 2002) y de bajo riesgo biosanitario, ya que los baculovirus solo infectan un estrecho rango de lepidópteros y son muy susceptibles a la inactivación por tratamiento químico (Rueda *et al.*, 2000).

#### **1.1.4. Vacunas basadas en VLPs**

Las vacunas clásicas son ampliamente utilizadas en la actualidad para la prevención de enfermedades infecciosas. Este tipo de vacunas están compuestas por formas de virulencia reducida del patógeno causal (vacunas vivas) o bien por el patógeno inactivado por tratamientos físicos o químicos (vacunas muertas). Ambas vacunas han demostrado una protección eficiente frente a la infección ya que han permitido el control e incluso erradicación de algunas enfermedades. Sin embargo existen ciertos inconvenientes relacionados con la bioseguridad, como el riesgo de reversión del patógeno a un fenotipo virulento, una inactivación incompleta o fugas en el proceso de producción de las vacunas (Cottam, 2007), que ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas estrategias vacunales. Otra limitación de este tipo de vacunas para su aplicación en el campo veterinario es la incapacidad de distinguir en ensayos serológicos los individuos vacunados de los infectados. Debido a estos factores se han adoptado políticas a nivel europeo de no vacunación contra importantes patógenos animales tales como el virus de la fiebre aftosa (FMDV) (revisado en Blanco y Bárcena, 2013).

Una primera alternativa vacunal la constituyen las denominadas vacunas sintéticas o de subunidad, basadas en componentes aislados de los patógenos, como proteínas recombinantes o péptidos sintéticos. Al no utilizar patógenos vivos en ninguna etapa de su fabricación son mucho más seguras, pero también suelen ser mucho menos inmunogénicas con respecto al patógeno completo (Rogan y Babiuk, 2005). Para contrarrestarlo se deben utilizar grandes dosis, produciendo un incremento de los costes que, en el ámbito veterinario, es un aspecto crucial para su implantación. Además, su baja inmunogenicidad requiere el empleo de potentes adyuvantes vacunales, que pueden provocar severos efectos secundarios.

Las vacunas basadas en VLPs combinan importantes ventajas de las vacunas convencionales ya que mimetizan la estructura general de los viriones y por ello son muy inmunogénicas; además apenas presentan inconvenientes biosanitarios, ya que al no contener genoma no presentan riesgo de reversión y no se emplean patógenos infecciosos en su producción. La elevada inmunogenicidad de las VLPs viene dada por su estructura altamente ordenada y repetitiva, que constituye patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Este tipo de ordenamiento, distintivo de agentes patógenos y ausente en las células eucariotas, es un potente activador del sistema inmune. La inmunogenicidad de un antígeno se ve incrementada cuando se presenta formando este tipo de estructuras, permitiendo el uso de menores dosis y reduciendo los costes de la vacunación.

Las VLPs no solo inducen una potente respuesta inmune mediada por células B (alta producción de anticuerpos) sino que también son eficientemente incorporadas y procesadas por células presentadoras de antígenos y además inducen la proliferación de linfocitos T, responsables de la respuesta celular y la memoria inmunológica, cruciales para el éxito de la estrategia de vacunación (revisado en Crisci *et al.*, 2012). Estas propiedades han llevado a describir a las VLPs como “sistemas auto-adyuvantes de transporte de inmunógenos”.

En la actualidad existen vacunas basadas en VLPs en varias fases de desarrollo y se encuentran disponibles comercialmente vacunas humanas basadas en VLPs frente a HBV y el papilomavirus humano (HPV) (Chackerian, 2007). También en el ámbito veterinario se están obteniendo resultados prometedores y VLPs derivadas de numerosos virus están siendo probadas para su utilización como vacunas (Tabla 1, Brun *et al.*, 2011).

**Tabla 1. VLPs analizadas para el desarrollo de vacunas animales**

<b>Virus</b>	<b>Familia</b>	<b>Especie animal</b>
Virus de la fiebre hemorrágica del conejo (RHDV), Calicivirus felino (FCV)	Caliciviridae	Conejos
Parvovirus porcino, parvovirus canino, virus de la enteritis del visón	Parvoviridae	Cerdos, perros, visones
Virus de la bursitis infecciosa	Birnaviridae	Pollos
Nodavirus	Nodaviridae	Peces
Virus de la enfermedad de Newcastle	Paramyxoviridae	Pollos
Virus de la gripe A	Orthomyxoviridae	Ratones, patos
Virus de la fiebre del valle del Rift	Bunyaviridae	Ratones
Virus de la lengua azul	Reoviridae	Ovejas

*\*Adaptado de Brun et al., 2011*

### **1.1.5. VLPs como presentadoras de antígenos exógenos**

Además de su potencial como vacuna contra el virus homólogo del que derivan, las VLPs también constituyen plataformas óptimas para la presentación de antígenos de interés, ya que pueden usarse como superficies presentadoras y además ejercer el efecto adyuvante anteriormente mencionado sobre el antígeno heterólogo (Plummer y Manchester, 2010). La resolución de numerosas estructuras atómicas y pseudoatómicas de cápsidas virales gracias al uso de la criomicroscopía electrónica y la cristalografía de rayos X está permitiendo el diseño de proteínas quiméricas en las cuales se insertan epítomos de interés en posiciones determinadas de las proteínas que conforman la cápsida de diferentes virus (Ludwig y Wagner, 2007). Las

regiones de inserción más utilizadas suelen ser zonas flexibles o *loops* que quedan expuestos en la superficie, o bien las regiones N y C-terminales, que pueden encontrarse accesibles u orientadas hacia el interior de la cápsida. De este modo, epítomos pequeños que de forma aislada no estimulan al sistema inmune dan lugar a respuestas protectoras cuando se presentan en forma particulada (Grgacic y Anderson, 2006). Estudios realizados con VLPs de HBV han demostrado que la magnitud de la respuesta inmune inducida por un mismo epítomo varía en función de su posición dentro de la VLP, siendo más eficiente cuando se sitúa en una posición expuesta en la superficie (Schodel *et al.*, 1992). Las plataformas utilizadas para la presentación de antígenos heterólogos incluyen VLPs icosaédricas derivadas de virus animales y de bacteriófagos, así como VLPs helicoidales filamentosas como las derivadas de TMV y CPMV (revisado en Crisci *et al.*, 2012).

Una limitación a estos sistemas viene dada por el tamaño del inserto admitido para que la proteína estructural se pliegue correctamente. Por ello, se suelen insertar epítomos que no superan los 50 residuos (Plummer y Manchester, 2010). En ocasiones los epítomos de pequeño tamaño no adoptan su conformación nativa y, para dar lugar a una respuesta eficiente, se requiere la inserción de todo un dominio o de la proteína completa. Algunas VLPs pueden incluir insertos de gran tamaño sin alterar su integridad estructural. Por ejemplo, se ha descrito que hay dos *loops* superficiales en las VLPs de FHV, que admiten insertos de varios cientos de residuos, como el denominado antígeno protector (PA) de *Bacillus anthracis*, el agente causativo del ántrax (Manayani *et al.*, 2007, Venter y Schneemann, 2008). Otro ejemplo es el fragmento de 395 aa de la proteína de la envuelta del virus del Dengue, que fusionado a la proteína HsAg de HBV da lugar a VLPs en levaduras, e induce una respuesta inmune doble en ratones (Bisht *et al.*, 2002). Otro sistema con gran potencial para la fusión de este tipo de antígenos es la proteína Hoc, que contribuye a la estabilidad de la cápsida del bacteriófago T4. Aunque no es un componente integral de la cápsida, la fusión de Hoc con antígenos de gran tamaño (entre ellos el antígeno PA de *B. anthracis*) no impide su interacción con la cápsida de T4 y la inmunización con cápsidas así formadas da lugar a una respuesta inmune contra todos los antígenos fusionados (Shivachandra *et al.*, 2007).

Aunque las VLPs que admiten inserciones de gran tamaño suelen ser excepcionales, los ejemplos descritos anteriormente ofrecen resultados prometedores en cuanto a su efectividad y versatilidad. No obstante, en ocasiones un epítomo relativamente pequeño puede inducir una respuesta protectora, como es el caso del dominio extracelular de la proteína M2 del virus de la gripe A. Este antígeno presentado en la superficie de VLPs de HBV proporciona protección en ensayos de desafío letal de ratones (Jegerlehner *et al.*, 2002; Neiryneck *et al.*, 1999). Por todo

ello, las VLPs quiméricas constituyen una herramienta con gran potencial para el desarrollo de una nueva generación de vacunas.

## 1.2. El virus de la bursitis infecciosa

El virus de la bursitis infecciosa (IBDV) pertenece a la familia *Birnaviridae*, que agrupa a virus cuyo genoma está formado por dos segmentos de RNA bicatenario (dsRNA) (Dobos *et al.*, 1979). Dentro de ella existen cuatro géneros (Delmás, 2012):

- *Avibirnavirus*, que infectan aves, y cuyo miembro más representativo es IBDV
- *Aquabirnavirus*, que infectan peces, moluscos y crustáceos y cuyo prototipo es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV)
- *Entomovirnavirus*, al cual pertenece el virus X de *Drosophila* (DXV) y que infectan insectos
- *Blosnavirus*, cuyo único miembro, el virus del pez cabeza de serpiente (*Channa maculata*) o *Blotched snakehead virus* (BSNV), infecta al pez de la especie que le da nombre.

De todos ellos, IBDV e IPNV han sido los más ampliamente estudiados debido a su importante impacto económico en las industrias avícola y piscícola, respectivamente (Müller, 2003).

### 1.2.1. La bursitis infecciosa

IBDV es el agente causal de la bursitis infecciosa o enfermedad de Gumboro, descrita formalmente en 1962 (Cosgrove, 1962). Se trata de una enfermedad que afecta a pollos jóvenes destruyendo la bolsa de Fabricio (Kaufer y Weiss, 1980) y provocando una severa inmunosupresión en los individuos afectados, que se vuelven muy susceptibles a patógenos oportunistas. Otra consecuencia derivada de la inmunosupresión en individuos infectados por IBDV es la reducida capacidad para responder a la vacunación frente a otros patógenos (Müller, 2003). IBDV se caracteriza por ser altamente transmisible por vía oral, especialmente entre individuos de entre 3 y 6 semanas de edad, y muy resistente a los métodos de inactivación tradicionales como la inactivación química o por calor. En la actualidad, el único método de control eficaz de la bursitis infecciosa se basa en programas de vacunación intensivos (Mahgoub, 2012). Las vacunas contra IBDV disponibles en la actualidad incluyen vacunas vivas atenuadas, vacunas inactivadas o muertas y vacunas complejas preparadas a partir de una mezcla de virus atenuado con suero de pollos infectados con el patógeno. La ruta de aplicación varía desde la administración *in ovo*, oral suministrada en el agua, o mediante inyección intramuscular.

El uso intensivo de vacunas atenuadas puede ser responsable de la aparición de cepas variantes e hipervirulentas de IBDV, que causan una mortalidad de entre el 50-90% de los individuos infectados, y que están siendo aisladas en diferentes continentes desde la década de los 90 (Murphy *et al.*, 1999). Por ello están siendo evaluadas nuevas estrategias de vacunación que evitan el uso de patógenos vivos. Por un lado, se están desarrollando vacunas de DNA que incluyen la secuencia de la proteína de la cápsida (VP2) o de la poliproteína viral completa que confieren una protección variable contra el desafío con IBDV dependiendo del régimen y vía de administración (Fodor *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2003; Rong *et al.*, 2007; revisión en Mahgoub *et al.*, 2012). Otra estrategia en fase de desarrollo es la utilización de vectores virales para la presentación de la proteína VP2, mediante la expresión recombinante de la proteína completa, de algún fragmento de la misma (Martinez-Torrecuadrada *et al.*, 2003; Pradhan *et al.*, 2012) o utilizando otro virus aviar como vehículo presentador, como el virus de la enfermedad de Marek (Tsukamoto *et al.*, 1999; Tsukamoto *et al.*, 2002), adenovirus aviar (Francois *et al.*, 2004), herpesvirus del pavo (Bublott *et al.*, 2007) o el virus de la viruela aviar (Butter *et al.*, 2003). Estas vacunas recombinantes tienen un gran potencial ya que pueden proporcionar protección contra varios agentes infecciosos de manera simultánea, implicando una reducción de costes que puede ser decisiva para su implantación comercial.

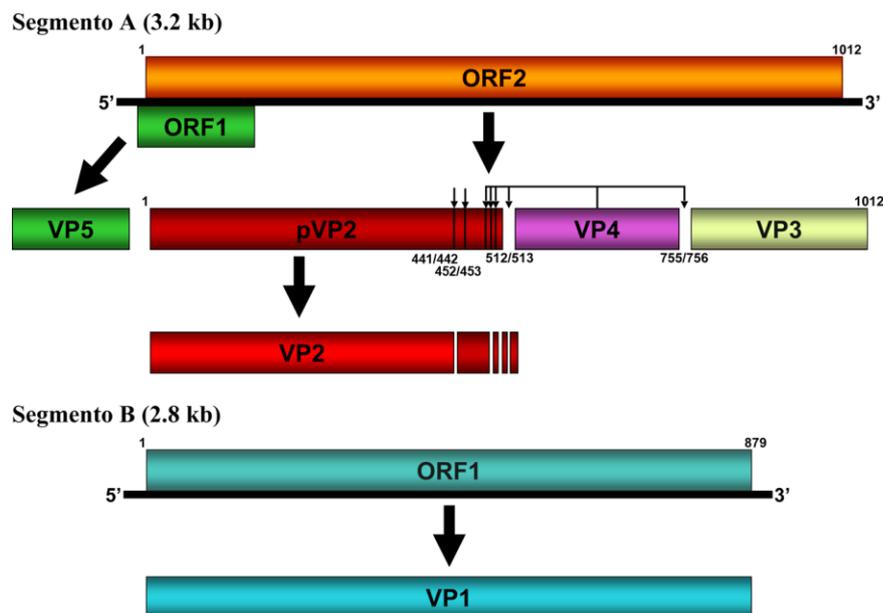
### 1.2.2. Organización genómica de IBDV

El genoma de IBDV está organizado en dos segmentos de dsRNA, el segmento A, de 3,2 kb, y el segmento B, de 2,8 kb, flanqueados por regiones no codificantes (UTRs) en ambos extremos (Muller y Nitschke, 1987a; Muller *et al.*, 1979). IBDV es un virus poliploide que encapsida hasta cuatro segmentos de genoma, siendo más infectivas las partículas que contienen un mayor número de segmentos (Luque *et al.*, 2009b). El dsRNA en el interior de la cápsida forma complejos ribonucleoproteicos (RNPs) con la proteína VP3 a lo largo del segmento, y con la polimerasa viral VP1, que se encuentra soluble y unida a los extremos 5' (denominada VPg) (Hjalmarsson *et al.*, 1999; Luque *et al.* 2009).

El **segmento A** contiene dos fases abiertas de lectura (ORFs) parcialmente solapantes, la primera de ellas codifica la proteína **VP5** (145aa, 17 kDa), una proteína citolítica de membrana, no esencial para la replicación del virus en cultivos celulares (Mundt *et al.*, 1997) e implicada en la liberación de la progenie viral *in vivo* (Lombardo *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2009). VP5 inhibe la apoptosis en estadios iniciales de la infección (Liu y Vakharia, 2006; Wei *et al.*, 2011). La segunda ORF codifica una poliproteína de 107 kDa (1012 aa) que se autoproteolíticamente de manera cotraduccional mediante la acción de la proteasa viral **VP4** (244 aa,

25 kDa) para dar lugar a **pVP2** (542 aa, 54 kDa), **VP4** y **VP3** (256 aa, 28 kDa) (Kibenge *et al.*, 1988 a y b).

El **segmento B** contiene una única ORF que codifica la RNA polimerasa-RNA dependiente (RdRp), **VP1** (879 aa, 97 kDa) (Muller y Nitschke, 1987b, Morgan *et al.*, 1988). Al igual que las polimerasas de otros virus dsRNA, VP1 cataliza tanto la transcripción como la replicación del genoma viral (Garriga *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2007; Spies *et al.*, 1987).



**Figura 3. Organización genómica de IBDV.** El segmento A contiene dos ORFs que codifican la proteína VP5 y la poliproteína viral, que es procesada cotraduccionalmente por la proteasa viral VP4 dando lugar a las proteínas pVP2, VP4 y VP3. El extremo C-terminal de pVP2 es procesado en las posiciones indicadas por diferentes factores virales y celulares. El segmento B contiene una única ORF que codifica la RdRp del virus, VP1, que cataliza la transcripción y la replicación del genoma.

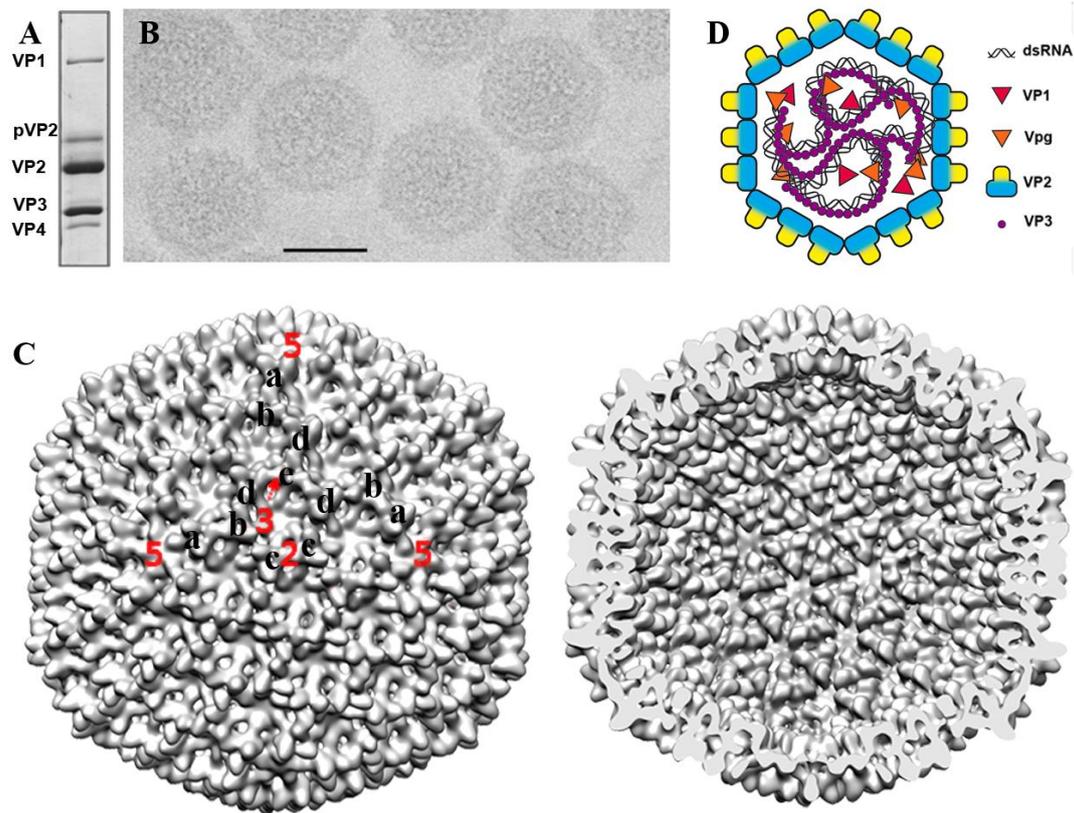
### 1.2.3. Componentes estructurales de IBDV

La partícula infectiva de IBDV carece de envuelta lipídica. Los componentes mayoritarios del virión son VP2 (junto con una pequeña cantidad de pVP2) y VP3; la proteasa VP4 y la polimerasa VP1 se encuentran en menor proporción (Dobos *et al.*, 1979) (Figura 4A). La cápsida de IBDV presenta un diámetro externo de ~70 nm y está formada únicamente por trímeros de pVP2/VP2 (Coulibaly *et al.*, 2005; Saugar *et al.*, 2005b) siguiendo una topología molecular basada en un número de triangulación  $T=13$  *levo* (Böttcher *et al.*, 1997; Castón *et al.*, 2001) (Figura 4B y C). Considerando la geometría de la cápsida y las interacciones entre

los trímeros de VP2 se pueden distinguir cinco clases de trímeros (a-e), que se organizan formando 20 pentámeros y 120 hexámeros (Figura 4C). La estequiometría de la partícula viral incluye 780 copias de pVP2/VP2, ~450 copias de VP3, ~12 copias de VP1 y un número variable, entre 30-60 copias, de VP4 (Luque *et al.*, 2009a). En el virión maduro, el dsRNA viral se encuentra unido a VP1 en sus extremos 5' (Xu *et al.*, 2004) y recubierto por VP3, formando complejos ribonucleoproteicos (RNPs) (Figura 4D) (Luque *et al.*, 2009b).

La proteína de la cápsida se sintetiza como un precursor, **pVP2** (512 aa), que es procesado postraduccionalmente en su extremo C-terminal para dar lugar a la forma madura, **VP2** (441 aa). Esta maduración está mediada por varias proteasas virales y celulares. Además de la diana Ala-Ala del enlace peptídico 512-513, la proteasa viral VP4 puede llevar a cabo el procesamiento en las dianas secundarias 501-502, 494-495 y 487-488 (Sánchez y Rodríguez, 1999). La enzima aminopeptidasa sensible a puromicina (PurSA), presente en las células susceptibles a infección por IBDV, proteoliza el enlace entre los residuos Arg452-Arg453 generando una forma intermedia de 452 aa (Irigoyen *et al.*, 2012). El procesamiento final entre los residuos Ala441-Phe442 lo lleva a cabo la propia VP2 mediante una actividad autoproteolítica en *cis* a través del residuo catalítico Asp431 (Irigoyen *et al.*, 2009). Los pequeños péptidos liberados durante la maduración, que dan cuenta de un tamaño total de 7.4 kDa y están constituidos por varias hélices  $\alpha$ , permanecen asociados a la partícula viral (Da Costa *et al.*, 2002), y están implicados en la desestabilización de la membrana celular para facilitar la entrada del virus (Chevalier *et al.*, 2005; Galloux *et al.*, 2007).

La proteína **VP3** está implicada en numerosos procesos esenciales en el ciclo viral. VP3 es una proteína de andamiaje, necesaria para el correcto ensamblaje de la partícula viral; esta función está mediada por interacciones electrostáticas entre los residuos de carácter ácido de su extremo C-terminal con la hélice anfipática  $\alpha 5$  que comprende los residuos 443-452 en el extremo C-terminal de pVP2 (Saugar *et al.*, 2010; Saugar *et al.*, 2005a; Ona *et al.*, 2004). VP3 tiene la capacidad de interactuar consigo misma formando dímeros y oligómeros (Tacken *et al.*, 2002; Casanas *et al.*, 2008), con VP1 a través de la región C-terminal (Tacken *et al.*, 2000; Maraver *et al.*, 2003a), induciendo la liberación del sitio activo de la RdRp y por tanto actuando como un activador transcripcional (Garriga *et al.*, 2007), y con el dsRNA constituyendo las RNPs virales (Luque *et al.*, 2009b). El complejo formado por VP3, VP1 y el dsRNA es transcripcionalmente activo (Luque *et al.*, 2009b). VP3 interactúa con el dsRNA a través de residuos básicos agrupados en dos regiones de la superficie de la proteína (residuos Lys99, Arg102, Lys105 y Lys106; y Arg159, Arg168, His198 y Arg200) (Casanas *et al.*, 2008, Valli *et al.*, 2012). Debido



**Figura 4. Estructura de la cápsida de IBDV.** (A) Análisis SDS-PAGE de una purificación de viriones de IBDV, donde se muestran las bandas correspondientes a todas las proteínas estructurales. (B) Imagen de criomicroscopía electrónica de viriones de IBDV. (C) Estructura tridimensional de la superficie externa e interna de la partícula de IBDV, donde se indican los ejes de simetría de orden 2, 3 y 5 y los 5 tipos de trímeros (a-e). (D) Modelo de la partícula de IBDV que encapsida 4 segmentos ribonucleoproteicos formados por el dsRNA, VP3 y VP1 en su forma VPg.

a estas características, VP3 suprime el silenciamiento por RNAs mediante la unión a fragmentos de dsRNA (Valli *et al.*, 2012), e impide la fosforilación de la proteína quinasa dependiente de dsRNA (PKR) y del factor IF2 $\alpha$ , siendo responsable de la actividad antiapoptótica (Busnadiago *et al.*, 2012).

La proteasa viral, **VP4**, es una proteasa no canónica de la familia de las Lon proteasas bacterianas, cuyo centro activo está formado por una diada catalítica Ser652/Lys692 pero carece del dominio ATPasa característico del resto de proteasas de la familia (Birghan *et al.*, 2000). Las dianas principales de VP4 son los enlaces de los dipéptidos Ala-Ala localizados entre los residuos 512-513 y 755-756 de la poliproteína viral (Birghan *et al.*, 2000; Lejal *et al.*, 2000; Petit *et al.*, 2000). Además, el extremo C-terminal de VP2 presenta tres dianas secundarias que

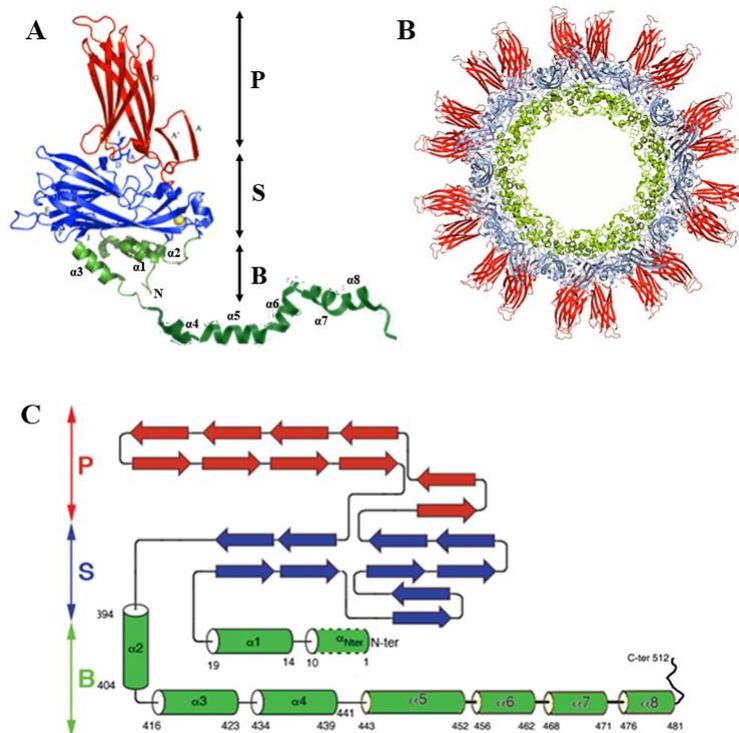
son procesadas por VP4 de manera postraduccional y más lenta. VP4 es un componente estructural del virión y también se encuentra en células infectadas por IBDV formando tubos helicoidales denominados tubos de tipo II, de ~25 nm de diámetro y función desconocida (Granzow *et al.*, 1997). Aunque la estructura cuaternaria de estos complejos macromoleculares no está resuelta, se dispone de las estructuras atómicas de varias VP4 de diferentes miembros de la familia *Birnaviridae* (Feldman *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Chung y Paetzel, 2011).

La RdRp viral, **VP1**, se encuentra tanto libre en la partícula viral como asociada al genoma en forma de VPg. La resolución de su estructura atómica mostró una permutación de los motivos que componen el dominio catalítico (dominio *palma*) que la diferencia de las RdRps de otros virus dsRNA (Garriga *et al.*, 2007). VP1 se autoguanidila y actúa como cebador para la síntesis de RNA sin necesidad de otras proteínas virales (Dobos, 1993; Spies y Muller, 1990; Shwed *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2004). Tras ese proceso, la proteína VP1 que ha actuado como cebador permanece covalentemente unida a los extremos 5' del RNA viral de nueva síntesis (Xu *et al.*, 2004).

#### **1.2.4. Estructura atómica de VP2**

La estructura atómica de VP2 fue resuelta por cristalografía de rayos X de subpartículas virales (SVPs), que son cápsidas icosaédricas con simetría T=1 constituidas por 60 copias de VP2 (PDB 1WCD, 2GSY y 2DF7, Coulibaly *et al.*, 2005; Garriga *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). VP2 está organizada en tres dominios claramente diferenciados denominados protuberante (*protruding*, P), armazón (*shell*, S) y basal (*base*, B). Los dominios P y S son barriles  $\beta$  orientados de forma perpendicular (P) y tangencial (S) a la superficie de la partícula. El dominio B comprende los extremos N y C-terminales de VP2, ambos organizados en una sucesión de hélices  $\alpha$  dispuestas hacia el interior de la partícula viral (Coulibaly *et al.*, 2005; Garriga *et al.*, 2006).

La unidad básica del ensamblaje de IBDV es un trímero de VP2. Este trímero está estabilizado por grandes superficies de contacto a lo largo de los dominios S y B y reforzada por la coordinación de un ion  $\text{Ca}^{2+}$  con dos residuos ácidos aportados el dominio P de cada monómero. La estructura de la cápsida se encuentra estabilizada mediante contactos laterales intertriméricos entre los dominios S y B, y por el intercambio molecular (*molecular swapping*) de una hélice  $\alpha$  de cada monómero entre trímeros adyacentes (Garriga *et al.*, 2006).



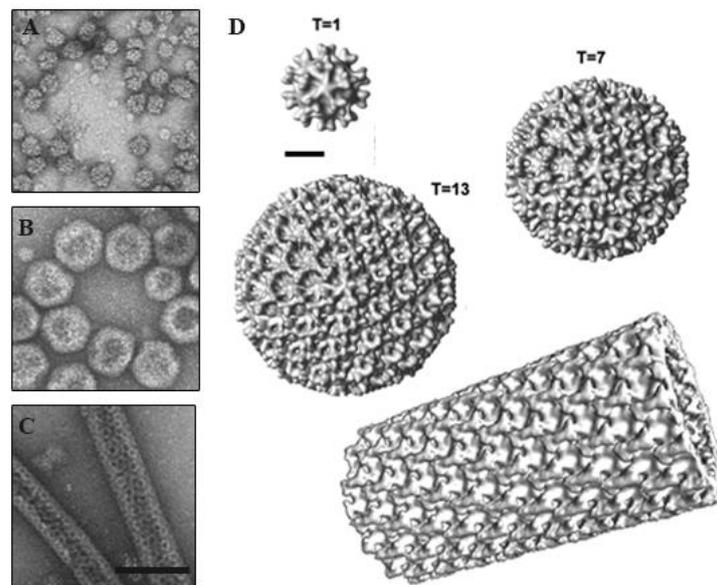
**Figura 5. Estructura atómica de VP2.** (A) Estructura atómica de un monómero de VP2 de 452 residuos (PDB 2GSY, Garriga *et al.*, 2006) donde se muestran los dominios P (*protruding*, rojo), B (*base*, verde) y S (*shell*, azul). Las hélices  $\alpha$  adicionales del dominio C-terminal ( $\alpha 4$ - $\alpha 8$ ) han sido determinadas por resonancia magnética nuclear (RMN) (Galloux *et al.*, 2007) y se muestran en verde oscuro a continuación del último residuo resuelto en la estructura cristalográfica. (B) Sección transversal de la cápsida T=1 de VP2-452 donde se aprecia la disposición de los dominios en la partícula icosaédrica. (C) Diagrama topológico de VP2 donde se indican los elementos de estructura secundaria. Los dominios P y S están constituidos por barriles  $\beta$ , mientras que el dominio B está compuesto por hélices  $\alpha$ .

### 1.2.5. Polimorfismo estructural de la proteína de la cápsida de IBDV

Los mecanismos moleculares que controlan el polimorfismo estructural de la cápsida de IBDV han sido caracterizados intensivamente en los últimos años a partir de sistemas de expresión basados en baculovirus recombinantes (rBVs) y virus vaccinia recombinantes (rVV) (Saugar *et al.*, 2005a; Ona *et al.*, 2004; Luque *et al.*, 2007; Irigoyen *et al.*, 2009; Saugar *et al.*, 2010). La expresión de la poliproteína de IBDV en células de mamífero mediante un rVV permite la obtención de VLPs estructuralmente idénticas a la cápsida del virión y compuestas por pVP2, VP2 y VP3 (Castón *et al.*, 2008). En este contexto celular el procesamiento de la poliproteína es completo y por tanto se generan correctamente todas las proteínas (Fernández-Arias *et al.*, 1998). La coexpresión del rVV que expresa la poliproteína con un rVV que expresa VP1 da lugar a VLPs que incorporan VP1 (Lombardo *et al.*, 1999). Sin embargo, la expresión de la poliproteína en células de insecto mediante el uso de rBVs da lugar mayoritariamente a tubos

rígidos de ~50 nm de diámetro con un ordenamiento helicoidal (Martínez-Torrecuadrada *et al.*, 2000; Chevalier *et al.*, 2002), similares a los observados en células infectadas con IBDV a tiempos largos post-infección (Granzow *et al.*, 1997). La baja eficiencia de formación de cápsidas en este sistema se atribuye, entre otros factores, a la ausencia o al funcionamiento deficiente en células de insecto de un factor necesario para la formación de pentámeros a partir de pVP2, la proteasa celular PurSA (Irigoyen *et al.*, 2012), que además tiene como consecuencia el procesamiento del dominio C-terminal de VP3 (Maraver *et al.*, 2003b), fundamental para su función de andamiaje.

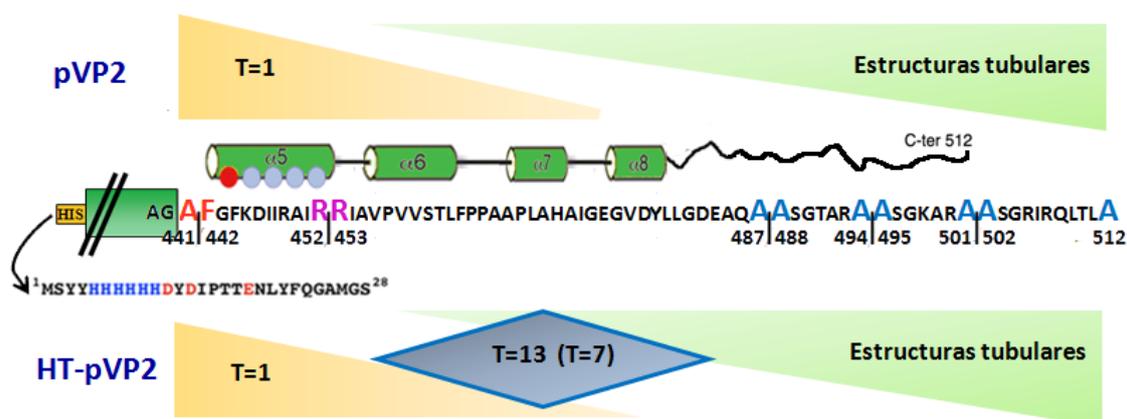
La expresión de VP2 mediante rBVs en ausencia de otras proteínas virales da lugar a la formación de SVPs de ~26 nm de diámetro y geometría T=1 (Figura 6, Caston *et al.*, 2001), donde los trímeros de VP2 están agrupados exclusivamente en pentámeros. La expresión en el mismo sistema de la forma precursora pVP2 da lugar a estructuras tubulares poco regulares donde los trímeros de proteína siguen un ordenamiento hexagonal, indicando que el extremo C-terminal de pVP2 es el responsable del control del polimorfismo estructural inherente a esta



**Figura 6. Estructuras derivadas de la expresión de formas de pVP2 con extremos C-terminales de distinta longitud.** Imágenes de tinción negativa de las diferentes estructuras derivadas de la expresión de pVP2. (A) La expresión de un rBV que expresa la forma madura de VP2 (441 aa) da lugar a cápsidas T=1, producto del ensamblaje de los trímeros de VP2 en pentámeros. (C) La expresión en el mismo sistema de la proteína precursora completa, pVP2 512, da lugar a ensamblados tubulares con un patrón hexagonal. (B) Para que pentámeros y hexámeros se combinen de forma eficiente en cápsidas T=13 se requiere la expresión de formas de longitud intermedia (VP2 456-476) fusionadas a un *tag* de His en su extremo N-terminal. (D) Reconstrucciones tridimensionales de los diferentes ensamblados descritos a partir de imágenes de criomicroscopía electrónica.

proteína. Mediante el estudio de una batería de rBVs que expresan versiones de VP2 con diferentes extensiones de su extremo C-terminal, desde pVP2 (512 aa) hasta la forma madura VP2 (441 residuos) se determinó que el interruptor molecular que dirige el ensamblaje de trímeros en hexámeros o pentámeros está localizado en la hélice anfipática  $\alpha 5$ , que comprende la región <sup>443</sup>GFKDIIRAIR<sup>452</sup> de pVP2 (Galloux *et al.*, 2007; Saugar *et al.*, 2005a). Sin embargo, este elemento por sí solo no es suficiente para el ensamblaje de cápsidas T=13. Aunque las formas de longitud intermedia VP2-456 y VP2-466 pueden ensamblarse tanto en pentámeros (SVPs T=1) como en hexámeros (estructuras tubulares), éstos no se combinan de manera eficiente para la producción de cápsidas T=13; para ello se deben expresar con un *tag* de His unido covalentemente a su extremo N-terminal, proteínas denominadas HT-VP2-456 y HT-VP2-466 (Figura 7) (Saugar *et al.*, 2005a); el *tag* de His puede ser sustituido por el extremo C-terminal de VP3 (Saugar *et al.*, 2010). La función de andamiaje de VP3 está mediada por interacciones Arg449 de la hélice  $\alpha 5$  anfipática de pVP2. (Saugar *et al.*, 2010).

Los diversos estudios realizados para caracterizar las interacciones entre los diferentes componentes de IBDV han permitido establecer un modelo de ensamblaje de la partícula viral. El primer estadio morfogenético debe implicar la formación de una procápsida esférica, como se ha descrito para IPNV (Villanueva *et al.*, 2004). A partir del uso de un rBV AcMY-Poly (Martínez-Torrecuadrada *et al.*, 2000) se han conseguido aislar y caracterizar estructuras de procesamiento parcial de la poliproteína viral (Mariana Castrillo, comunicación personal). En las primeras etapas del ensamblaje la interacción electrostática entre los extremos C-terminales de pVP2 y VP3 daría lugar a una partícula con una doble capa proteica compuesta por VP3 recubriendo la superficie interna de la cápsida. Esta interacción retardaría el procesamiento del extremo C-terminal de VP2 y por tanto permitiría el ensamblaje de hexámeros. Aquellas moléculas de pVP2 que no establecen interacciones intensas con VP3 serían susceptibles de ser proteolizadas en la posición 452-453 en un proceso mediado por la proteasa PurSA, dando lugar a pentámeros, que actuarían como centros nucleadores del ensamblaje (Irigoyen *et al.*, 2012). Esta hipótesis es consistente con la estequiometría de moléculas de VP3 incorporadas por partícula viral, ~450 copias, implicando la presencia de una molécula de VP3 por cada molécula de pVP2, excepto en los trímeros pentaméricos “a” y los trímeros inmediatamente adyacentes “b” (Luque *et al.*, 2009a). Una vez conformada la procápsida, la interacción con VP3 se debilitaría, favoreciendo el procesamiento del extremo C-terminal de pVP2 y resultando en la maduración total de la partícula.



**Figura 7. Esquema de los elementos implicados en el polimorfismo estructural de (p)VP2.** Secuencia del extremo C-terminal 441-512 de pVP2 donde se resaltan en color las dianas de procesamiento de la proteína. Las regiones 443-452, 456-462, 468-471 y 476-481 conforman las hélices  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$  y  $\alpha 8$ , respectivamente. El interruptor molecular que determina el polimorfismo es la hélice anfipática  $\alpha 5$ , que permite el ensamblaje de cápsidas T=13 cuando interacciona con residuos ácidos del *tag* de His (en rojo), cuya secuencia también se muestra, y que mimetiza al extremo C-terminal de VP3. La expresión de formas recombinantes de pVP2 de longitud inferior a 456 aa resultan en el ensamblaje de cápsidas T=1, y las de mayor longitud en ensamblados tubulares. La expresión de formas de longitud intermedia, entre 456 y 476 aa, fusionadas a un *tag* de His en su extremo N-terminal permiten el ensamblaje de cápsidas T=13.

El sistema de obtención de VLPs de IBDV a partir de la proteína HT-VP2-466 en células de insecto reúne múltiples ventajas para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas. Por un lado, se trata de un sistema de expresión simple, que permite obtener cápsidas a partir de una única proteína, y cuya producción no requiere medidas de bioseguridad específicas, ya que no se utilizan virus patógenos en ningún estadio de la producción. Estas cápsidas carecen del resto de componentes virales y su utilización como vacunas permitiría diferenciar entre animales infectados y vacunados. Por otro lado, la exhaustiva caracterización bioquímica y estructural de la cápsida de IBDV y de la proteína VP2 nos permite diseñar de proteínas quiméricas a partir de la forma HT-VP2-466 para la incorporación de antígenos heterólogos. Estas características han motivado el trabajo contenido en el presente estudio, donde se ha abordado la utilización de estas cápsidas como transportadoras de macromoléculas, ya sea como vehículos vacunales o como nanocontenedores proteicos.



## **2. Objetivos**





Las cápsidas virales ensambladas a partir de la expresión de una o varias proteínas recombinantes, denominadas pseudopartículas virales o VLPs, han mostrado una elevada versatilidad en diversos ámbitos biotecnológicos. A partir de un sistema de expresión basado en baculovirus recombinantes, el ensamblaje de VLPs de IBDV con una única proteína, HT-VP2-466, es relativamente eficiente y permite la introducción de modificaciones para incorporar proteínas y ácidos nucleicos heterólogos. En el presente trabajo hemos abordado la incorporación de macromoléculas en VLPs de IBDV siguiendo dos metodologías complementarias: mediante la construcción de proteínas de fusión de la cápsida, o bien la incorporación inespecífica de fragmentos de DNA.

El objetivo general del presente trabajo es, por tanto, establecer las bases de futuras aplicaciones biotecnológicas a partir de VLPs de HT-VP2-466. En este contexto nos propusimos los siguientes objetivos concretos:

- 1) Establecimiento de las bases bioquímicas, estructurales e inmunológicas para generar VLPs quiméricas de HT-VP2-466 utilizando como proteína heteróloga modelo EGFP (*enhanced green fluorescent protein*).
- 2) Obtención de cápsidas quiméricas que incorporan diferentes antígenos del virus de la gripe A/PR8. Caracterización bioquímica, estructural, y evaluación de su potencial como vacunas.
- 3) Establecimiento de un sistema *in vitro* de desensamblaje/reensamblaje de IBDV a partir de la proteína HT-VP2-466 con la capacidad de incorporar inespecíficamente fragmentos de DNA durante el proceso de ensamblaje.



---

## **3. Materiales y Métodos**



### 3.1. Material biológico

#### 3.1.1. Animales

Los experimentos de inmunización se realizaron en ratones BALB/c hembra de 4 a 6 semanas de edad adquiridos por el Servicio de Animalario del Centro Nacional de Biotecnología.

#### 3.1.2. Células procariotas

La amplificación y mantenimiento de plásmidos recombinantes fue realizada en la cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$  (Raleigh *et al.*, 2002). Para la generación de báculos recombinantes se utilizó la cepa DH10-Bac (Luckow *et al.*, 1993). La expresión de la proteína recombinante HT-EGFP fue realizada en la cepa de *E. coli* XL1-Blue (*Stratagene*).

#### 3.1.3. Células eucariotas

La expresión de baculovirus recombinantes (rBVs) se realizó en células de insecto H5 (*Invitrogen*) derivadas de *Trichoplusia ni* (ATCC, CRL-1711). Las infecciones con IBDV fueron llevadas a cabo en la línea celular QM7 derivada de fibroblastos musculares de *Coturnix japonica* (codorniz japonesa) (ATCC, CRL-1962) (Antin y Ordahl, 1991). Para la infección con virus vaccinia recombinantes (rVVs) se utilizó la línea celular de mamífero BSC-40, derivada de células epiteliales renales de *Cercopithecus aethiops* (ATCC, CRL-2761) (Brockman y Nathans, 1974). Las infecciones con virus de la gripe A/PR8 fueron llevadas a cabo en la línea celular MDCK derivada de epitelio renal de *Cocker Spaniel* (ATCC, CCL-34) (Madin y Darby, 1958).

Las células H5 fueron cultivadas a 28°C en medio TC-100 (*GIBCO-BRL*) suplementado con suero fetal bovino (FCS, *Sigma*) al 10%, penicilina (100 U/ml), estreptomina (100  $\mu$ g/ml), gentamicina (50  $\mu$ g/ml) y fungizona (1  $\mu$ g/ml). Los cultivos celulares de QM7, BSC-40 y MDCK fueron mantenidos a 37°C en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Dulbecco y Freeman, 1959) suplementado con 10% de FCS, penicilina (100 U/ml), estreptomina (100  $\mu$ g/ml), gentamicina (50  $\mu$ g/ml), fungizona (1  $\mu$ g/ml) y aminoácidos no esenciales.

#### 3.1.4. Plásmidos

La generación de rBVs fue realizada a partir de los plásmidos pFastBac1 y pFastBacHT de *Invitrogen*. En ambos plásmidos los genes heterólogos se encuentran bajo el control del promotor de la poliedrina y poseen sitios específicos para la transposición del gen recombinante en el vector (bácido). El plásmido pFastBacHT incorpora además una cola (*tag*) de histidinas

(His, HT) y un segmento peptídico a modo de espaciador del extremo amino terminal (N-terminal) de la proteína recombinante.

El vector pFastBac HT-VP2-466, utilizado como base para la generación de cápsidas quiméricas de IBDV, ya ha sido descrito anteriormente en trabajos del laboratorio (Saugar *et al.*, 2005a). La secuencia de EGFP fue extraída a partir de un vector pEGFP-C1 (*Clontech*) para el clonaje de las proteínas de fusión de HT-VP2-466 con EGFP, así como el clonaje de HT-EGFP para su expresión como proteína soluble. Para la obtención de cápsidas quiméricas de HT-VP2-466 que contienen proteínas del virus de la gripe A/PR8, las secuencias correspondientes a los distintos fragmentos de la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe fueron obtenidas a partir de un vector pFastBac HT-HAPR8 cedido por el Dr. José F. Rodríguez (CNB-CSIC).

### 3.1.5. Virus

Las infecciones con IBDV se realizaron con la cepa *Soroa* (Lombardo *et al.*, 1999), perteneciente al serotipo I, que proviene de un aislado de un pollo infectado en la región del mismo nombre en Cuba y adaptada a crecer en cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollo.

La generación de rBVs se realizó a partir de la cepa BV FastBac (*Invitrogen*).

El rBV FB/HT-VP2-466 ha sido descrito y utilizado para la formación de VLPs de IBDV en células de insecto (Saugar *et al.*, 2005a).

El rVV vT7/LacOI/Poly se ha utilizado en el presente trabajo para obtener VLPs de IBDV mediante la expresión inducible de la poliproteína de IBDV en células de mamífero (Castón *et al.*, 2001)

Para el desafío de ratones con el virus de la gripe de cepa murina se utilizó un aislado de la cepa A/PR/8/34 (H1N1) adaptado a ratón y propagado en células MDCK, proporcionado por la Dra. Amelia Nieto (CNB-CSIC).

### 3.1.6. Anticuerpos

Los antisueros de conejo frente a las proteínas VP2 y VP3 han sido descritos previamente (Lombardo *et al.*, 1999; Sánchez y Rodríguez, 1999). Además se utilizaron anticuerpos comerciales de conejo frente al *tag* de His ( $\alpha$ -His) y de ratón frente a GFP ( $\alpha$ -GFP) (*Sigma*).

## 3.2. Manipulación y obtención de vectores recombinantes

### 3.2.1. Amplificación de fragmentos por PCR

Las reacciones se realizaron en un tampón con 0.2 mM dNTPs, 200 ng de cada cebador, 2 ng de molde de DNA, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 nM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100 y 2 U de la DNA polimerasa Vent (*New England Biolabs*), en un volumen final de 50 µl. El protocolo de amplificación seguido fue el siguiente: 1 min a 94°C; 30 ciclos de 45 s a 92°C, 45 s a 60°C y 1 min 30 s a 75°C, 5 min a 72°C.

### 3.2.2. Reacciones de restricción enzimática

Se utilizaron las enzimas de restricción *BglII*, *HindIII*, *NotI*, *SacI*, *BamHI*, *SnaBI* y *PshAI* de *New England Biolabs*, siguiendo las recomendaciones del proveedor.

### 3.2.3. Reacciones de ligación de fragmentos de DNA

Las ligaciones se realizaron en un volumen final de 20 µl en el siguiente tampón: 200mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1mM ATP, 25 µg/ml BSA; utilizando 200 ng/ml de cada fragmento de DNA y 200 U de T4 DNA ligasa (*New England Biolabs*) durante 16 horas a 16°C.

### 3.2.4. Generación de plásmidos recombinantes

Para la obtención de las distintas versiones de las proteínas de fusión de HT-VP2-466 con EGFP se utilizó una estrategia de PCR de extensión de solapamiento (*overlap extension PCR*). En un primer paso se amplificaron por PCR las secuencias de las proteínas HT-VP2-466 y EGFP usando como molde los plásmidos pFastBac-HT466 y pEGFP-C1, respectivamente, y con los cebadores que se detallan en la Tabla 2. Los cebadores flanqueantes de los dos fragmentos contienen las dianas de restricción *BglII* en 5' y *HindIII* en 3' mientras que los oligonucleótidos internos presentan una región complementaria encargada de la hibridación de los dos fragmentos que dará lugar a la fusión de ambas secuencias en la segunda PCR. Los productos de las primeras PCRs fueron purificados, cuantificados y mezclados en relación equimolecular. La mezcla de ambos fragmentos se sometió a desnaturalización alcalina por tratamiento con NaOH 0.4 M durante 5 min seguido de neutralización con acetato amónico 5 M y precipitación con isopropanol. La mezcla desnaturalizada fue utilizada como molde en la siguiente PCR a la que se añadieron los mismos cebadores flanqueantes que contienen las dianas de restricción. Los productos de PCR fueron purificados e introducidos en vectores pFastBacHT mediante digestión con *BglII* y *HindIII* de los insertos y *BamHI* y *HindIII* del plásmido.

**Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la generación de construcciones de fusión de la proteína HT-VP2-466 con EGFP**

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
5'NtEGFP <i>BglIII</i>	GCGCAGATCTATGGTGAGCAAGGGC
3'NtEGFP interno	<u>ACCTCCACCTCCACCTCCCTTGTACAGCTC</u>
5'NtHT466 interno	<u>GGAGGTGGAGGTGGAGGT</u> CATCACCATCACCATCAC
3'NtHT466 <i>HindIII</i>	GCGCAAGCTTAGGCAGGTGGGAACAATGTGG
5'CtHT466 <i>BglIII</i>	GCGCAGATCTATGACAAACCTGTCAGATCAAACCC
3'CtHT466 interno	<u>ACCTCCACCTCCACCTCCGGCAGGTGGGAAC</u>
5'CtEGFP interno	<u>GGAGGTGGAGGTGGAGGT</u> ATGGTGAGCAAGGGC
3'CtEGFP <i>HindIII</i>	GCGCAAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTC

\*Se indican en **negrita** las dianas de restricción y subrayadas las regiones solapantes

La expresión y purificación de la proteína EGFP con un tag de His (HT-EGFP), utilizada para la inmunización de ratones, fue realizada a partir de un rBV FB/HT-EGFP. Para la generación de este vector la secuencia correspondiente a EGFP fue extraída por restricción con *NcoI* y *HindIII* a partir del vector pEGFP-C1 e introducida por ligación enzimática en un vector pFastBacHTa digerido previamente con las mismas enzimas.

Para la generación de proteínas de fusión de HT-VP2-466 con antígenos derivados del virus de la gripe, en primer lugar se generaron dos versiones del vector pFastBac HT-VP2-466 que introducen una diana *NotI* en el extremo N-terminal o en el lazo (*loop*) PHI, que conecta las cadenas  $\beta$  H e I del dominio protuberante (P) de VP2. Posteriormente estos vectores se utilizaron como plataformas para introducir los antígenos en las posiciones correspondientes. La construcción de estos dos vectores fue realizada de nuevo siguiendo una estrategia de PCR de extensión de solapamiento, donde los oligonucleótidos internos parcialmente solapantes se encargan de la hibridación de los fragmentos de la primera PCR y además incorporan la secuencia de corte de *NotI*. A partir de un plásmido pFastBac HT-VP2-466 fueron amplificados por PCR los fragmentos para cada uno de los dos mutantes utilizando los cebadores que se indican en la Tabla 3. Los productos de estas PCRs fueron purificados, mezclados en relación equimolecular, desnaturalizados y utilizados como molde en una segunda PCR a la que se añadieron los mismos cebadores flanqueantes, que amplifican un fragmento de VP2 que contiene las dianas de restricción, que en este caso no son aportadas por el oligonucleótido. Los productos de estas PCRs fueron digeridos con *SnaBI* y *PshAI* (*NotI* en el extremo N-terminal) o *SacI* y *BamHI* (*NotI* en el *loop* PHI) y se ligaron sobre dos vectores pFastBac HT-VP2-466 previamente digeridos con las mismas enzimas, sustituyendo a los fragmentos originales.

**Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la introducción de dianas de restricción *NotI* en pFastBacHT-VP2-466**

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')
5'NtVP2	CGGCGCTTGCCGGTGGTGCTG
3'NtVP2 interno <i>NotI</i>	<u>GGTAGTACGAGCGGCGCGGTTTCGGACCGAGATCCGCG</u>
5'NtVP2 interno <i>NotI</i>	<u>GTCCGAAACC<del>CGGCGCGCT</del>CGTACTACCATCACCATCACC</u>
3'NtVP2	CGAACTTGTAGTTCCTTGC
5'loopVP2	CACAGTACCAACCAGGTGGGG
3'loopVP2 interno <i>NotI</i>	<u>GATCCCCTGCGCGGCGCCACCACTTTTGGAGGTCAC</u> ATC
5'loopVP2 interno <i>NotI</i>	<u>CAAAGTGGTGGCGGCGCGCAGGGGATCAGATGTC</u> TGGTC
3'loopVP2	CGGTCCCTCTCACTCAGTATC

Las dos versiones del vector HT-VP2-466 fueron utilizados para generar las diferentes construcciones de fusión con fragmentos de la hemaglutinina (HA) y la proteína M2 del virus de la gripe A/PR8. Todos las secuencias correspondientes a los fragmentos deseados de HA fueron amplificadas por PCR utilizando como molde un vector pFastBac HT-HAPR8 y con los cebadores que se indican en la Tabla 4. Todas las variantes de los fragmentos HA y su dominio HA2 fueron amplificadas mediante un cebador común de sentido 3'→5' (3' HA *NotI*) y diferentes cebadores en sentido 5'→3'. La secuencia de la hélice LAH de HA fue amplificada con cebadores específicos en ambos sentidos. Todos los productos de PCR fueron purificados y digeridos con *NotI*, al igual que los vectores pFastBac HT-VP2-466 que contienen la diana de restricción en su extremo N-terminal o en el *loop* PHI, según el caso, y ligados.

Para la generación de las construcciones de fusión con el fragmento de M2, fueron sintetizadas dos parejas de oligonucleótidos complementarios (*Biomers*) que codifican la secuencia completa del fragmento flanqueada por extremos protuberantes equivalentes a los producidos por la digestión con *NotI*. Los oligonucleótidos complementarios se hibridaron y utilizaron directamente para la ligación con el plásmido digerido.

**Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para la generación de construcciones de fusión de HT-VP2-466 con antígenos del virus de la gripe A/PR8**

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')
5' HA <i>NotI</i>	GCGCGCGGCCGCATGCCCCGGGACACAATATGTATAG
5' HA2 <i>NotI</i>	GCGCGCGGCCGCATGGGTCTATTTGGAGCCATTGCC
3' HA <i>NotI</i>	CGCGCGCGGCCGCTATCTACCTTTTCCCTGTTCAAC
5' LAH <i>NotI</i>	GCGCGCGGCCGCATGTTAGAAAAAAGGATGG
3' LAH <i>NotI</i>	GCGCGCGGCCGCTTAATTGGCTTTTTACTTTTCTC
5' HA2 <i>NotI</i> loop	GCGCGCGGCCGCGGTCTATTTGGAGCCATTGCC
Fw M2 <i>NotI</i>	<u>GGCCGC</u> ATGAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCCTATCAG <u>AAACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGGTTCAAGTGATAGC</u>
Rv M2 <i>NotI</i>	<u>GGCCGCTATCACTTGAACCGTTGCATCTGCACCCCATTCG</u> <u>TTTCTGATAGGCGTTTTCGACCTCGGTTAGAAGACTCATGC</u>
Fw M2 <i>NotI</i> loop	<u>GGCCGC</u> AGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCCTATCAGAA <u>ACGAATGGGGGTGCAGATGCAACGGTTCAAGTGATAGC</u>
Rv M2 <i>NotI</i> loop	<u>GGCCGCTATCACTTGAACCGTTGCATCTGCACCCCATTCG</u> <u>TTTCTGATAGGCGTTTTCGACCTCGGTTAGAAGACTGC</u>

### 3.2.5. Generación de baculovirus recombinantes

Los rBVs fueron obtenidos según el sistema Bac-to-Bac de *Invitrogen*. Este sistema se basa en la transposición del gen recombinante en el genoma infectivo del baculovirus contenido en un vector (bácmido) que es propagado en la cepa de *E. coli* DH10-Bac (Luckow *et al.*, 1993). Una vez clonada la secuencia de interés en un vector pFastBac, éste es purificado e introducido por transformación en la cepa DH10-Bac, donde tiene lugar la transposición del gen de interés dentro del genoma del bácmido. Los bácmidos son purificados de las bacterias, seleccionados y analizados por PCR para comprobar la ausencia de bácmido no recombinante. Los bácmidos seleccionados son transfectados en células H5 dando lugar a un stock primario de baculovirus infectivo, que es amplificado mediante la infección de células H5 con el sobrenadante de dicha transfección.

En el presente trabajo se han generado los siguientes rBVs:

- FB/EGFP-HT-VP2-466 y FB/HT-VP2-466-EGFP: expresan la proteína recombinante HT-VP2-466, forma mínima para el ensamblaje de VLPs de IBDV en el sistema de rBV, fusionada a la proteína EGFP en su extremo N o C-terminal.
- FB/HT-EGFP: expresa la proteína EGFP fusionada a un *tag* de His.

- FB/HA-HT-VP2-466, FB/HA2-HT-VP2-466, FB/LAH-HT-VP2-466 y FB/M2-HT-VP2-466: expresan proteínas de fusión de la proteína HT-VP2-466 con los antígenos derivados del virus de la gripe HA, el dominio HA2 de HA, la hélice LAH de HA y el dominio extracelular de M2, respectivamente, en su extremo N-terminal.
- FB/HT-HA2<sub>L</sub>-VP2-466 y FB/HT-M2<sub>L</sub>-VP2-466: expresan la proteína HT-VP2-466 con los antígenos HA2 y M2, respectivamente, insertados en el *loop* PHI.

### 3.3. Infecciones y expresión de proteínas

#### 3.4. Infección con rBVs

Cultivos confluentes de células H5 se infectaron a una multiplicidad de infección (moi) de 1-5 unidades formadoras de placa por célula (pfu/cel) del rBV correspondiente en un volumen mínimo de TC-100. Transcurrida 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió medio TC-100 suplementado con 2% de FCS. Las células fueron recogidas a 48 horas post-infección (hpi).

En los casos en que se realizaron coinfecciones con dos rBVs diferentes, el proceso de infección fue igual al descrito y se utilizó una moi de 1-2 pfu/cel de cada uno de los virus, a no ser que se especifique otra relación.

#### 3.2.6. Infección con rVVs

Para la generación de stocks de rVV vT7/LacOI/Poly, cultivos preconfluentes de células BSC-40 fueron infectados a una moi de 0.02 pfu/cel en un volumen mínimo de DMEM. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió DMEM suplementado con 2% de FCS. Las células fueron recogidas a 48 ó 72 hpi según el efecto citopático observado.

Para la purificación de VLPs de IBDV a partir de rVV vT7/LacOI/Poly, cultivos preconfluentes de células QM7 se infectaron a una moi de 2-5 pfu/cel en un volumen mínimo de DMEM. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió DMEM suplementado con 2% de FCS y 2 mM IPTG (isopentenil tio-β-galactósido). Las células fueron recogidas a 48-72 hpi.

#### 3.2.7. Infección con IBDV

Para la purificación de viriones de IBDV, cultivos de células QM7 a una confluencia del 70-80% se infectaron a una moi de 1-2 pfu/cel de IBDV en un volumen mínimo. Tras 1 h de adsorción se retiró el inóculo y se añadió DMEM suplementado con 2% FCS. Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos a las 48-72 hpi según el efecto citopático observado.

Para la producción de stock de IBDV se siguió el mismo procedimiento empleando una *moi* de 0.02-0.05 pfu/cel y recogiendo los sobrenadantes de cultivo a las 72-96 hpi según el efecto citopático observado.

### **3.2.8. Titulación de stocks de rVV e IBDV**

Los títulos de los stocks virales fueron determinados mediante ensayos de formación de placa (Martin, 1978). Se infectaron monocapas de células BSC-40 (rVV) o QM7 (IBDV) a una confluencia del 50-60% con diluciones seriadas de virus en un volumen mínimo de DMEM. Tras 1 h de absorción se retiró el inóculo y se añadió agar semisólido a una concentración final de 0.5% en medio DMEM suplementado con 2% de FCS. A las 48 hpi las monocapas fueron fijadas con formaldehído al 10% y teñidas con una solución acuosa de cristal violeta al 2%. El título se determinó mediante contaje de placas de lisis.

### **3.2.9. Transformación bacteriana y expresión de HT-EGFP**

Para la expresión y purificación de HT-GFP en bacterias se utilizó la cepa de *E. coli* XL1-Blue transformada con el plásmido pTOPO-HTGFP, cedido por la Dra. Aitziber López (IMDEA). Este plásmido expresa de manera constitutiva la proteína EGFP fusionada a una *tag* de His en su extremo N-terminal. El plásmido fue transformado en bacterias electrocompetentes mediante la aplicación de un pulso eléctrico de alto voltaje durante 1 s, tras lo cual se incubaron 1 h a 37°C en agitación para favorecer la recuperación de las bacterias. A continuación las células fueron sembradas en una placa de LB suplementada con 50 µg/ml de ampicilina y se cultivaron en estufa a 37°C durante 16 h. La expresión de proteína se realizó a partir del inóculo de una colonia en medio LB suplementado con ampicilina 50 µg/ml durante 16 h a 30°C.

## **3.3. Purificación de proteínas y ensamblados virales**

### **3.3.1. Purificación de ensamblados derivados de la expresión con rBVs**

Monocapas confluentes de células H5 fueron infectadas con el rBV correspondiente y se recogieron a 48 hpi. Las células se lavaron con tampón PES (50 mM PIPES pH 6.2, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>) y se lisaron incubándolas con tampón PES suplementado con IGEPAL CA-630 (*Sigma*) al 1% e inhibidores de proteasas (*Complete Mini; Roche*) durante 20 min. El lisado fue clarificado mediante centrifugación a 3,000 rpm durante 10 min en un rotor basculante 5624 (*Hettich Zentrifugen*). El sobrenadante obtenido fue cargado sobre un colchón de sacarosa al 25% en PES y ultracentrifugado a 37,000 rpm durante 2 h 30 min en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc.*). El sedimento resultante fue resuspendido en tampón PES, centrifugado en una microfuga a 13,000 rpm durante 1 min, y el sobrenadante resultante fue cargado sobre un gradiente lineal de sacarosa del 20-50% en PES y sometido a

ultracentrifugación a 40,000 rpm durante 45 min en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc.*). El gradiente se fraccionó en 12 alícuotas que se concentraron 20 veces mediante ultracentrifugación a 50,000 rpm durante 2 h en un rotor SW55 (*Beckman-Coulter Inc.*). Todas las etapas de purificación fueron realizadas a 4 °C (Saugar *et al.*, 2005a).

### 3.3.2. Purificación de ensamblados derivados de la expresión con rVV

Cultivos de células QM7 preconfluentes fueron infectados con rVV  $\nu$ T7/LacOI/Poly y recogidos a 48 o 72 hpi. Las células se lavaron con tampón PES y el sedimento celular resultante se lisó mediante la aplicación de 3 ciclos de congelación a -80°C seguida de descongelación a 37°C. Posteriormente las células se sometieron a 3 ciclos de sonicación de 10 s con intervalos de parada de 10 s. El lisado fue clarificado y purificado siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1.

### 3.3.3. Purificación de viriones de IBDV

El sobrenadante de cultivos de células QM7 infectadas con IBDV fue mezclado en una relación 1:5 (v:v) con PEG 20% 3M NaCl y fue incubado con agitación toda la noche a 4 °C. Posteriormente, fue centrifugado a 3,000 rpm durante 30 min en un rotor basculante 5624 (*Hettich Zentrifugen*), y el precipitado resultante fue resuspendido en PES suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Mini, Roche*) y nuevamente centrifugado a 3,000 rpm durante 30 min. El sobrenadante obtenido fue cargado sobre un colchón de sacarosa al 25% en PES y ultracentrifugado a 37,000 rpm durante 2h 30 min en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc.*). El precipitado resultante fue resuspendido en PES y centrifugado en una microfuga 1 min a 13,000 rpm. El sobrenadante fue cargado en un gradiente de sacarosa del 25-50% en PES y procesado tal como se describe en las etapas finales del apartado 3.4.1.

Alternativamente el precipitado obtenido tras el colchón de sacarosa fue purificado en un gradiente isopícnico de CsCl<sub>2</sub> (Luque *et al.*, 2009a). El precipitado fue resuspendido en PES, centrifugado en una microfuga 1 min a 13,000 rpm y mezclado con CsCl<sub>2</sub> en tampón PES a una densidad inicial de 1.33 g/cc y ultracentrifugado a 40,000 rpm durante 14 h en un rotor NVT65 (*Beckman-Coulter Inc.*). Tras la ultracentrifugación se detectaron un total de seis bandas visibles por refracción de luz (denominadas E1 a E6, de menor a mayor densidad de flotación). Las bandas fueron recuperadas por punción lateral con agujas hipodérmicas 23G y dializadas 48 h frente a tampón PES. Todas las etapas de purificación fueron realizadas a 4 °C.

### **3.3.4. Purificación de HT-GFP**

La proteína HT-GFP se purificó a partir de células H5 infectadas con el rBV FB/HT-GFP y recogidas a 72 hpi o a partir de cultivos bacterianos de XL1-Blue-pTOPO-HTGFP recogidos a 16 horas post-inoculación. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en el tampón de lisis 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl y 0.1% IGEPAL CA-360 (*Sigma*) suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Mini; Roche*) durante 20 min en hielo. Posteriormente se sometieron a 3 ciclos de sonicación de 10 s y los extractos fueron centrifugados a 7,000 rpm en un rotor basculante 1415 (*Hettich Zentrifugen*) durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se mezclaron con una resina TALON Metal Affinity (*Clontech*) previamente equilibrada en el tampón de lisis y se incubaron durante 2 h en agitación a 4°C. La muestra se centrifugó durante 5 min a 8,000 rpm y la resina se lavó 3 veces con un tampón 50mM Tris-HCl pH 8, 500mM NaCl, 0.1% IGEPAL, 5 mM imidazol. La proteína se eluyó con imidazol 200 mM en el mismo tampón. En el caso de la proteína utilizada para las inmunizaciones, tras la purificación la muestra se dializó frente a tampón fosfato salino (PBS) durante 24 h.

## **3.4. Análisis bioquímico**

### **3.4.1. Análisis electroforético en geles desnaturalizantes de poliacrilamida**

Para la resolución electroforética de proteínas se siguió el método de Laemmli (Laemmli, 1970) de electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Las muestras analizadas fueron mezcladas con tampón de desnaturalización 5x (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 0.06% azul de bromofenol, 25% glicerol y 10 mM DTT), hervidas 3 min a 100 °C, enfriadas 1 min a 4 °C y cargadas en geles de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 37.5:1) al 11%. Posteriormente, dichos geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa o teñidos con azul de Coomassie preparado al 2% (p/v) en una solución al 10% de metanol y 10% de ácido acético.

### **3.5.2 Análisis electroforético en geles nativos de agarosa**

Para la resolución electroforética de ácidos nucleicos las muestras fueron mezcladas con tampón de carga azul/naranja 6x de la casa comercial *Promega* (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.4% naranja G, 0.03% azul de bromofenol, 0.03% xilencianol FF, 15% Ficoll 400, 50 mM EDTA pH 8.0) y cargadas en geles de agarosa al 0,7 % en tampón TBE (90 mM Tris-HCl pH 8, 90 mM ácido bórico, 20 mM EDTA) preteñidos con el agente intercalante SYBR Safe (*Invitrogen*).

### 3.5.3 Electrotransferencia e inmunodetección (*Western blot*)

Una vez llevada a cabo la separación electroforética mediante geles SDS-PAGE, las proteínas fueron electrotransferidas en condiciones semisecas durante 60 min a 200 mA a membranas de nitrocelulosa (*Protran, Schleicher & Schuell*) tras incubar durante 5 min el gel y las membranas en tampón Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.0375 % (p/v), metanol 20 % (v/v). Las membranas fueron saturadas en solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en tampón PBS), durante 30 min a 20°C y posteriormente incubadas con el anticuerpo primario  $\alpha$ -VP2,  $\alpha$ -VP3,  $\alpha$ -His ó  $\alpha$ -GFP diluido 1:1000 en solución de bloqueo durante 2 h a 20°C. Después de tres lavados de 10 min con PBS, se incubaron 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de cabra  $\alpha$ -IgG de conejo conjugado con peroxidasa (*GE Healthcare*) diluido 1:10,000 en solución de bloqueo. La membrana se lavó 3 veces con PBS durante 10 min y se reveló mediante la utilización del sistema comercial quimioluminiscente ECL (*GE Healthcare*), o mediante la adición de 4-cloro-1-naftol en presencia de 0,025 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.5.4. Determinación de la concentración de proteína total

La concentración de proteínas en las diferentes muestras fue determinada mediante el método comercial BCA (*Pierce*) (Smith *et al.*, 1985) y utilizando como patrón seroalbúmina bovina (BSA).

### 3.5.5. Cuantificación de la incorporación de proteínas de fusión en cápsidas

Para estimar la cantidad de proteína de fusión incorporada en las cápsidas quiméricas de HT-VP2-466 que incorporan diferentes antígenos, las muestras se analizaron simultáneamente con patrones de BSA de concentración conocida en geles SDS-PAGE que se tiñeron con azul de Coomassie. Los geles fueron digitalizados en un escáner Perfection 3170 (*EPSON*) y se analizaron con el software de análisis cuantitativo Quantity One (*Bio Rad*).

## 3.5. Microscopía electrónica

### 3.5.1. Tinción negativa

Sobre una gota de 5  $\mu$ l de la muestra se depositó una rejilla de microscopía electrónica con carbón-colodión previamente ionizada mediante descarga iónica (K100X, *Emitech*). La rejilla fue incubada 3 min, lavada 2 veces en agua y el exceso de líquido eliminado mediante contacto del borde de la rejilla con papel de filtro grado 1 (*Whatman*). La concentración óptima de los diferentes ensamblados virales analizados fue determinada empíricamente mediante diluciones seriadas. Las rejillas fueron incubadas sobre 5  $\mu$ l de acetato de uranilo al 2% (p/v) durante 1 min. Para la visualización de la muestra se empleó un microscopio electrónico JEOL 12000 EX II estabilizado a 100 kV y las imágenes fueron registradas en micrografías electrónicas (*Kodak*

SO-163) a una magnificación nominal 40,000x que fueron reveladas (*Kodak D-19*) durante 8 min a 20°C.

### 3.5.2. Criomicroscopía electrónica

Para el análisis por criomicroscopía electrónica, 5  $\mu\text{l}$  de la muestra fueron depositados sobre una cara de una rejilla de cobre-rodio cubierta con una película de carbón con agujeros (*Quantifoil R2/2*) previamente lavada con vapores de acetona. Las muestras fueron vitrificadas en etano líquido según los procedimientos previamente establecidos (Dubochet *et al.*, 1988; Caston *et al.*, 2001), quedando incluidas en una capa de hielo vítreo y conservando su estado nativo. Las muestras se visualizaron en un microscopio Tecnai G2 FEG 200 (*FEI*) equipado con un anticontaminador, y estabilizado a 200 kV, en el cual fueron cargadas mediante un criobrazo GATAN 626.53P50. Las imágenes se registraron a una magnificación nominal 50,000x bajo condiciones de mínima dosis electrónica en micrografías *Kodak SO-163* que fueron reveladas (*Kodak D-19*) durante 12 min a 20°C.

### 3.5.3. Procesamiento digital de imágenes

Las operaciones generales de procesamiento de imagen fueron llevadas a cabo mediante el paquete de procesamiento Xmipp (<http://xmipp.cnb.csic.es/>, Marabini *et al.*, 1996). Las criomicrografías electrónicas seleccionadas fueron digitalizadas en un escáner Photoscan TD (*Zeiss*) con un intervalo de muestreo de 14  $\mu\text{m}/\text{píxel}$ , que se corresponde a 2.4  $\text{Å}/\text{píxel}$  sobre el espécimen. Las imágenes de las partículas fueron seleccionadas manualmente mediante el programa X3d (Conway y col. 1993), y estas coordenadas fueron utilizadas para extraer y normalizar las partículas con el paquete Xmipp. Se seleccionaron un total de 1,307 imágenes de cápsidas de HT-VP2-466 y 624 de EGFP-HT-VP2-466, de las cuales se seleccionaron para las siguientes etapas de procesamiento 1,267 y 600, respectivamente.

El rango de desenfoque fue calculado analizando las transformadas de Fourier promedio de cada micrografía. La corrección de la CTF se realizó con Bshow, perteneciente al paquete Bsoft (<http://www.niams.nih.gov/rcn/labbranch/lsbr/software/bsoft/>; Heymann y Belnap 2007). Para las micrografías analizadas, se determinó que el rango de desenfoque estaba comprendido entre 0.9 y 4.0  $\mu\text{m}$  en el caso de las imágenes de cápsidas HT-VP2-466, y entre 0.8 y 3.4  $\mu\text{m}$  para las cápsidas EGFP-HT-VP2-466.

La orientación y centro inicial de las partículas en ambos procesamientos fue determinada utilizando como modelo inicial un mapa tridimensional de la cápsida HT-VP2-466 obtenido previamente en nuestro laboratorio (Saugar *et al.*, 2005), escalado y filtrado a 30  $\text{Å}$  de

resolución. Se calculó un nuevo mapa de densidad que se usó para las subsiguientes etapas de refinamiento iterativo de los ángulos de orientación y centros de las partículas.

Las 3DRs fueron calculadas usando métodos de Fourier-Bessel (Crowther y col. 1970; Fuller y col. 1996) e imponiendo simetría icosaédrica en los mapas de densidad finales. Para estimar la resolución de los mapas se calculó la función FSC (*Fourier Shell Correlation*) (van Heel 1984) entre dos mapas independientes que contienen cada uno la mitad de las partículas totales empleadas en cada reconstrucción final. La resolución de cada reconstrucción fue determinada como el recíproco de la frecuencia espacial donde el coeficiente de correlación es 0.5 (criterio FSC=0.5). Las resoluciones calculadas para HT-VP2-466 y EGFP-HT-VP2-466 fueron de 20.8Å y 22.7 Å, respectivamente.

Los perfiles de densidad radial promedio de las cápsidas HT-VP2-466 y EGFP-HT-VP2-466 se calcularon con el paquete Spider ([http://www.wadsworth.org/spider\\_doc/spider/docs/](http://www.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/), Frank *et al.*, 1996), y fueron normalizados y escalados adecuadamente. El mapa de diferencia entre ambas reconstrucciones se calculó utilizando Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>, Pettersen et al 2004), sustrayendo el mapa de HT-VP2-466 al de la cápsida EGFP-HT-VP2-466 para revelar las densidades adicionales en esta última.

### **3.6. Inmunizaciones y desafío viral de ratones**

#### **3.6.1. Inmunización de ratones**

Los experimentos de inmunización con las diferentes proteínas y cápsidas se realizaron en ratones BALB/c siguiendo un protocolo basado en tres inmunizaciones. Cada ratón fue inmunizado con 30-40 µg del antígeno diluido en 150 µl de PBS estéril emulsionado con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (ACF) (*Difco*) en la primera dosis, y de adyuvante incompleto de Freund (AIF) en las dosis sucesivas. Las muestras fueron inyectadas por vía subcutánea dorsal utilizando agujas hipodérmicas 25G. Las inmunizaciones se espaciaron entre sí 28 días en el caso de las VLPs quiméricas de IDBV fusionadas a EGFP o 21 días en las inmunizaciones con las mismas cápsidas fusionadas a antígenos del virus de la gripe, tiempo suficiente para permitir un decaimiento del título de anticuerpo en sangre que no neutralice la nueva dosis de antígeno.

Transcurridos 10 días después de la última dosis se extrajeron muestras de 200 µl de sangre de la vena mandibular para su análisis mediante ELISA.

La inmunización de antígenos en ausencia de adyuvante fue realizada siguiendo el mismo protocolo descrito, con la salvedad de que los antígenos en cada dosis se diluyeron hasta 300 µl con PBS estéril y se inyectaron por vía intraperitoneal.

### **3.6.2. Ensayos de ELISA**

El análisis de los sueros obtenidos de las diferentes inmunizaciones se llevó a cabo mediante ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) de tipo indirecto en fase sólida (Engvall y Perlman, 1971). Para ello se tapizaron placas de 96 pocillos Maxi-sorp (*Nunc*) a 1µg/ml del antígeno correspondiente diluido en PBS durante 16 h a 4°C. Las placas fueron bloqueadas con 0.5% BSA, lavadas e incubadas con diluciones seriadas de los sueros correspondientes, durante 1 h a 20°C, incluyendo como control positivo sueros α-VP2 de conejo y α-GFP de ratón. Después las placas fueron lavadas e incubadas con anticuerpos secundarios de cabra específicos para IgG de ratón o de conejo (*Dako*) conjugados con peroxidasa (HRP) en dilución 1:1,500 durante 1 h a 20°C. Finalmente, las placas se lavaron, se revelaron con OPD (o-fenilendiamina) en oscuridad durante 4 min, se detuvo la reacción con 2.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se determinó la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 492 nm. Estos ensayos se realizaron conjuntamente con Mercedes Llorente, del servicio *Protein Tools* dirigido por la Dra. Leonor Kremer (CNB-CSIC).

### **3.6.3. Ensayos de desafío de ratones con el virus de la gripe A/PR8**

Los ratones inmunizados con cápsidas quiméricas que contienen diferentes proteínas del virus de la gripe A/PR8 se sometieron al desafío viral para evaluar el posible efecto protector inducido con el protocolo de inmunización. Transcurridos 14 días después de la última dosis de inmunización los ratones fueron pesados para establecer el peso inicial de cada individuo (día 0). Posteriormente, los ratones se anestesiaron con una mezcla de ketamina (*Imalgene 500, Merial*) y xilacina (*Xilagesic, Calier*) al 10% final (v/v) de cada compuesto en PBS estéril por vía parenteral. Los animales fueron mantenidos en una cabina de flujo laminar sobre una manta térmica a 37°C durante el proceso de inoculación. Se inocularon 500 pfu de virus suspendidas en 40 µl de PBS estéril por vía intranasal utilizando una micropipeta y dejando intervalos para la recuperación del ritmo respiratorio del ratón. Tras la inoculación los animales se mantuvieron durante 1 h en estufa a 37°C. Se realizó un seguimiento diario del peso de todos los animales durante los 14 días siguientes. Los animales fueron sacrificados en atmósfera saturada de CO<sub>2</sub> cuando su peso fue inferior al 75% de su peso inicial.

### 3.7.4. Análisis cuantitativo por *Dot blot*

Los experimentos de *dot blot* fueron utilizados para la evaluación comparativa de la cantidad de anticuerpo presente en los sueros de los ratones inmunizados con diferentes cápsidas químicas que reconoce específicamente el virus de la gripe. Para ello, gotas de 4  $\mu$ l de virus de la gripe A/PR8 ( $\sim 10^5$  pfu) y gotas de 4  $\mu$ l de BSA de concentración 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l fueron adsorbidas sobre membranas de nitrocelulosa (*Protran, Schleicher & Schuell*). Una vez secas las gotas, las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche desnatada en PBS al 5% (p/v) e incubadas con los sueros correspondientes en dilución 1:300 durante 2 h. Después de tres lavados las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario de cabra específico contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa (*Roche*) en dilución 1:5,000 y reveladas utilizando el sistema comercial ECL (*GE Healthcare*). La señal se registró en películas de rayos X (*Konica Minolta*), que fueron digitalizadas. Para cada suero se cuantificó la señal registrada contra el virus y contra el fondo de BSA, y esta última fue sustraída de la primera. Las intensidades relativas se calcularon con respecto a la intensidad máxima registrada en el experimento.

### 3.7.5. Ensayos de neutralización *in vitro* del virus de la gripe A/PR8

La capacidad neutralizante de los sueros obtenidos en las inmunizaciones de ratones con VLPs químicas que contienen antígenos del virus de la gripe A/PR8 fue evaluada mediante ensayos de seroneutralización. Para ello, 10-30 pfu del virus de la gripe suspendidas en 200  $\mu$ l de DMEM se incubaron con 15  $\mu$ l de cada suero durante 1 h a 37°C. Estos inóculos fueron añadidos sobre células MDCK confluentes previamente lavadas con PBS e incubados durante 1 h a 21°C para permitir su adsorción. Posteriormente fueron retirados los inóculos, lavadas las células y se añadió el medio de infección, compuesto de agar semisólido al 0.5% de concentración final en medio DMEM suplementado con tripsina 0.25% en relación 1/1000 y DEAE-dextrano a una concentración final de 0.1 mg/ml. A las 72 hpi las células fueron fijadas con formaldehído y teñidas con una solución de cristal violeta al 2%. El efecto neutralizante se estableció por conteo de placas de lisis.



## **4. Resultados**

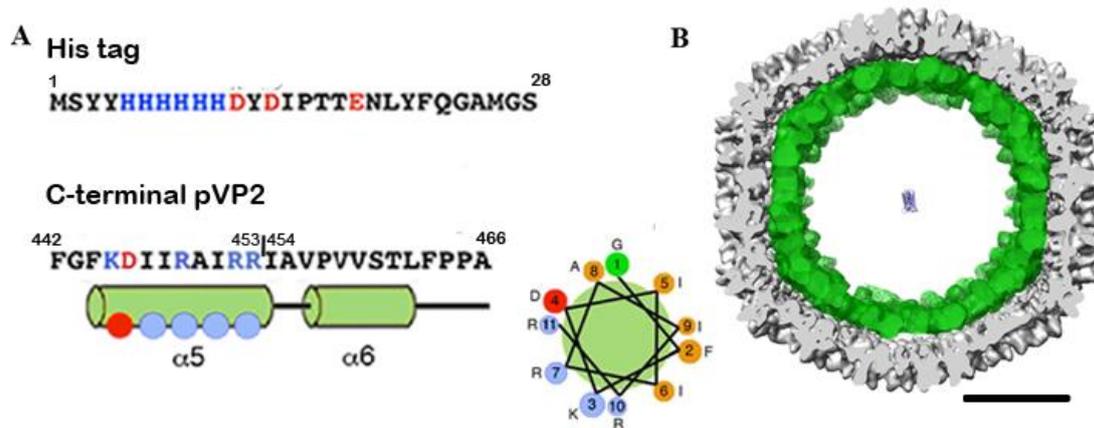


## 4.1. Obtención de ensamblados quiméricos de IBDV utilizando como modelo EGFP

**4.1.1. Construcción y expresión de proteínas de fusión de HT-VP2-466 con EGFP** Los numerosos estudios realizados sobre las bases estructurales y moleculares del polimorfismo estructural de (p)VP2 (Saugar *et al.*, 2005b; Luque *et al.*, 2007; Luque *et al.*, 2009b; Luque *et al.*, 2009a; Irigoyen *et al.*, 2009; Saugar *et al.*, 2010; Irigoyen *et al.*, 2012) nos han permitido establecer los elementos mínimos necesarios para el ensamblaje eficiente de VLPs idénticas al virión de IBDV a partir de sistemas simples de expresión recombinante. Estas VLPs se obtienen a partir de un rBV que expresa una forma intermedia de pVP2, de 466 residuos, fusionada a un *tag* de His en su extremo N-terminal, denominada HT-VP2-466.

En este trabajo se ha planteado el desarrollo de VLPs quiméricas basadas en la proteína HT-VP2-466 como portadora de antígenos de interés. La incorporación de proteínas heterólogas en VLPs de IBDV ha sido descrita previamente mediante la fusión de EGFP en el extremo C-terminal de VP3 dentro del gen de la poliproteína del virus (Chevalier *et al.*, 2004; Clemente 2004 tesis doctoral). Sin embargo, la posibilidad de incorporar proteínas en VLPs quiméricas formadas únicamente por (p)VP2 y que carecen del resto de proteínas virales (Saugar *et al.*, 2005a) proporciona una herramienta biotecnológica más simple con importantes ventajas, ya que, por ejemplo, vacunas basadas en estas VLPs quiméricas nos permitirían distinguir animales infectados de vacunados.

La obtención de cápsidas simples basadas en la proteína HT-VP2-466 para incorporar antígenos complejos ha sido abordada en primer lugar utilizando como modelo la proteína EGFP (~30 kDa). La estructura de EGFP consta de un barril  $\beta$  compuesto por 11 cadenas  $\beta$  (Yang *et al.*, 1996). Su forma compacta de cilindro y sus dimensiones, con un diámetro de ~25 Å y una altura de ~45 Å, la convierten en un modelo óptimo para evaluar otros péptidos y proteínas de interés. El mapa pseudo-atómico de la cápsida T=13 formada por HT-VP2-466 (Saugar *et al.*, 2005a; Luque *et al.*, 2007) muestra que, en principio, tiene la capacidad suficiente para permitir la incorporación de una copia de EGFP por cada copia de (p)VP2 (Figura 8). Decidimos incorporar EGFP en el extremo C-terminal de (p)VP2, ya que el segmento que incluye los residuos 453-466, situado a continuación de la hélice  $\alpha$  anfipática 443-452, podría actuar como elemento distanciador para que el polipéptido fusionado no interfiera en el ensamblaje de las cápsidas T=13. Alternativamente, EGFP también fue insertada en el extremo N-terminal precediendo al *tag* de His.



**Figura 8: Regiones implicadas en la formación de cápsidas HT-VP2-466 y modelo de la cápsida quimérica HT-VP2-466-EGFP.** (A) Secuencias del *tag* de His (arriba) y del extremo C-terminal 442-466 de (p)VP2-466 (abajo). Los residuos cargados implicados en las interacciones electrostáticas entre ambos segmentos morfo genéticos se destacan en azul (básicos) o rojo (ácidos); a la derecha se muestra una representación helicoidal de la hélice  $\alpha$  anfipática ( $\alpha 5$ ) (B) Sección de una cápsida T=13 hipotética constituida por la proteína HT-VP2-466 (gris) (Saugar *et al.*, 2005b) que incluye 780 copias de EGFP (verde). En el centro se representa la estructura atómica de una molécula de EGFP (PDB 1GFL) (Yang *et al.*, 1996). La barra de escala corresponde a 200 Å.

A partir del rBV FB/HT-VP2-466 se generaron dos construcciones de fusión que incorporan la proteína EGFP en los extremos N-terminal (FB/EGFP-HT-VP2-466) y C-terminal (FB/HT-VP2-466-EGFP) de HT-VP2-466 (Figura 9A-C). Además, para eludir posibles impedimentos estéricos, en ambos casos se introdujo un brazo espaciador de seis glicinas entre ambas proteínas. Las construcciones de fusión se utilizaron para generar los correspondientes bácmidos, que fueron transfectados en células H5 como se describe en el apartado 3.2.5.

La expresión de ambas proteínas quiméricas fue analizada mediante SDS-PAGE y WB. Para ello, se infectaron células H5 con cada rBV a una moi 2-5 pfu/cel y se recogieron a 48 hpi. Los extractos totales de las células infectadas se analizaron en geles SDS-PAGE que fueron transferidos y analizados utilizando sueros policlonales de conejo específicos  $\alpha$ -VP2 y  $\alpha$ -GFP. La expresión de la construcción FB/EGFP-HT-VP2-466 da lugar a una banda de movilidad electroforética correspondiente a un peso molecular de ~75 kDa, reconocida tanto por anticuerpos  $\alpha$ -VP2 como  $\alpha$ -GFP (Figura 9D); esta banda se corresponde con el peso molecular teórico de la proteína de fusión (80.3 kDa). Sin embargo, por razones aún sin determinar, no se detectó ninguna expresión en las células infectadas con FB/HT-VP2-466-EGFP.

La proteína EGFP en su conformación nativa se caracteriza por emitir fluorescencia a una longitud de onda de 503 nm, correspondiente al color verde, cuando se irradia con una fuente de luz ultravioleta (Prendergast y Mann, 1978). Para comprobar si la proteína expresada como

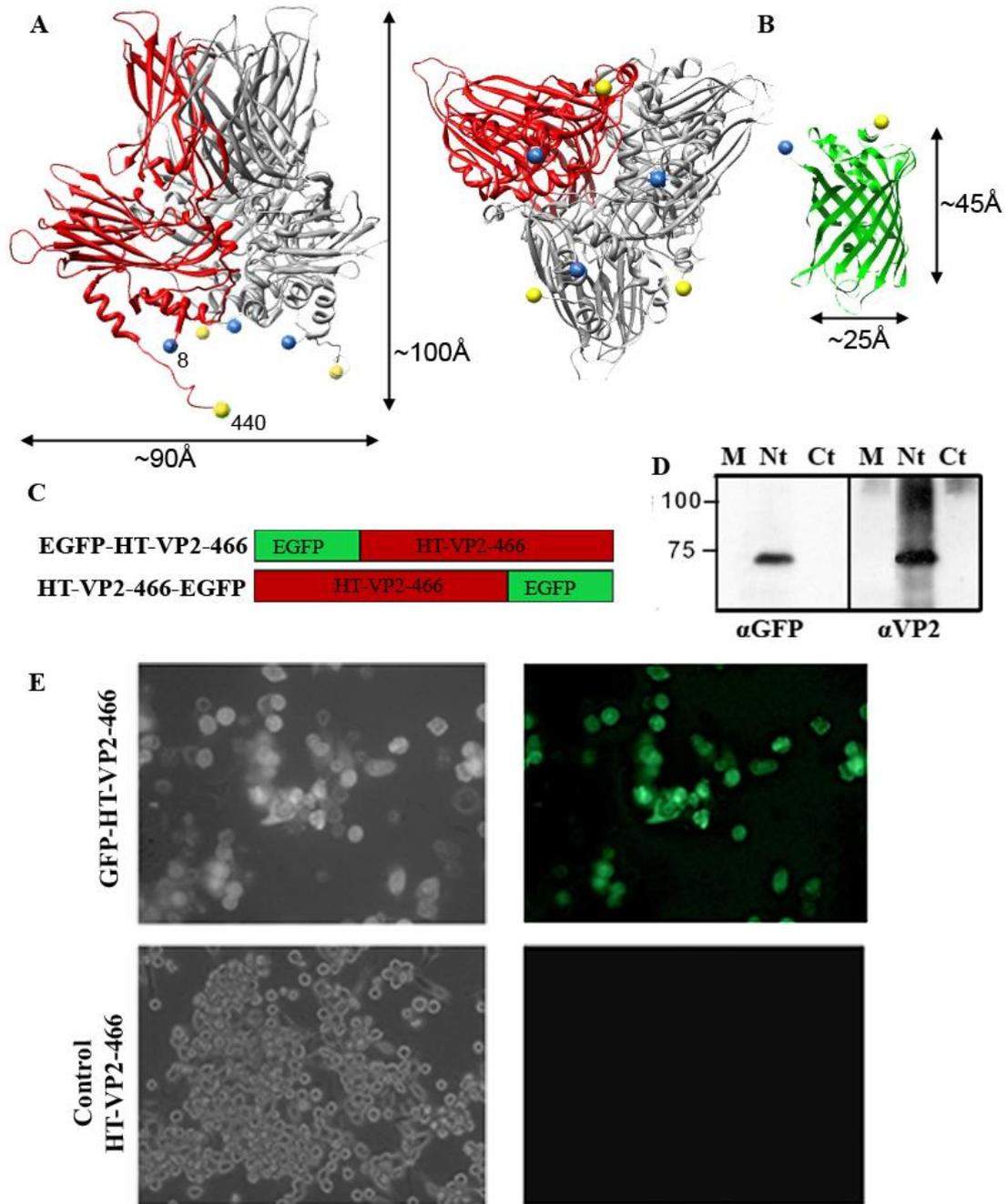
fusión con HT-VP2-466 es capaz de plegarse correctamente se evaluó dicha fluorescencia en células infectadas con el rBV FB/EGFP-HT-VP2-466. Células H5 en cultivo fueron infectadas con este rBV a una  $moi$  2-5 pfu/cel y observadas a 48 hpi bajo un microscopio de fluorescencia. Las células infectadas con el rBV FB/EGFP-HT-VP2-466 exhiben una intensa fluorescencia verde, que, como era esperable, no se detectó en las células control infectadas con el rBV FB/HT-VP2-466 (Figura 9E) ni con FB/HT-VP2-466-EGFP (no mostrado).

La fusión de EGFP en el extremo N-terminal de HT-VP2-466 da lugar, por tanto, a una proteína quimérica reconocida por anticuerpos específicos  $\alpha$ -VP2 y  $\alpha$ -GFP, y esta disposición permite el correcto plegamiento de la proteína heteróloga. Los estudios de ensamblaje de VLPs quiméricas fueron continuados con la proteína EGFP-HT-VP2-466.

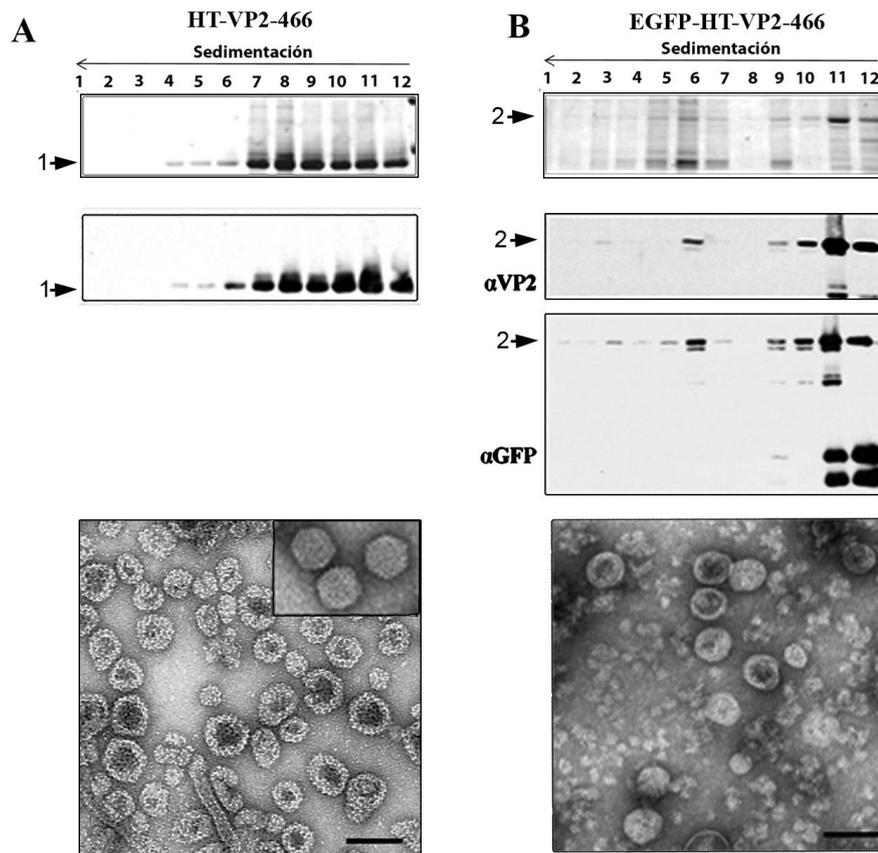
#### **4.1.2. Purificación de estructuras derivadas de FB/EGFP-HT-VP2-466**

Una vez comprobada la expresión de EGFP-HT-VP2-466, se procedió a evaluar su capacidad de ensamblarse en material particulado como VLPs y/o estructuras tubulares. Para ello, se infectaron células H5 con FB/EGFP-HT-VP2-466, fueron recogidas a 48 hpi y sometidas al protocolo de purificación a escala semipreparativa (apartado 3.4.1.) mediante ultracentrifugación en gradientes lineales de sacarosa. Las fracciones concentradas del gradiente se analizaron bioquímicamente por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie o WB con sueros  $\alpha$ -VP2 y  $\alpha$ -GFP.

El perfil bioquímico de la purificación de extractos de células infectadas con FB/HT-VP2-466 muestra que la mayor concentración de ensamblados se localiza en las fracciones de la mitad superior del gradiente (Figura 10A, arriba). El análisis por microscopía electrónica y tinción negativa revela que las fracciones centrales del gradiente (fracciones 6-8) estaban enriquecidas en cápsidas T=13 similares a las de IBDV (Figura 10A, abajo), además de cápsidas de menor tamaño y ensamblados tubulares. La purificación de ensamblados de la proteína EGFP-HT-VP2-466 es mucho menos eficiente, como se deduce por la presencia de bandas de baja intensidad con la movilidad de la proteína de fusión en el análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (Figura 10B, arriba). El análisis por WB con sueros específicos  $\alpha$ -VP2 y  $\alpha$ -GFP (Figura 10B, abajo) muestra que la mayor parte de la proteína de fusión se localiza en la parte superior del gradiente (fracción 11), correspondiente a agregados de pequeño tamaño y proteínas solubles. La fracción 6 fue analizada por microscopía electrónica, ya contiene una banda correspondiente a la proteína de fusión (Figura 10B, abajo) y se comprobó la presencia de estructuras de tamaño y morfología similares a las cápsidas T=13.



**Figura 9. Generación de proteínas de fusión de HT-VP2-466 con EGFP.** (A) Trímero de VP2 (PDG 2GSY, Garriga *et al.*, 2006), vista lateral (izquierda) y desde abajo (derecha), donde se destaca un monómero en rojo y los extremos N y C-terminales con esferas de color azul y amarillo, respectivamente, indicando el último residuo resuelto en cada extremo. (B) Estructura atómica de EGFP (PDB 1GFL, Yang *et al.*, 1996), vista lateral donde se indican las dimensiones y se destaca con una esfera azul su extremo C-terminal y con una esfera amarilla el extremo N-terminal. (C) Esquema de las dos construcciones generadas con EGFP basadas en HT-VP2-466. (D) Análisis de la expresión de las proteínas químicas a partir de extractos totales de células infectadas con FB/EGFP-HT-VP2-466 (Nt) y FB/HT-VP2-466-EGFP (Ct) mediante WB  $\alpha$ -GFP (izquierda) y  $\alpha$ -VP2 (derecha). (E) análisis por microscopía de contraste de fase (izquierda) y de fluorescencia (derecha) de células infectadas con FB/EGFP-HT-VP2-466. Se muestra también un experimento control de células infectadas con FB/HT-VP2-466.



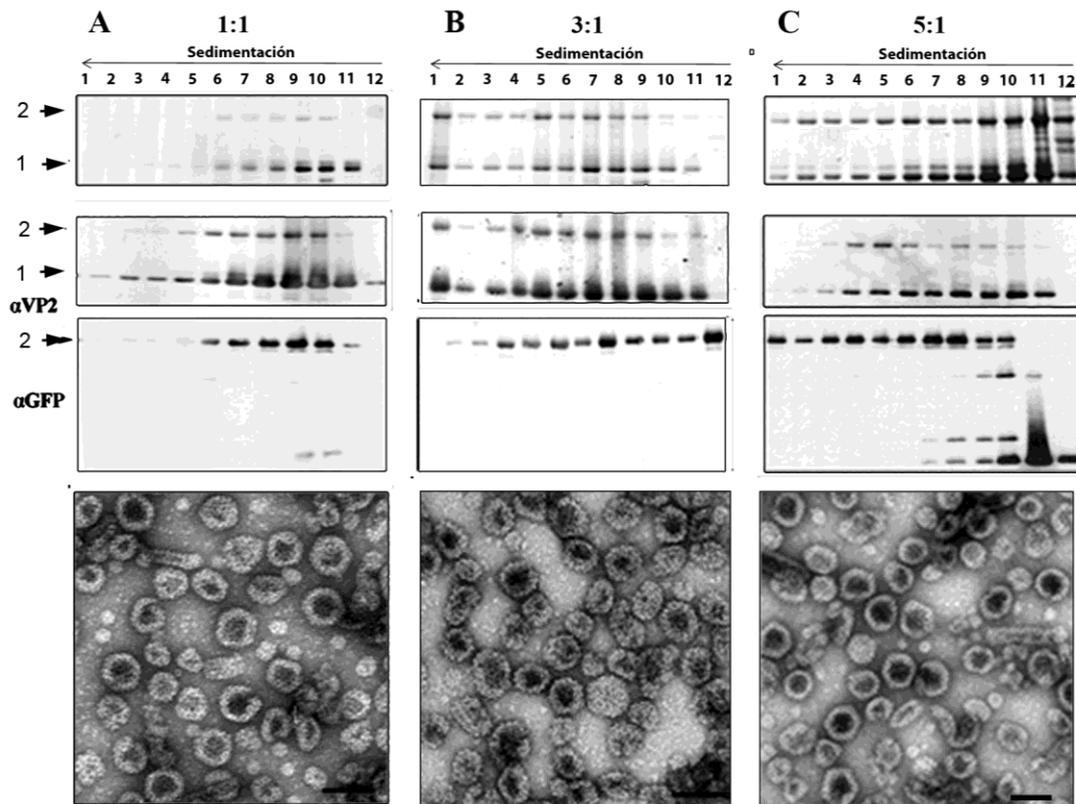
**Figura 10. Purificación en gradientes de sacarosa de ensamblados de FB/HT-VP2-466 y FB/EGFP-HT-VP2-466.** (A) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (arriba) o WB  $\alpha$ -VP2 (medio) de las fracciones obtenidas en las purificaciones en gradientes de sacarosa de ensamblados derivados de la expresión de HT-VP2-466, la flecha 1 indica la banda correspondiente a HT-VP2-466; análisis por microscopía electrónica y tinción negativa de la fracción 6 del gradiente (abajo). El recuadro muestra una imagen de viriones de IBDV. (B) Análisis de la purificación de ensamblados de EGFP-HT-VP2-466 mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (arriba) o WB  $\alpha$ -VP2 o  $\alpha$ -GFP (medio), la flecha 2 señala la banda EGFP-HT-VP2-466; análisis por microscopía electrónica de la fracción 6 del gradiente (abajo). La flecha superior en cada gradiente indica la dirección de sedimentación. La barra de escala corresponde a 100 nm.

Dada la baja eficiencia del ensamblaje de cápsidas y otros ensamblados a partir de la expresión de la proteína EGFP-HT-VP2-466, se decidió realizar coinfecciones con FB/EGFP-HT-VP2-466 y FB/HT-VP2-466 con el objetivo de favorecer el ensamblaje de VLPs. Las coinfecciones se realizaron a una moi inicial de 2-5 pfu/cel para cada rBV (relación 1:1). Además, se utilizaron diferentes relaciones de coinfección de los dos rBVs, manteniendo la moi de FB/HT-VP2-466 e incrementando progresivamente la de FB/EGFP-HT-VP2-466 hasta una relación 10:1. De este modo se pretendía establecer las condiciones que permiten una mayor cantidad incorporada de proteína de fusión en estas cápsidas mixtas. Las células fueron sometidas a un proceso de purificación por ultracentrifugación en gradientes lineales de sacarosa y las fracciones concentradas se analizaron por microscopía electrónica y SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie o WB con sueros  $\alpha$ -VP2 o  $\alpha$ -GFP. El análisis bioquímico de

las purificaciones obtenidas a partir de coinfecciones en relaciones 1:1, 3:1 y 5:1 muestra la presencia de dos bandas mayoritarias con una movilidad electroforética correspondiente a ~75 y ~50 kDa, similar a la de las proteínas EGFP-HT-VP2-466 y HT-VP2-466, respectivamente (Figura 11A-C, arriba). El análisis mediante tinción con azul de Coomassie demuestra que la proteína de fusión se incorpora de manera más eficiente en VLPs cuando se realizan las coinfecciones referidas. Las dos bandas mayoritarias son reconocidas por los sueros específicos  $\alpha$ -VP2 (Figura 11A-C, medio), mientras que solo la banda de ~75 kDa es reconocida por los anticuerpos  $\alpha$ -GFP (Figura 11A-C, abajo).

La relación entre la intensidad de las dos bandas nos permite determinar la proporción de proteína de fusión incorporada en las cápsidas quiméricas. La comparación de las muestras provenientes de coinfecciones de FB/HT-VP2-466 con cantidades crecientes de FB/EGFP-HT-VP2-466 muestra un aumento en la intensidad relativa de la banda de EGFP-HT-VP2-466 hasta la relación 5:1. En coinfecciones en relaciones superiores a 5:1, sin embargo, no se observó este incremento y la formación de estructuras tubulares estaba favorecida (no mostrado). Las fracciones centrales de las purificaciones obtenidas a partir de coinfecciones en relación 1:1, 3:1 y 5:1 se analizaron por microscopía electrónica y tinción negativa (Figura 11A-C, abajo). Este análisis demuestra la formación de cápsidas T=13, además de otros ensamblados, en todos los casos. Por tanto, el ensamblaje de EGFP-HT-VP2-466 en VLPs quiméricas está favorecido por la coinfección con FB/HT-VP2-466, y su incorporación es incrementada modificando la relación de las coinfecciones de ambos rBVs.

Para establecer la relación que permite una mayor incorporación de EGFP-HT-VP2-466 se realizó un análisis cuantitativo en las distintas coinfecciones. Las bandas correspondientes a EGFP-HT-VP2-466 y HT-VP2-466 presentes en las fracciones centrales enriquecidas en cápsidas T=13 (fracciones 5-7) de las purificaciones obtenidas a partir de las relaciones 1:1, 3:1, 5:1 y 10:1 fueron cuantificadas a partir de geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. La intensidad registrada de ambas bandas en cada fracción se normalizó en función del peso molecular de cada proteína y se calculó la relación entre ellas, obteniendo un porcentaje de incorporación que se utilizó para estimar el número de copias de proteína de fusión incorporadas por cápsida T=13 (Tabla 5). La condición óptima para el ensamblaje de cápsidas quiméricas mixtas se obtiene por coinfección de ambos rBVs en una relación 5:1, en la cual se obtienen cápsidas T=13 que incorporan ~240 copias de proteína de fusión/cápsida. Estas cápsidas quiméricas optimizadas fueron estudiadas por criomicroscopía electrónica y reconstrucción tridimensional y utilizadas para evaluar su capacidad inmunogénica.



**Figura 11. Obtención de cápsidas mixtas por coinfección de EGFP-HT-VP2466: HT-VP2-466 en relaciones de coinfección 1:1 (A), 3:1 (B) y 5:1 (C).** Análisis electroforético en geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie (arriba), WB  $\alpha$ -VP2 (medio) o WB  $\alpha$ -GFP (abajo) de las purificaciones obtenidas. Las flechas indican la movilidad de cada una de las proteínas. Los paneles inferiores muestran imágenes de tinción negativa de la fracción 6 de cada una de las purificaciones. La barra corresponde a 100 nm.

**Tabla 5. Incorporación de proteína de fusión en cápsidas mixtas**

Relación de infección rBv EGFP-HT-VP2-466:HT-VP2-466	% EGFP-HT-VP2-466 (F 5-7)	Copias/cápsida T=13
1:1	18	148
3:1	27 $\pm$ 4	210 $\pm$ 31
5:1	31 $\pm$ 2	240 $\pm$ 16
10:1	25	195

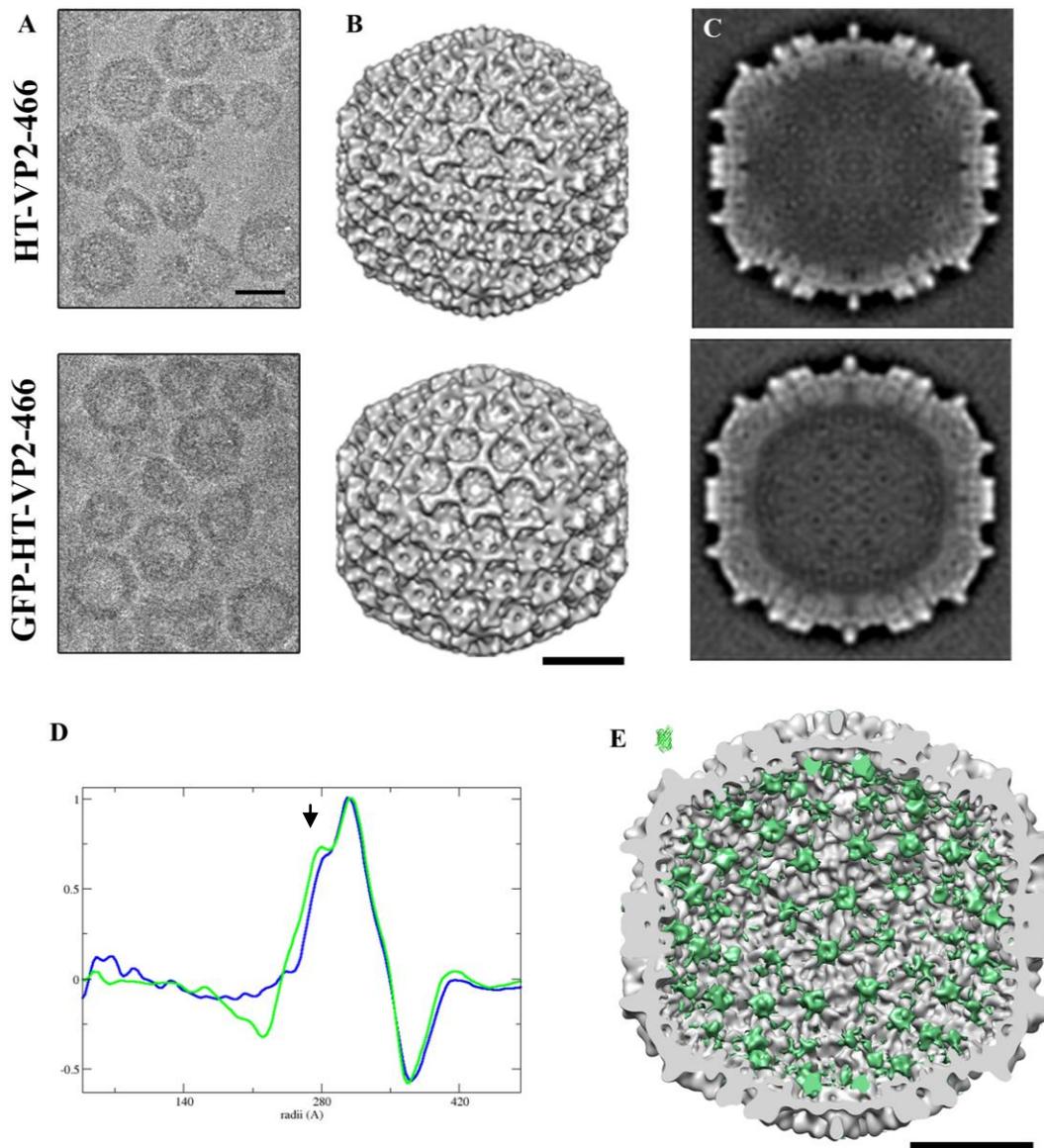
#### 4.1.4. Criomicroscopía electrónica tridimensional de VLPs quiméricas que contienen EGFP-HT-VP2-466

Las cápsidas mixtas de EGFP-HT-VP2-466 fueron analizadas mediante criomicroscopía electrónica para la determinación de su estructura tridimensional. La principal ventaja de esta técnica es que permite observar las partículas en condiciones hidratadas que reproducen fielmente su estado conformacional nativo, gracias a que las muestras son sometidas a una

congelación a alta velocidad denominada vitrificación. Muestras purificadas tanto de las cápsidas mixtas de EGFP-HT-VP2-466 como de cápsidas HT-VP2-466 fueron vitrificadas y, dada la heterogeneidad estructural de los ensamblados presentes en ambas muestras, se seleccionaron solo las partículas de morfología y tamaño similares a las cápsidas T=13 de IBDV (Figura 12A). Los mapas de densidad de las cápsidas fueron calculados a partir de 600 imágenes de cápsidas de EGFP-HT-VP2-466 y 1,267 de HT-VP2-466 y su resolución fue estimada mediante el cálculo de la función FSC en 22.7 Å y 20.8 Å, respectivamente. La superficie externa de estos dos mapas muestra los elementos característicos de la cápsida de IBDV, donde se pueden distinguir los 5 tipos de trímeros que conforman la simetría T=13 *levo* (Figura 12B). La comparación entre las secciones centrales de los mapas muestra que la cápsida EGFP-HT-VP2-466 tiene un grosor mayor que la cápsida HT-VP2-466, que se puede atribuir a la presencia de EGFP fusionada hacia el interior de la cápsida (Figura 12C). Este incremento del grosor de la cápsida también se pone de manifiesto claramente al comparar los perfiles de densidad radial de ambos mapas (Figura 12D); las cápsidas EGFP-HT-VP2-466 contienen otro máximo de densidad correspondiente a un radio de 280 Å (hacia el interior de la cápsida). Para definir con mayor precisión las densidades adicionales atribuibles a EGFP en la cápsida EGFP-HT-VP2-466 se calculó el mapa diferencia entre las dos reconstrucciones mediante la sustracción aritmética de los valores de densidad normalizados de cada cápsida. Las densidades resultantes de esta operación se muestran superpuestas sobre el modelo de HT-VP2-466 en la Figura 12D, y se localizan en la superficie interna de la cápsida, concentradas mayoritariamente en el centro de las posiciones hexaméricas y también, en menor medida, en el centro de los vértices pentaméricos. Sin embargo, las densidades observadas en el mapa diferencia calculado son de un tamaño ligeramente inferior al necesario para ajustar en ellas el número total de moléculas de EGFP contenidas en el interior de la cápsida. El hecho de que solo el 31% de las copias de HT-VP2-466 están fusionadas a EGFP y que ésta pueda disponer de cierta movilidad con respecto a (p)VP2 son dos factores que pueden explicar el menor tamaño de la densidad correspondiente a EGFP al imponer simetría icosaédrica a la reconstrucción.

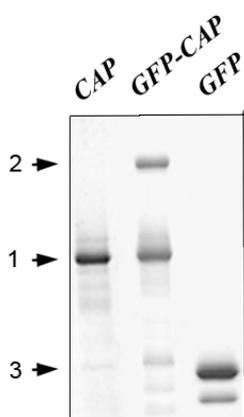
#### **4.1.5. Inmunización de ratones con estructuras quiméricas de EGFP-HT-VP2-466**

Trabajos previos realizados a partir de VLPs de diferentes virus a las cuales se les han fusionado antígenos heterólogos en algún punto de la secuencia de la proteína estructural han mostrado que el uso de estas superficies presentadoras maximiza la respuesta inmune inducida contra la proteína heteróloga (Bárcena). Por ello, el siguiente objetivo planteado fue la caracterización de las propiedades inmunogénicas de las VLPs quiméricas que contienen EGFP-HT-VP2-466 mediante su inoculación en ratones y el análisis posterior de la respuesta inmune inducida contra la proteína heteróloga.



**Figura 12. Criomicroscopía electrónica y reconstrucción 3D de cápsidas HT-VP2-466 y EGFP-HT-VP2-466.** (A) Área representativa de una micrografía de criomicroscopía electrónica de cápsidas HT-VP2-466 (arriba) y EGFP-HT-VP2-466 (abajo); la barra de escala representa 50 nm. (B) Superficie externa de las reconstrucciones 3D de las cápsidas HT-VP2-466 (20.8 Å) y EGFP-HT-VP2-466 (22.7 Å) vistas desde un eje de simetría de orden 2. (C) Secciones centrales de los mapas. (D) Plot de densidad radial de la cápsida HT-VP2-466 (azul) y EGFP-HT-VP2-466 (verde). Se indica con una flecha el máximo atribuido a la presencia de EGFP. (E) Mapa diferencia entre las dos reconstrucciones (verde) superpuesto sobre la cápsida HT-VP2-466 (gris). A la izquierda se muestra la estructura atómica de EGFP a escala con respecto al tamaño de la cápsida. La barra de escala corresponde a 200 Å.

Se realizaron inmunizaciones de cuatro grupos de seis ratones BALB/c con las siguientes muestras: cápsidas EGFP-HT-VP2-466 (GFP-CAP), cápsidas HT-VP2-466 (CAP), HT-EGFP soluble expresada en el sistema de rBVs (GFP) y una mezcla de cápsidas HT-VP2-466 con EGFP soluble (CAP + GFP) (Figura 13). En adelante, para simplificar la nomenclatura, las diferentes muestras serán referidas como GFP-CAP, CAP, GFP y CAP + GFP. A partir de las cantidades de GFP y VP2 contenidas en las cápsidas quiméricas GFP-CAP se estableció la cantidad de antígeno utilizada en las inmunizaciones de los grupos restantes. Con objeto de maximizar la respuesta inmune, todos los antígenos se inyectaron emulsionados con adyuvante completo de Freund (ACF) en la primera dosis e incompleto (AIF) en las dos dosis siguientes, siguiendo el protocolo de inmunización descrito en el apartado 3.7.1. En cada dosis se utilizó la cantidad del antígeno correspondiente indicada en la Tabla 6.



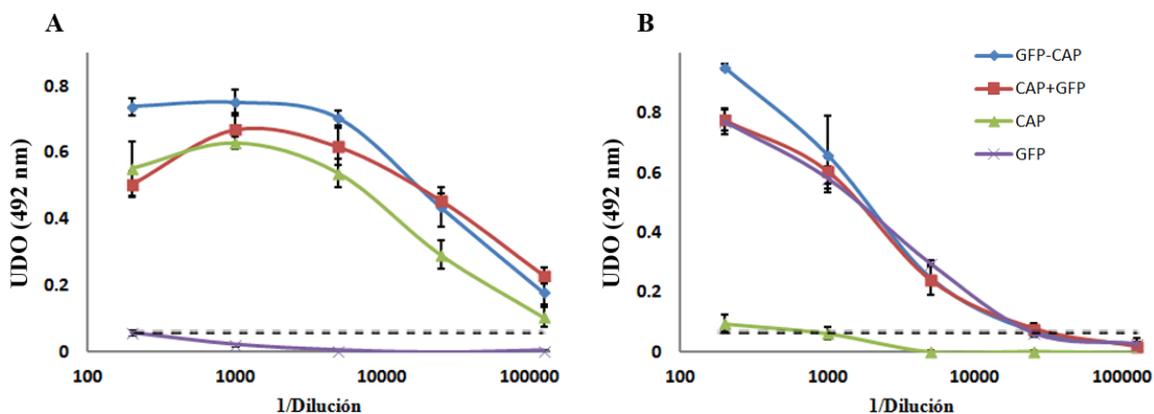
**Tabla 6. Composición de las muestras utilizadas para la inmunización de ratones, por animal y dosis**

<i>Antígeno</i>	<i>µg prot total</i>	<i>µg CAP</i>	<i>µg GFP</i>
<b>GFP-CAP</b>	30	25.2	4.8
<b>CAP</b>	25.2	25.2	-
<b>GFP</b>	4.8	-	4.8
<b>CAP + GFP</b>	30	25.2	4.8

**Figura 13. Análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de los antígenos utilizados en los experimentos de inmunización de ratones con cápsidas quiméricas que incorporan EGFP.** De izquierda a derecha, cápsidas HT-VP2-466 (CAP), EGFP-HT-VP2-466 (GFP-CAP) y HT-EGFP soluble (GFP). Las flechas con números indican la movilidad electroforética de (1) HT-VP2-466, (2) GFP-CAP y (3) GFP

Diez días después de la tercera dosis de inmunización se obtuvo una muestra de sangre de los ratones para su análisis por ELISA. Los sueros fueron analizados paralelamente en placas tapizadas con VLPs de IBDV o con EGFP para determinar las respuestas inducidas frente a CAP (HT-VP2-466) y EGFP. Con objeto de disminuir inespecificidades con el sistema de baculovirus y las células de insecto, las VLPs de IBDV fueron purificadas a partir de la expresión de rVV vT7/LacOI/Poly en células BSC-40, mientras que la EGFP fue purificada a partir de cultivos bacterianos.

El título de cada suero se calculó como la inversa de la dilución a la cual la intensidad de la señal es el 50% de la señal en la zona de saturación (*plateau*). Para las curvas que no llegan a saturación, el título se definió como la inversa de la dilución a la cual la intensidad de la señal es la mitad de la intensidad máxima registrada en el experimento. La respuesta frente a la proteína fusionada no fue enmascarada por la respuesta frente a la proteína de la cápsida de IBVDV, aunque el título de anticuerpo específico dirigido contra CAP (Figura 14A) es al menos un orden de magnitud superior al título de anticuerpo producido contra la proteína heteróloga GFP (Figura 14B). Los títulos promedio de los sueros ensayados se indican en la Tabla 7. Las curvas de titulación muestran que la producción de anticuerpo específico contra EGFP es similar independientemente de que ésta se encuentre fusionada en el interior de las cápsidas quiméricas o soluble, tanto en presencia como en ausencia de CAP.



**Figura 14. Titulación mediante ELISA de los sueros de los ratones inmunizados en presencia de AF.** Promedio de las titulaciones de 3 ratones de cada grupo inmunizado utilizando (A) VLPs de IBVDV y (B) GFP de origen bacteriano. La línea discontinua muestra la señal de fondo registrada para cada tapiz usando un suero de ratón no relacionado.

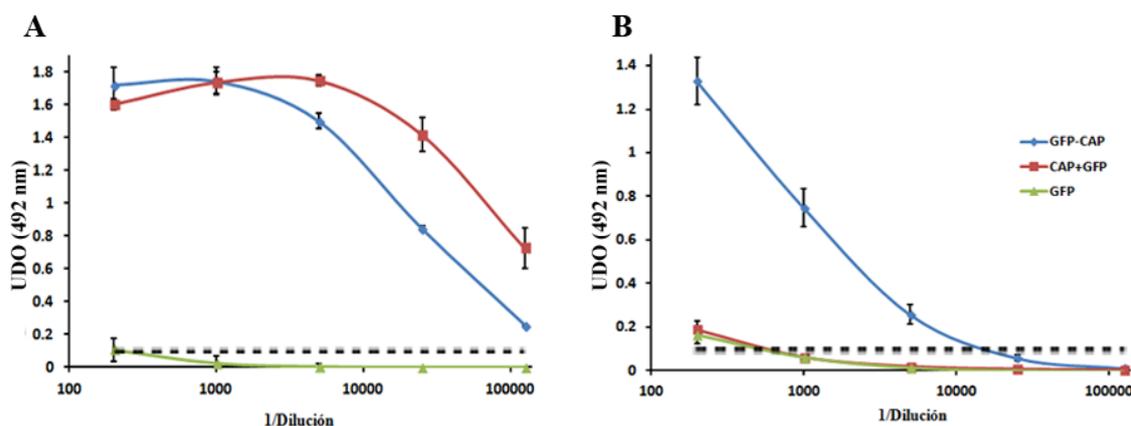
**Tabla 7: Título promedio de anticuerpo específico en los sueros de ratones inmunizados en presencia de AF**

	<i>Título <math>\alpha</math>-VP2</i>	<i>Título <math>\alpha</math>-GFP</i>
<b>GFP-CAP</b>	$3 \times 10^4$	$2 \times 10^3$
<b>CAP</b>	$2 \times 10^4$	-
<b>GFP</b>	-	$2 \times 10^3$
<b>CAP + GFP</b>	$6 \times 10^4$	$2 \times 10^3$

Las VLPs que transportan antígenos heterólogos ejercen una función adyuvante sobre la proteína o péptido fusionado (Crisci *et al.*, 2012). Sin embargo, en los ensayos anteriores no se

observó un incremento en el título de anticuerpo específico contra GFP cuando esta proteína se encuentra formando parte de VLPs quiméricas. Nos planteamos comprobar si la utilización de AF podría estar enmascarando el efecto adyuvante ejercido por la propia cápsida. Para ello se realizó una segunda tanda de inmunizaciones en la que todos los antígenos se administraron en una disolución de PBS y en ausencia de adyuvantes (ACF o AIF). Se inmunizaron 3 grupos de 4 ratones BALB/c con los antígenos GFP-CAP, CAP + GFP y GFP soluble, siguiendo el mismo protocolo y utilizando las mismas dosis que en el experimento anterior (ver Tabla 6).

El título de anticuerpo de los sueros extraídos tras la tercera inmunización fue analizado mediante ELISA frente a VLPs de IBDV y HT-EGFP. Las curvas de titulación muestran que, en ausencia de adyuvante, la respuesta de anticuerpos dirigidos específicamente contra CAP (Figura 15A) se encuentra en el mismo rango que la obtenida anteriormente en presencia de AF, con títulos del orden de  $\sim 10^4$  (Tabla 8). El análisis de los sueros en ELISAs frente a GFP revela que solamente se obtiene un título significativo de anticuerpo específico contra GFP cuando ésta se encuentra fusionada a la cápsida formando las VLPs quiméricas GFP-CAP (Figura 15B). La inmunización con GFP soluble, en presencia o ausencia de CAP, da lugar a una respuesta prácticamente nula. Cabe destacar que el título de anticuerpo contra GFP producido por la inmunización con VLPs quiméricas en ausencia de adyuvantes externos es ligeramente inferior al obtenido cuando las muestras se inyectan emulsionadas con AF, aunque del mismo orden. Estos resultados indican que la cápsida de IBDV ejerce una importante función adyuvante sobre la proteína heteróloga.



**Figura 15. Titulación mediante ELISA de los sueros de los ratones inmunizados en ausencia de adyuvante.** Promedio de las titulaciones de los sueros de los 4 ratones de cada grupo inmunizado frente a (A) VLPs de IBDV y (B) GFP de origen bacteriano. La línea discontinua muestra la señal de fondo registrada para cada tapiz usando un suero de ratón no relacionado.

**Tabla 8: Título promedio de anticuerpo específico en los sueros de ratones inmunizados en ausencia de adyuvante**

	<i>Título <math>\alpha</math>-VP2</i>	<i>Título <math>\alpha</math>-GFP*</i>
<b>GFP-CAP</b>	3 x10 <sup>4</sup>	1.25 x10 <sup>3</sup>
<b>CAP + GFP</b>	2.5 x10 <sup>4</sup>	< 200
<b>GFP</b>	-	< 200

En resumen, los resultados descritos sugieren que la coexpresión de las proteínas EGFP-HT-VP2-466 y HT-VP2-466 con el sistema de rBVs permite el ensamblaje eficiente de VLPs mixtas que incorporan un número máximo de ~240 copias de la proteína heteróloga en su interior, sin alterar la estructura de la cápsida T=13. La integridad estructural de la cápsida como vehículo presentador de antígenos es esencial para potenciar la inmunogenicidad de la proteína heteróloga. Por ello, continuamos con esta línea de investigación de las cápsidas HT-VP2-466 para insertar en ellas otros antígenos de mayor relevancia médica y/o veterinaria.

#### **4.2. Obtención de estructuras quiméricas de HT-VP2-466 con antígenos del virus de la gripe A/PR8**

##### **4.2.1. Diseño y construcción de proteínas de fusión de HT-VP2-466 con HA y M2**

El sistema de obtención de VLPs quiméricas de IBDV a partir de la expresión de proteínas de fusión a HT-VP2-466 fue utilizado para incorporar diferentes antígenos del virus de la gripe. Las construcciones de fusión se generaron utilizando como base el virus de la gripe A/PR8/8/34 (H1N1), una cepa vacunal adaptada a ratón y ampliamente utilizada como modelo en estudios de desafío viral de ratones. Se seleccionaron las siguientes proteínas y fragmentos para la construcción de proteínas de fusión con HT-VP2-466:

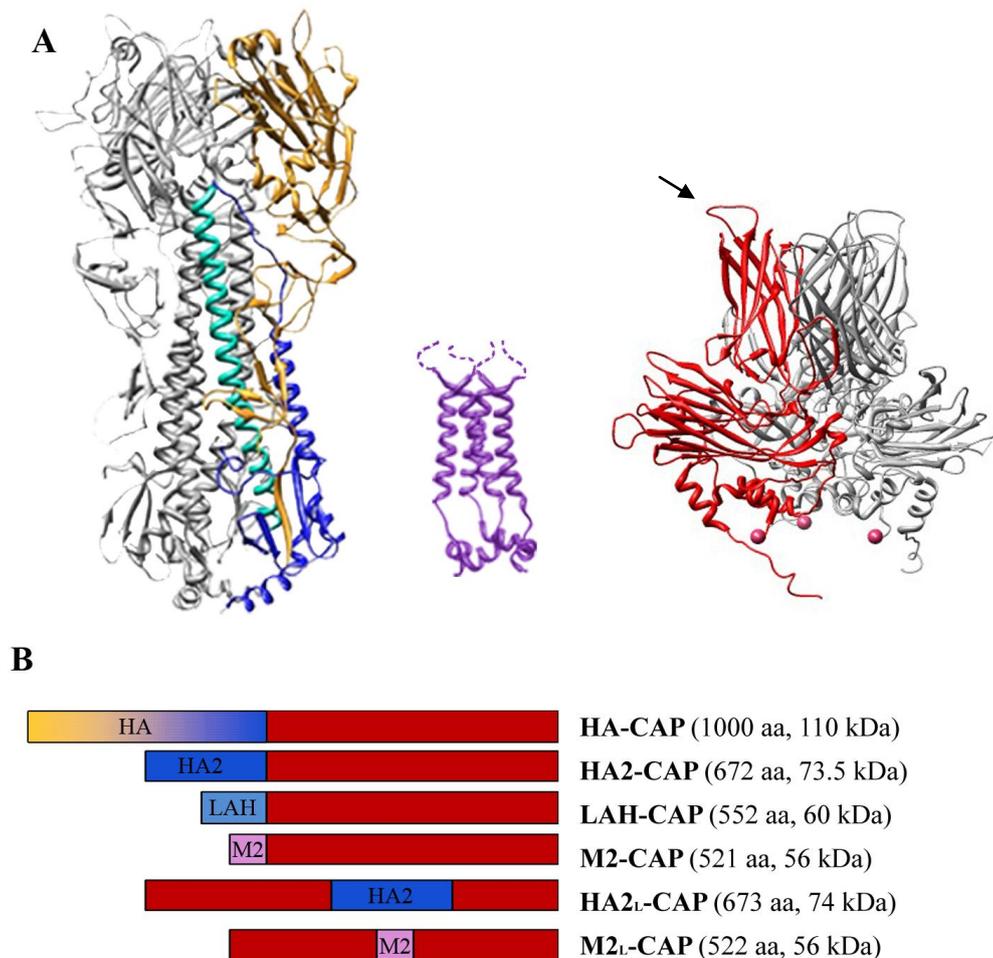
- La **hemaglutinina (HA)** es una proteína localizada en la superficie externa del virión implicada en la unión del virus al receptor celular. Por tanto, es un excelente candidato para generar anticuerpos que neutralicen la infectividad del virus. HA forma trímeros o peplómeros con un “tallo” y una “cabeza” globular (Figura 16A). Cada monómero consta de dos dominios: HA1, que comprende principalmente el dominio globular, y HA2, que constituye el tallo. A nivel de secuencia el dominio HA2 está más conservado que el dominio HA1. Dentro del dominio HA2, la hélice  $\alpha$  principal del tallo, denominada LAH (*long alpha-helix*, hélice  $\alpha$  larga), constituye la región más

conservada (Wang *et al.*, 2010). La proteína **HA**, el dominio **HA2** y el fragmento **LAH** fueron seleccionados para su inserción en cápsidas quiméricas.

- La proteína **M2** es una proteína integral de membrana que forma canales iónicos selectivos de protones. Se encuentra formando tetrámeros y cada monómero está formado por una hélice  $\alpha$  principal que atraviesa la membrana, un segmento C-terminal estructurado que se localiza hacia el interior de la partícula viral y un segmento N-terminal expuesto a la superficie del virus (Figura 16A). El segmento N-terminal consta de 23 residuos altamente conservados entre todas las cepas de gripe conocidas (Neiryneck *et al.*, 1999). Estas características motivaron la selección del extremo N-terminal de **M2** para la generación de proteínas de fusión con HT-VP2-466.

Además de seleccionar la posición N-terminal de HT-VP2-466 para realizar las distintas proteínas quiméricas, decidimos incorporar en algunos casos estos antígenos en un lazo o *loop* localizado en el dominio protuberante de VP2 de manera que el antígeno quedara expuesto en la superficie de la cápsida quimérica. Para ello se seleccionó el lazo que conecta las cadenas H e I (**loop PHI**), ya que es el más largo del dominio P y no interviene en las interacciones intratriméricas de VP2 (Figura 16 A, flecha). El fragmento de M2 descrito, de pequeño tamaño y desestructurado, es a priori el mejor candidato para su inserción en esta posición. También fue introducido en la misma posición el dominio HA2, ya que sus extremos N y C-terminales quedan localizados próximos hacia la base del tallo, posibilitando la formación de la cápsida.

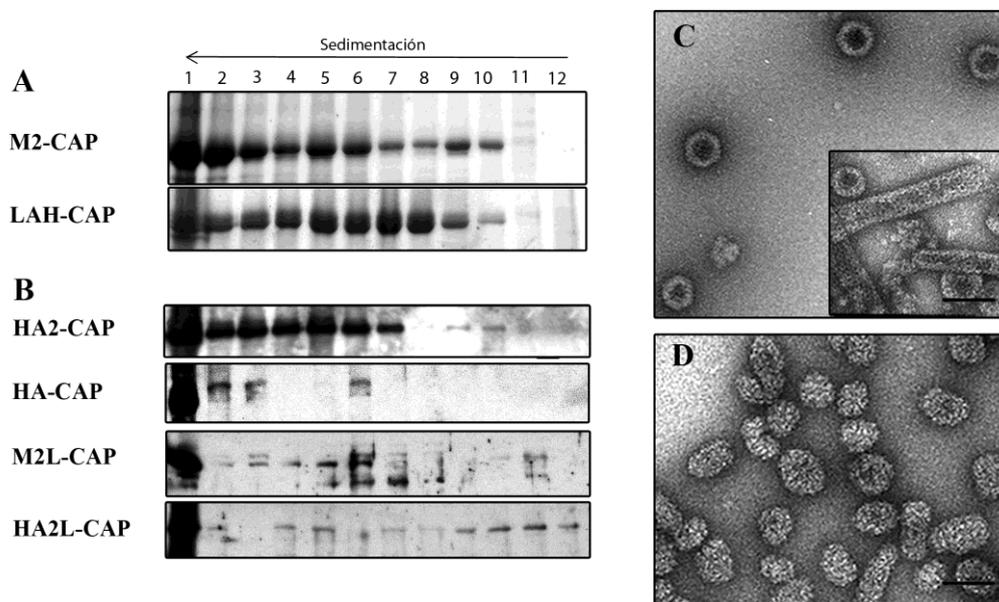
El vector pFastBac HT-VP2-466 carece de dianas de restricción en su extremo N-terminal y en el *loop* PHI para introducir insertos en esas posiciones. Por ello, se generaron dos variaciones del vector HT-VP2-466 en las que se incorporó por mutagénesis dirigida una diana de restricción de la enzima *NotI* en la posición correspondiente, como se describe en el apartado 3.2.4. Estas dos plataformas fueron utilizadas para generar seis construcciones que se denominarán en adelante con la nomenclatura que aparece entre paréntesis: HA-HT-VP2-466 (**HA-CAP**), HA2-HT-VP2-466 (**HA2-CAP**), LAH-HT-VP2-466 (**LAH-CAP**), M2-HT-VP2-466 (**M2-CAP**), HT-HA<sub>2L</sub>-VP2-466 (**HA<sub>2L</sub>-CAP**) y HT-M<sub>2L</sub>-VP2-466 (**M<sub>2L</sub>-CAP**) (Figura 16 B).



**Figura 16. Diseño de las construcciones de fusión de HT-VP2-466 con antígenos del virus de la gripe.** (A) Estructura atómica de un trímero de HA (PDB 1RU7, Russell *et al.*, 2004; izquierda); el dominio HA1 se muestra en naranja, el dominio HA2 en azul y la LAH de HA2 se destaca en azul claro. Estructura atómica de un tetramero de M2 (PDB 2KWX, Pielak y Chou, 2010; centro), la línea discontinua indica el extremo N-terminal (23 aa). Estructura atómica de un trímero de VP2 (PDB 2GSY, Garriga *et al.*, 2006; derecha), donde se muestra en un monómero en rojo y se destacan con esferas los extremos N-terminales y con una flecha el *loop* PHI. (B) esquema de las construcciones de fusión generadas.

y tinción con azul de Coomassie o WB utilizando anticuerpos  $\alpha$ -VP2 (Figura 17). Las construcciones que incorporan M2-CAP y LAH-CAP dan lugar a bandas intensas de la proteína de fusión a lo largo de todo el gradiente, centradas en la zona inferior (fracciones 1-6, M2-CAP) o central (fracciones 4-8, LAH-CAP) del gradiente de sacarosa (Figura 17A). El análisis por microscopía electrónica de las fracciones centrales de la purificación de M2-CAP reveló la presencia de ensamblados similares a las cápsidas T=13 (Figura 17C); en las fracciones inferiores del gradiente se observan numerosas estructuras tubulares similares a los tubos de tipo I de pVP2 (recuadro en Figura 17C). El análisis por microscopía electrónica de

las fracciones centrales de la purificación de LAH-CAP muestra una mayor heterogeneidad de los ensamblados obtenidos (Figura 17D), que comprenden agregados similares a las cápsidas T=13 hasta ensamblados tubulares de morfología irregular. El análisis de las purificaciones derivadas de la expresión de HA2-CAP, HA-CAP, M2<sub>L</sub>-CAP y HA2<sub>L</sub>-CAP muestran una menor eficiencia de ensamblaje, y únicamente la proteína de fusión HA2-CAP da lugar a bandas significativas de proteína (Figura 17B). Sin embargo, el análisis por microscopía electrónica y tinción negativa de estas fracciones no nos permitió detectar agregados estructurados. Estos resultados sugieren que únicamente la expresión de M2-CAP y LAH-CAP da lugar al ensamblaje eficiente de ensamblados macromoleculares.



**Figura 17. Expresión y purificación de ensamblados derivados de la expresión de proteínas de fusión de HT-VP2-466 con antígenos del virus de la gripe.** (A) Análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las purificaciones de M2-CAP y LAH-CAP. La flecha indica la dirección de sedimentación. (B) Análisis por SDS-PAGE y WB  $\alpha$ -VP2 de purificaciones de HA2-CAP, HA-CAP, HA2<sub>L</sub>-CAP y M2<sub>L</sub>-CAP. (C) Imagen de microscopía electrónica y tinción negativa de la fracción 6 de la purificación de M2-CAP. El recuadro muestra una imagen de la fracción 2. (D) Imagen de microscopía electrónica y tinción negativa de la fracción 6 de la purificación de LAH-CAP. La barra de escala corresponde a 100 nm.

ensamblaje en cápsidas quiméricas a partir de la expresión individual de cada proteína recombinante. Teniendo en cuenta las bases establecidas para las cápsidas quiméricas con EGFP, el siguiente paso planteado fue la optimización del ensamblaje de cápsidas mixtas mediante coinfección de FB/HA-CAP, FB/HA2-CAP, FB/HA2<sub>L</sub>-CAP o FB/M2<sub>L</sub>-CAP con FB/HT-VP2-466. Además, dada la eficiencia del ensamblaje de VLPs a partir de la construcción M2-CAP, se realizaron coinfecciones también con FB/M2-CAP para obtener VLPs mixtas que incorporen dos antígenos diferentes simultáneamente. Con este objetivo se realizaron coinfecciones a escala semipreparativa de células H5 utilizando conjuntamente los

rBVs FB/HA-CAP, FB/HA2-CAP, FB/HA2<sub>L</sub>-CAP o FB/M2<sub>L</sub>-CAP con FB/HT-VP2-466 (CAP) o con FB/M2-CAP. Además, cada coinfección fue ensayada en diferentes relaciones, tal como se describió para las proteínas de fusión con EGFP, partiendo de una relación 1:1 e incrementando la cantidad del rBV que incorpora el antígeno de interés hasta una relación 10:1. Todas las coinfecciones y las purificaciones de las células infectadas se realizaron siguiendo los mismos protocolos ya descritos.

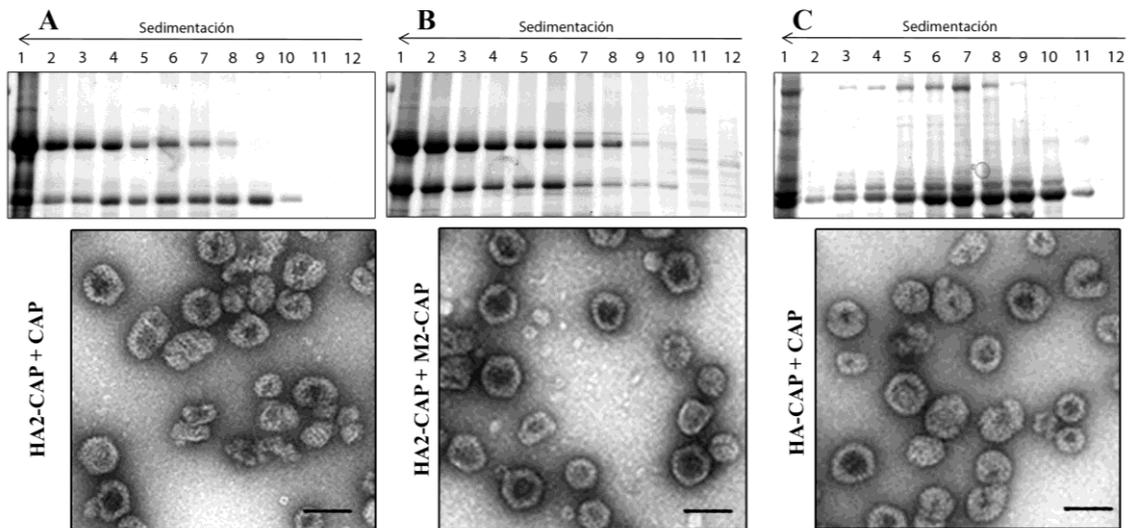
La Tabla 9 presenta un resumen de la eficiencia de ensamblaje de las diferentes proteínas de fusión. Dado el elevado número de combinaciones finales, solo se muestran en detalle los análisis correspondientes a las condiciones que dan lugar a un ensamblaje eficiente.

**Tabla 9. Eficiencia del ensamblaje de proteínas de fusión por coinfección con CAP y M2-CAP**

	HA2-CAP	HA-CAP	HA2 <sub>L</sub> -CAP	M2 <sub>L</sub> -CAP
CAP	++	+	-	-
M2-CAP	++	-	-	-

*Ensamblaje (++) eficiente; (+) poco eficiente (-) ineficiente*

El análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las fracciones de los gradientes provenientes de células coinfectadas con HA2-CAP y CAP en relación 3:1 (Figura 18A) o HA2-CAP y M2-CAP en relación 1:1 (Figura 18B) muestra la presencia de dos bandas de proteína con las movilidades electroforéticas esperadas, principalmente en la zona central e inferior de los gradientes. La banda de mayor peso molecular (~75 kDa) corresponde a la proteína HA2-CAP, y las bandas inferiores (~50 kDa y ~56 kDa) a las proteínas CAP y M2-CAP, respectivamente. El análisis por microscopía electrónica y tinción negativa de las fracciones centrales de estas purificaciones (Figura 18A y B, abajo) muestra la presencia de ensamblados de morfología y tamaño similares a cápsidas T=13, así como otros agregados de menor tamaño. La incorporación de la proteína HA-CAP en cápsidas mixtas sólo se consiguió a partir de la coinfección con CAP en relación 10:1 (Figura 18C). El análisis por SDS-PAGE muestra que la banda correspondiente a la proteína HA-CAP (~110 kDa) se localiza en las fracciones centrales del gradiente, y su intensidad relativa a la banda de CAP (~50 kDa) indica que el número de copias incorporadas por cápsida es bajo. El tipo de ensamblados observados por microscopía electrónica (Figura 18C, abajo) es similar a los obtenidos en las purificaciones descritas anteriormente, e incluyen cápsidas T=13 y estructuras de menor tamaño. Las dos proteínas de fusión que incluyen los antígenos M2 y HA2 en el *loop* PHI de VP2 no se consiguieron incorporar de manera eficiente por coexpresión con CAP o M2-CAP y fueron descartadas para los siguientes experimentos.



**Figura 18. Incorporación de HA-CAP y HA2-CAP en cápsidas mixtas mediante coinfección.** Análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (arriba) y por microscopía electrónica y tinción negativa (abajo) de coinfecciones de (A) HA2-CAP con CAP en relación 3:1; (B) HA2-CAP con M2 en relación 1:1; (C) HA-CAP con CAP en relación 10:1. La flecha indica la dirección de sedimentación. La barra de escala corresponde a 100 nm.

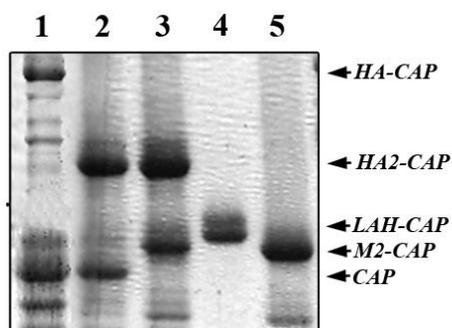
Los 5 tipos de cápsidas quiméricas que incorporan eficientemente antígenos del virus de la gripe son: HA-CAP + CAP, HA2-CAP + CAP, HA2-CAP + M2-CAP, LAH-CAP y M2-CAP (Figura 19). Estos ensamblados fueron utilizados para la inmunización de ratones, con el objetivo de inducir una respuesta inmune, cuantificar los anticuerpos específicos producidos contra el virus de la gripe y evaluar la capacidad protectora conferida frente a un desafío viral. Para que las condiciones de inmunización fuesen similares entre los diferentes antígenos, la cantidad de proteína total en cada dosis se fijó en 30-40  $\mu\text{g}$ , de los cuales  $\sim 4$   $\mu\text{g}$  corresponden a la proteína o segmento peptídico heterólogo (Tabla 10). Se inmunizó un grupo de 6 ratones con cada muestra, utilizando en todos los casos AF para maximizar la respuesta contra la proteína heteróloga. Además de estos grupos se incluyeron dos grupos control, uno inmunizado con GFP-CAP para controlar el efecto de la respuesta inducida frente a la cápsida y otro al que se inyectó PBS sin ningún antígeno.

Las inmunizaciones fueron realizadas siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.7.1, basado en tres dosis de inmunización, espaciadas entre sí 21 días con objeto de que los animales no superaran las 12 semanas de edad en el momento del desafío viral. Transcurridos 10 días después de la tercera dosis, una muestra de sangre de cada ratón fue extraída y los sueros analizado por ELISA; 4 días después los animales fueron sometidos a un desafío con virus de la gripe A/PR8.

**Tabla 10. VLPs quiméricas que contienen diferentes antígenos del virus de la gripe A/PR8 utilizadas para la inmunización de ratones**

<i>Antígeno</i>	<i>% prot. fusión (F5-7)</i>	<i>µg prot. total*</i>	<i>µg VP2*</i>	<i>µg antígeno*</i>
<b>HA-CAP + CAP</b>	10%	40	36.3	3.7
<b>HA2-CAP + CAP</b>	45%	30	25.7	4.3
<b>LAH-CAP</b>	100%	40	35.5	4.5
<b>M2-CAP</b>	100%	40	38	2
<b>HA2-CAP+M2-CAP</b>	57% + 43%	30	23.9	5.6 +0.5
<b>GFP-CAP</b>	31%	28	23.8	4.2
<b>PBS</b>	-	-	-	-

\*Cantidades de proteína utilizadas por animal y dosis



**Figura 19. Análisis de las VLPs quiméricas que contienen antígenos del virus de la gripe.** Análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de las cápsidas quiméricas utilizadas en los experimentos de inmunización, formadas por (1) HA-CAP+CAP; (2) HA2-CAP+CAP; (3) HA2-CAP + M2-CAP; (4) LAH-CAP y (5) M2-CAP.

#### 4.2.5. Desafío viral de ratones inmunizados con cápsidas quiméricas HA y M2

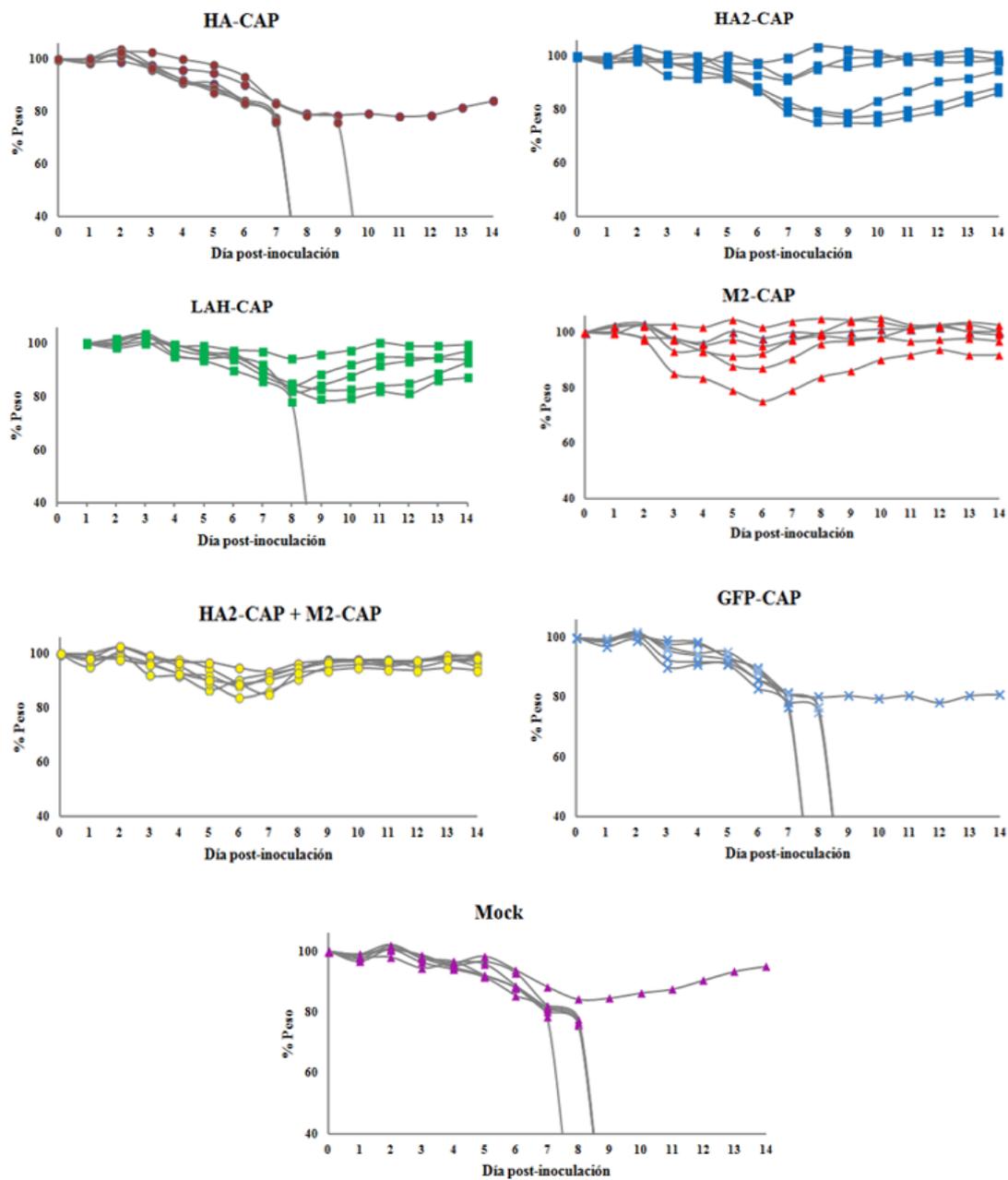
Los ensayos de desafío viral permiten comprobar *in vivo* la capacidad de la respuesta generada en la inmunización para neutralizar la infección, y constituyen por tanto el mejor método para evaluar el éxito de una estrategia de vacunación. Con este objetivo los ratones inmunizados con las diferentes cápsidas quiméricas con antígenos del virus de la gripe fueron sometidos a un desafío con virus de la gripe A/PR8.

Transcurridos 14 días después de la tercera dosis de inmunización, los ratones fueron anestesiados e inoculados intranasalmente con 500 pfu/animal de virus de la gripe, una dosis que corresponde a ~2-5 veces la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) calculada previamente para este virus. La evolución del peso de los ratones es un buen indicativo de su grado de enfermedad, por lo que el peso de cada animal fue monitorizado durante los 14 días posteriores a la inoculación. Cuando el peso registrado fue inferior al 75% del peso inicial del individuo, el animal fue

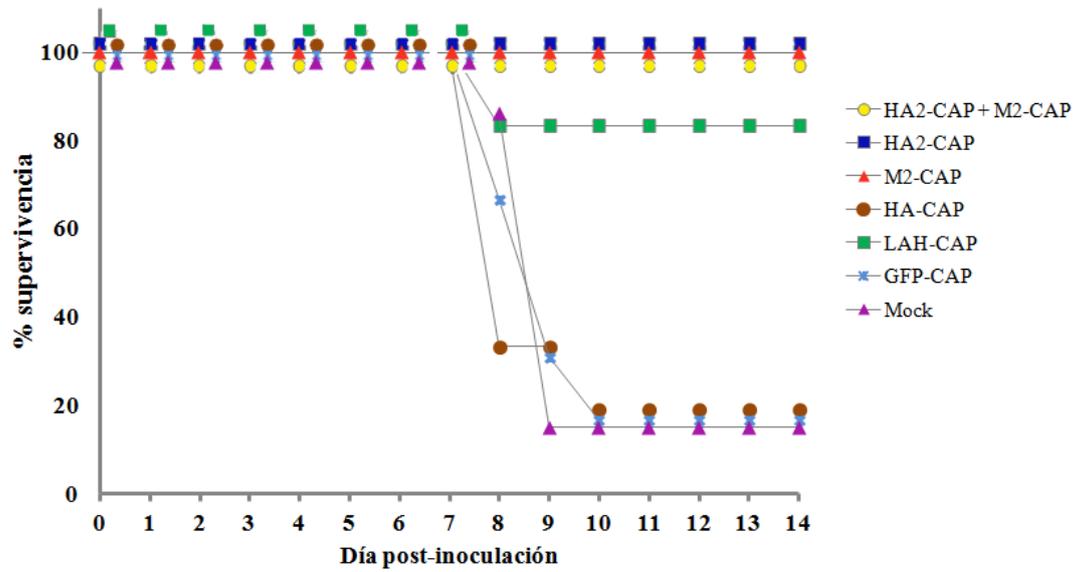
considerado muerto y sacrificado. En los grupos control las muertes se registraron entre los días 7 y 9 después de la inoculación.

La Figura 20 muestra la variación del peso de cada animal, expresado como porcentaje de su peso inicial. En los dos grupos control, GFP-CAP y Mock, se observa una pérdida de peso continuada a partir del día 3 post-inoculación que resulta en la muerte del 83% de los individuos entre los días 7 y 9 post-inoculación. Los ratones inmunizados con HA-CAP muestran el mismo comportamiento y exhiben una pérdida de peso severa y un porcentaje de mortalidad igual al de los grupos control, por lo que se infiere que esta construcción no proporciona una inmunidad eficiente contra el virus A/PR8. La evolución de los ratones del grupo LAH-CAP es más heterogénea; el 83% experimentan una gran pérdida de peso, si bien solo el 17% desemboca en la muerte del animal. Los grupos más protegidos son los inmunizados con HA2-CAP, M2-CAP y la combinación HA2-CAP + M2-CAP. En los tres casos la supervivencia de los animales es del 100%, aunque presentan un grado de protección contra la enfermedad variable. En el grupo de HA2-CAP, el 50% de los individuos experimenta una pérdida de peso hasta valores inferiores al 80% que recuperan posteriormente, mientras que el 50% se mantiene en valores muy próximos al peso inicial. En el grupo de M2 el 84% de los individuos se mantienen en valores cercanos al 90% del peso inicial, indicativo de un alto grado de protección. Finalmente, en el grupo de HA2-CAP + M2-CAP los animales se comportan de manera muy homogénea y el 100% de los individuos se mantiene por encima del 85% de su peso inicial a lo largo de todo el experimento.

La figura 21 resume los resultados de los experimentos de desafío viral en términos de supervivencia. Con la dosis utilizada de virus, en los grupos de ratones no protegidos la supervivencia es del 16,7% (grupos Mock y GFP-CAP). En el caso de los ratones inmunizados con cápsidas que contienen HA la supervivencia es la misma (grupo HA-CAP), lo cual sugiere que no se ha inducido protección. Sin embargo, en el resto de grupos ensayados la supervivencia se ve claramente incrementada, siendo del 100% en los grupos que contienen HA2, M2 y HA2+M2 (grupos HA2-CAP, M2-CAP y HA2-CAP+M2-CAP), y del 83,3% en los inmunizados con cápsidas que contienen LAH (grupo LAH-CAP).



**Figura 20.** Evolución del peso de los ratones sometidos a desafío con virus de la gripe A/PR8. Porcentaje de peso registrado para cada individuo en los 14 días siguientes a la inoculación viral.



**Figura 21. Supervivencia de los ratones sometidos a desafío con virus de la gripe.** Porcentaje de supervivencia tras la inoculación viral de ratones inmunizados con cápsidas quiméricas que incorporan diferentes antígenos del virus de la gripe.

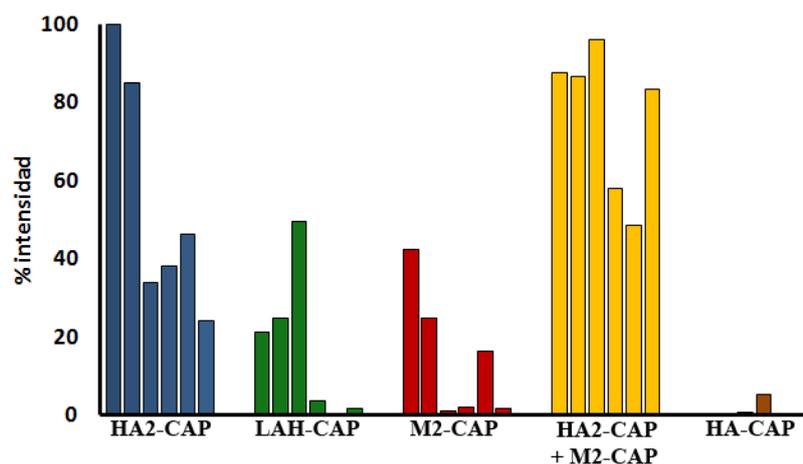
#### 4.2.6. Titulaciones de anticuerpos frente al virus de la gripe y M2

El título de anticuerpo de los sueros extraídos de los ratones fue evaluado antes del desafío viral. En primer lugar se determinó si la respuesta total de anticuerpos producidos por cada ratón, es decir, la suma de los anticuerpos dirigidos frente a la cápsida de VP2 y frente al antígeno heterólogo, era homogénea y si existían diferencias entre los grupos inmunizados. Para ello los sueros extraídos de todos los ratones inmunizados se analizaron por ELISA frente a su inmunógeno correspondiente. Los títulos de anticuerpo total obtenidos para cada inmunógeno se indican en la Tabla 11. La respuesta inmune total generada en todos los animales fue elevada, resultado que no correlaciona con los diferentes grados de protección observados.

**Tabla 11: Título total de anticuerpo detectado en los sueros de los ratones inmunizados con cápsidas quiméricas que contienen proteínas del virus de la gripe**

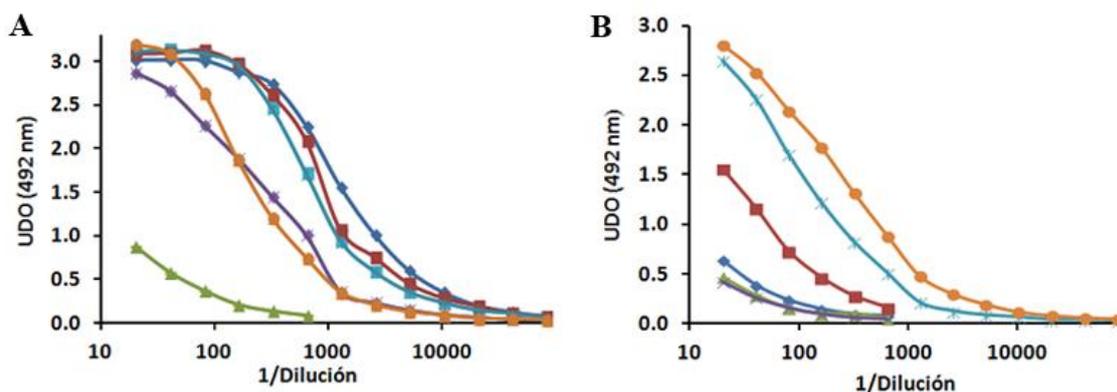
	<i>HA-CAP</i>	<i>HA2-CAP</i>	<i>LAH-CAP</i>	<i>M2-CAP</i>	<i>HA2-CAP + M2-CAP</i>	<i>GFP-CAP</i>
<i>Título</i>	$3.5 \times 10^4$	$10 \times 10^4$	$12.5 \times 10^4$	$6 \times 10^4$	$9 \times 10^4$	$7.5 \times 10^4$

A continuación se evaluó el título de anticuerpo específico frente al virus de la gripe presente en los sueros de cada grupo inmunizado. Para ello se realizó un análisis por ELISA en placas tapizadas con virus de la gripe inactivado. Las condiciones del ensayo fueron establecidas utilizando un suero proveniente de un ratón vacunado con virus de la gripe A/PR8. La sensibilidad obtenida en el ensayo fue muy baja, siendo la intensidad de la señal registrada con el suero de control positivo del orden de solo 2-3 veces la señal del fondo. Por este motivo la caracterización de los sueros se llevó a cabo mediante *dot blot* cuantitativo. Gotas de virus de la gripe (4  $\mu$ l,  $10^5$  pfu) fueron adsorbidas sobre membranas de nitrocelulosa en paralelo con gotas de BSA como control del fondo inespecífico e incubadas con cada uno de los sueros en dilución 1:300. En estas condiciones la señal de fondo de BSA es aceptable y muy inferior a la señal específica. La mayor parte de los sueros del grupo inmunizado con HA2-CAP + M2-CAP presentan un título elevado de anticuerpo capaz de reconocer al virus en estado nativo, ya que 4 de los 6 sueros muestran una señal superior al 80% de la intensidad máxima registrada en el experimento, y los dos restantes superior al 50% (Figura 22). También se obtuvieron señales superiores al 80% con 2 de los 6 sueros del grupo HA2-CAP, mientras que los 4 restantes presentan intensidades inferiores al 50%. Los sueros de los ratones inmunizados con LAH-CAP y M2-CAP mostraron en todos los casos una intensidad inferior al 50% de la intensidad máxima, reflejando una menor afinidad por la partícula viral en estas condiciones. Por último, solo 1 de los 6 sueros provenientes de las inmunizaciones con HA-CAP dio lugar a una mínima señal y en el resto fue nula.



**Figura 22. Caracterización por *dot blot* de los sueros de los ratones inmunizados con VLPs químicas que contienen antígenos del virus de la gripe.** Cuantificación de la intensidad de la señal registrada en experimentos de *dot blot* de virus de la gripe enfrentado a los diferentes sueros en dilución 1:300. La señal se expresa en porcentaje con respecto a la intensidad máxima registrada en el experimento. Cada barra representa un suero individual de cada uno de los grupos indicados: HA2-CAP, LAH-CAP, M2-CAP, HA2-CAP + M2-CAP y HA-CAP.

Dado que la proteína M2 se encuentra en un número de copias reducido en la superficie de la partícula viral (Zebedee y Lamb, 1988), la evaluación de los sueros que contienen anticuerpos  $\alpha$ -M2 frente a partículas de virus no resulta la más adecuada. Por ello, los sueros de los ratones inmunizados con cápsidas M2-CAP y HA2-CAP+M2-CAP fueron evaluados adicionalmente en ensayos de ELISA frente al péptido de 23 residuos correspondiente al fragmento de M2 insertado en estas cápsidas (Figura 23). Los sueros de los ratones inmunizados con M2-CAP muestran un título elevado frente al péptido de M2 y un resultado muy homogéneo dentro del grupo, exceptuando un suero, que muestra un título marcadamente inferior al resto (Figura 23A). El análisis de los sueros provenientes de ratones inmunizados con HA2-CAP+M2-CAP revela un comportamiento más heterogéneo y una respuesta específica frente a M2 de menor magnitud en comparación a la obtenida con las VLPs M2-CAP, aunque se detectan anticuerpos en todos los sueros (Figura 23B). Estos resultados confirman la presencia de anticuerpos frente al péptido heterólogo fusionado en el interior de las cápsidas en ambos casos.

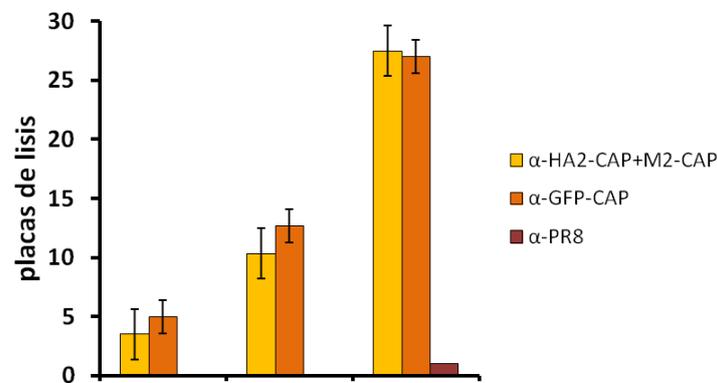


**Figura 23. Evaluación del título de anticuerpo específico frente a M2 mediante ELISA.** Curvas de titulación frente al péptido correspondiente a la región extracelular de la proteína M2 (23 residuos) de los sueros de cada uno de los ratones inmunizados con (A) M2-CAP y (B) HA2-CAP+M2-CAP.

#### 4.2.7. Evaluación de la neutralización *in vitro* frente al virus de la gripe

El análisis por *dot blot* descrito anteriormente muestra que los sueros pertenecientes al grupo de ratones inmunizado con HA2-CAP + M2-CAP presentan los títulos más elevados de anticuerpo específico contra el virus de entre todos los grupos inmunizados. Además, este grupo había mostrado una buena protección contra la infección *in vivo*. La capacidad de estos sueros de neutralizar la infección viral *in vitro* fue evaluada mediante ensayos de seroneutralización. Para ello, se incubaron durante 1 h suspensiones de 5, 15 o 30 pfu del virus de la gripe A/PR8 con los sueros que habían mostrado una mayor reactividad (mezclados en la

misma relación). Estas muestras se utilizaron como inóculo para infectar células MDCK. A 72 hpi las células fueron fijadas y teñidas para visualizar el número y tamaño de las placas de lisis producidas. La reducción en el número de placas de lisis en los experimentos realizados con virus pretratado con el suero  $\alpha$ -HA2-CAP + M2-CAP con respecto al pretratado con un suero no relacionado ( $\alpha$ -GFP-CAP) no es significativa dentro del error experimental (Figura 24) en ninguna de las dosis de virus ensayadas. Tampoco se observó una reducción en el tamaño de las placas de lisis. El suero utilizado como control positivo de neutralización (suero  $\alpha$ -PR8) mostró en todos los casos una reducción drástica de la infección. Estos resultados indican que el ensayo de neutralización *in vitro* para determinar la capacidad neutralizante de los sueros no puede sustituir a los experimentos de desafío viral *in vivo*.



**Figura 24. Ensayos de seroneutralización *in vitro* del virus de la gripe.** Promedio del conteo de las placas de lisis observadas en células MDCK infectadas con virus de la gripe pretratado con sueros  $\alpha$ -HA2-CAP + M2-CAP (amarillo), suero  $\alpha$ -GFP-CAP (naranja) y suero control positivo  $\alpha$ -PR8 (marrón). Los tres grupos de datos corresponden a dosis iniciales de virus de 5, 15 y 30 pfu.

### 4.3. Desensamblaje/reensamblaje *in vitro* de cápsidas y VLPs de IBDV

La proteína recombinante HT-VP2-466 contiene los dos elementos morfogénicos necesarios para el ensamblaje de la cápsida icosaédrica: el interruptor molecular de la hélice anfipática  $\alpha 5$  de pVP2, y el *tag* de His que emula al extremo C-terminal de VP3 y que actúa como elemento de andamiaje. Una vez que la cápsida T=13 de IBDV está ensamblada, o durante el ensamblaje, el extremo C-terminal de pVP2 (incluyendo la hélice  $\alpha 5$ ) es eliminado por la acción coordinada de diversas proteasas como VP4 (Sánchez y Rodríguez, 1999), la propia VP2 (Irigoyen *et al.*, 2009) o la proteasa celular PurSA (Irigoyen *et al.*, 2012), de tal forma que el ensamblaje de la cápsida se hace irreversible. Teniendo en cuenta estas premisas, nos planteamos como objetivo el estudio del desensamblaje y reensamblaje de cápsidas de IBDV y de HT-VP2-466 para establecer un sistema de obtención de cápsidas T=13 *in vitro*, así como

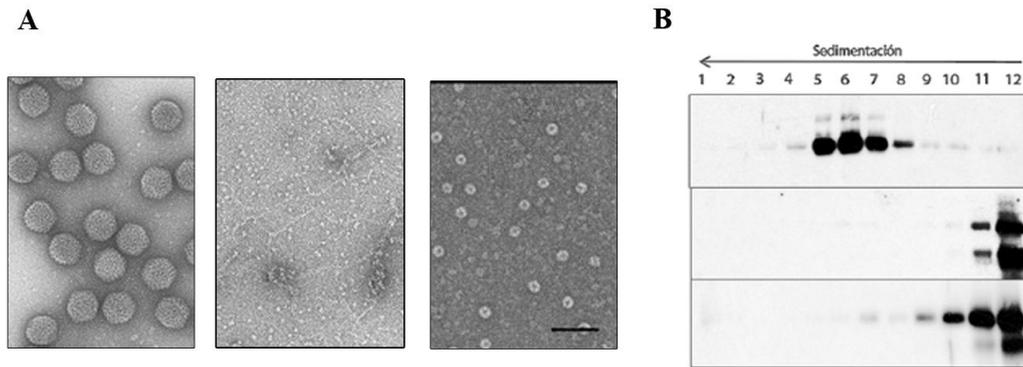
evaluar la capacidad de este sistema de incorporar de forma inespecífica ácidos nucleicos en su interior.

#### **4.3.1. Análisis del desensamblaje/reensamblaje de partículas virales de IBDV**

La purificación de las RNPs del IBDV se ha llevado a cabo mediante un sistema de desensamblaje de las cápsidas de los viriones que consiste en la diálisis frente al tampón TE (5 mM Tris-HCl pH=8, 5 mM EDTA), durante 16 h (Luque *et al.*, 2009b). Se realizó un seguimiento bioquímico y por microscopía electrónica del proceso de desensamblaje, así como evaluar los productos del reensamblaje del virus.

En estos experimentos se utilizaron muestras de IBDV obtenidas a partir de sobrenadantes de células QM7 infectadas con IBDV a moi 2-5 pfu/cel, recogidas a 72 hpi y purificadas en gradiente de CsCl, según se describe en el apartado 3.4.3. Las muestras fueron dializadas frente al tampón TE durante 16 h y los productos desensamblados fueron analizados por microscopía electrónica y tinción negativa. Tras la diálisis frente a TE se pone de manifiesto la desaparición de las cápsidas del virus y la detección de unas estructuras filamentosas que se corresponden con las RNPs, junto con un fondo punteado probablemente relacionado con los capsómeros desensamblados de la cápsida viral (Figura 25A, centro).. Posteriormente se evaluó la capacidad del virus desensamblado de reensamblarse. La muestra fue sometida a una segunda diálisis frente al tampón original PES durante 24 h, y se detectó la formación de partículas isométricas de tamaño similar a las cápsidas T=1 de IBDV (Figura 25A, derecha).

Las muestras de IBDV inicial (ensamblada como cápsidas T=13), desensamblada y reensamblada fueron analizadas mediante ultracentrifugación en gradientes lineales de sacarosa del 25-50% y las fracciones del gradiente se analizaron por SDS-PAGE y WB con un suero específico  $\alpha$ -VP2. El perfil de movilidad de VP2 varía significativamente desde la muestra inicial, donde la mayor parte de la proteína se concentra en las fracciones centrales (fracciones 5-7), a la desensamblada, donde se desplaza mayoritariamente hacia la fracción superior (Figura 25B). La muestra reensamblada presenta su máximo de señal en la zona superior del gradiente (fracciones 9-12), consistente con la presencia de agregados de pequeño tamaño como las cápsidas T=1 observadas por microscopía electrónica. Estos resultados indican que el desensamblaje de viriones de IBDV es irreversible y que, una vez procesada la proteína de la cápsida en su forma madura VP2, sólo es capaz de ensamblarse en cápsidas tipo T=1.

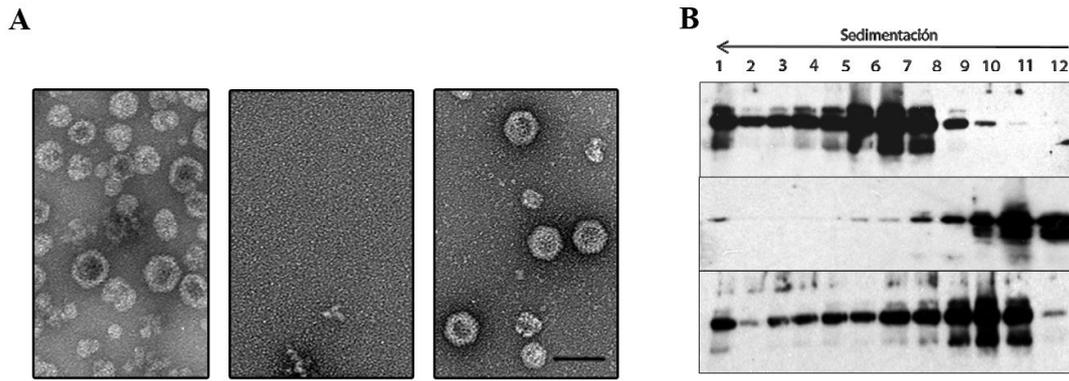


**Figura 25. Análisis del desensamblaje y reensamblaje de IBDV.** (A) Seguimiento por microscopía electrónica y tinción negativa de las estructuras observadas en una muestra de viriones de IBDV (izquierda) sometida a diálisis frente al tampón TE para su desensamblado (medio) y posteriormente dializada frente al tampón original PES (derecha). La barra de escala corresponde a 100 nm. (B) Análisis por SDS-PAGE y WB  $\alpha$ -VP2 de las fracciones de los gradientes de sacarosa de la muestra inicial de IBDV (arriba), dializada frente al tampón TE (medio) y dializada de nuevo frente al tampón PES (abajo).

#### 4.3.2. Análisis del desensamblaje/reensamblaje de VLPs HT-VP2-466

Las cápsidas HT-VP2-466 mantienen los dos elementos morfogenéticos necesarios para el ensamblaje de VLPs T=13. Por ello se procedió a evaluar su capacidad de reensamblaje utilizando los mismos procedimientos que en el caso de las cápsidas de IBDV, descritos en el apartado anterior. Cápsidas HT-VP2-466 purificadas fueron dializadas frente al tampón TE y analizadas por microscopía electrónica y tinción negativa. Las cápsidas fueron desensambladas eficientemente, como se comprobó dada la aparición únicamente de un fondo punteado que da cuenta de los capsómeros desensamblados (Figura 26A). Tras la diálisis frente al tampón PES se detectó la formación de agregados isométricos de tamaño y morfología similares a cápsidas T=13 características del virus, así como otras de menor tamaño que probablemente se correspondan con cápsidas T=7 (Saugar *et al.*, 2005a).

Las muestras inicial, desensamblada y reensamblada de HT-VP2-466 fueron analizadas mediante ultracentrifugación en gradientes lineales de sacarosa y las fracciones obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE y WB con un suero específico  $\alpha$ -VP2 (Figura 26B). Mientras que en la muestra desensamblada la mayor parte de la señal de VP2 se concentra en las fracciones superiores (fracciones 10-12), una vez dializada frente al tampón PES la señal se detecta a lo largo de todas las fracciones del gradiente, consistente con la formación de agregados (posiblemente ensamblados tubulares) de distinto tamaño y cápsidas T=13 y T=7 como las observadas por microscopía electrónica. Estos resultados demuestran que el ensamblaje de cápsidas HT-VP2-466 es reversible, y constituyen el primer sistema descrito de ensamblaje *in vitro* de las cápsidas T=13 de IBDV.

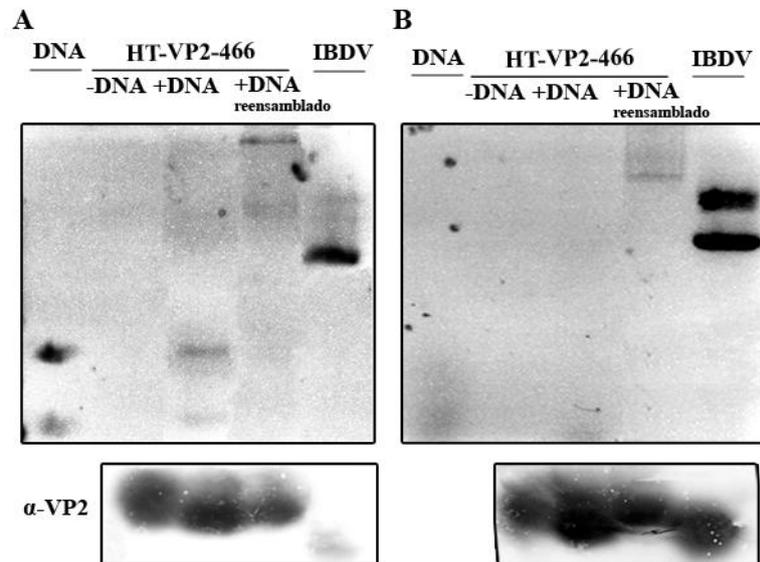


**Figura 26. Análisis del desensamblaje y reensamblaje de cápsidas HT-VP2-466.** (A) Imágenes de microscopía electrónica y tinción negativa de una muestra de cápsidas HT-VP2-466 (izquierda) dializada frente al tampón TE (medio) y posteriormente dializada frente al tampón original PES (derecha). La barra de escala corresponde a 100 nm. (B) Análisis por SDS-PAGE y WB  $\alpha$ -VP2 de las fracciones recolectadas de los gradientes de sacarosa de las muestras de HT-VP2-466 inicial (arriba), desensamblada (medio) y reensamblada (abajo).

#### 4.3.3. Incorporación de ácidos nucleicos en cápsidas HT-VP2-466

Una vez establecido un sistema reversible de desensamblaje/reensamblaje de cápsidas HT-VP2-466 se evaluó la capacidad de incorporar ácidos nucleicos en su interior de manera inespecífica durante el reensamblado de las cápsidas T=13. Para ello, las cápsidas HT-VP2-466 desensambladas por diálisis frente al tampón TE fueron mezcladas con una preparación que contiene dos fragmentos de DNA de  $\sim 1000$  y  $\sim 1800$  bp y dializadas durante 24 h frente al tampón PES. Las muestras resultantes se analizaron en geles nativos de agarosa, que fueron teñidos con BrEt para detectar el DNA y posteriormente transferidos a membranas de nitrocelulosa y sometidos a WB con un suero específico  $\alpha$ -VP2 (Figura 27A). El análisis de la muestra reensamblada en presencia de DNA muestra dos bandas de ácido nucleico migrando en la parte superior del gel, muy por encima de los dos fragmentos de DNA y por encima también de la banda correspondiente a los viriones de IBDV. El análisis por WB muestra una única banda de proteína en las muestras HT-VP2-466 reensambladas a una altura similar a la que se detecta la banda inferior de ácido nucleico. Para comprobar que el retardo observado en la movilidad de los fragmentos de DNA se debe a su encapsidación y no a una interacción en la superficie de las cápsidas, las muestras reensambladas se sometieron a tratamiento con DNasaI (Figura 27B). Mientras que los fragmentos de DNA en presencia o ausencia de la cápsida HT-VP2-466 son totalmente degradados por la enzima, la muestra reensamblada en presencia de estos fragmentos muestra una banda clara de DNA de movilidad similar a la inferior de las dos bandas observadas en la Figura 27A. La banda superior, que es degradada durante el tratamiento con DNasaI, puede corresponder a los fragmentos de DNA retardados

por la interacción superficial con las proteínas. Estos resultados indican que las cápsidas HT-VP2-466 pueden incorporar ácidos nucleicos durante el proceso de ensamblaje.



**Figura 27. Encapsidación de ácidos nucleicos durante el reensamblado de cápsidas HT-VP2-466.** (A) Análisis en geles nativos de agarosa detectados mediante irradiación UV (arriba) o WB con un suero  $\alpha$ -VP2 (abajo) de cápsidas HT-VP2-466 reensambladas, mezcladas con fragmentos de DNA o bien reensambladas en presencia de DNA. (B) Análisis en geles nativos de agarosa de las mismas muestras tratadas con DNaseI para degradar el DNA que no se encuentre protegido dentro de la cápsida.



---

## **5. Discusión**



Los estudios presentados en este trabajo abordan la utilización de VLPs de IBDV basadas en una forma quimérica de la proteína de la cápsida, HT-VP2-466, como sistemas transportadores de macromoléculas. La incorporación de proteínas o antígenos exógenos ha sido abordada mediante una estrategia de fusión génica de los segmentos peptídicos de interés en el extremo N-terminal de HT-VP2-466, localizado hacia el interior de la cápsida. La estructura tridimensional de las VLPs que incorporan la proteína de fusión EGFP-HT-VP2-466 ha sido determinada, comprobando que se ensamblan en cápsidas T=13 similares a las de IBDV y que la proteína fusionada se localiza en el interior de la cápsida. También se ha demostrado que la cápsida viral actúa como adyuvante de la proteína fusionada, maximizando la respuesta inmune inducida frente a ella. Siguiendo la misma metodología han sido obtenidas VLPs que contienen diferentes antígenos del virus de la gripe, algunas de las cuales confieren una protección total frente a la infección con virus de la gripe A/PR8. Por otro lado, el establecimiento de un sistema de desensamblaje y posterior reensamblaje *in vitro* de las cápsidas HT-VP2-466 nos ha permitido comprobar su capacidad para encapsular segmentos de DNA de manera inespecífica.

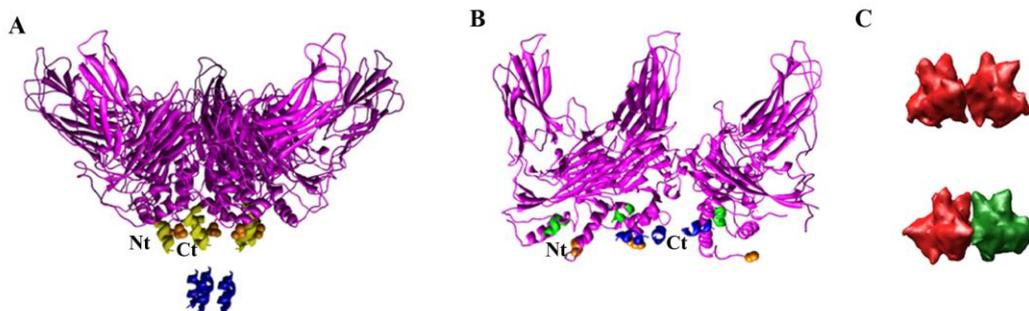
### **5.1. Ensamblaje de cápsidas quiméricas de HT-VP2-466 a partir de proteínas de fusión**

La capacidad de incorporar antígenos fusionados en algún punto de la secuencia de la proteína estructural de la cápsida de IBDV sin alterar su ensamblaje ha sido evaluada utilizando EGFP como proteína heteróloga modelo. Esta proteína es un candidato idóneo, ya que permite comprobar el correcto plegamiento de la proteína fusionada, en este caso mediante la observación de la emisión de fluorescencia verde que la caracteriza, siempre y cuando la proteína se encuentre en su conformación nativa. Además, este sistema constituye un salto cualitativo importante ya que ha permitido evaluar la inserción de una proteína relativamente grande (~28 kDa) en una cápsida basada en VP2. EGFP ha sido utilizada previamente como modelo para evaluar la capacidad de incorporación de antígenos en otras VLPs, ya sea expuesta en la superficie como en VLPs del virus de la hepatitis B (Kratz *et al.*, 1999), o contenida en su interior como en VLPs de rotavirus (Charpilienne *et al.*, 2001).

La generación de las dos construcciones de fusión que incorporan EGFP en los extremos N y C-terminal de HT-VP2-466 nos ha permitido establecer que sólo cuando la proteína heteróloga es incorporada en su extremo N-terminal se obtiene una correcta expresión. La causa por la que el extremo C-terminal de HT-VP2-466 no es idóneo para la inserción de otras proteínas se desconoce. Además, EGFP fusionada en el extremo N-terminal de HT-VP2-466 adquiere su conformación nativa. El estudio del ensamblaje de la proteína quimérica EGFP-HT-VP2-466 mostró que, cuando es expresada de forma independiente, su ensamblaje en agregados estructurados es ineficiente, posiblemente debido a impedimentos estéricos derivados de la presencia próxima de muchas copias de EGFP. Esta eficiencia es incrementada cuando la

proteína quimérica se coexpresa con la proteína original HT-VP2-466, dando lugar al mismo tipo de ensamblados macromoleculares similares a las cápsidas de IBDV observados cuando se expresa HT-VP2-466. La modificación de la relación de coinfección entre los baculovirus recombinantes que expresan ambas proteínas permite incrementar el número de copias incorporadas de la proteína de fusión. Sin embargo, el límite máximo, ~240 copias/cápsida (31% de las 780 copias de HT-VP2-466), se alcanza cuando la relación es de 5:1 (EGFP-HT-VP2-466:HT-VP2-466). Al incrementar la proporción de EGFP-HT-VP2-466, se ve favorecida la formación de estructuras tubulares que incorporan un porcentaje ligeramente superior de la proteína de fusión (~35%)

La cápsida T=13 de IBDV está constituida por 260 trímeros de VP2 que forman 12 pentámeros y 120 hexámeros (Böttcher et al., 1997; Castón et al., 2001; Coulibaly et al., 2005), Mientras que los trímeros de VP2 pentaméricos tienen contactos inclinados entre ellos (ángulo dihedro ~144°), los trímeros hexaméricos forman contactos planos (ángulo dihedro ~180°), con el dominio P orientado de forma ortogonal a la superficie externa de la cápsida (Figura 28). A pesar de estas diferencias en los contactos entre los trímeros pentaméricos y hexaméricos (Luque *et al.*, 2007), los extremos N-terminales de las moléculas de VP2 se encuentran próximos en los centros de las caras internas de los pentámeros y hexámeros, por lo que la fusión de las moléculas de EGFP en el 100% de las moléculas de HT-VP2-466 puede resultar en impedimentos estéricos que impiden el ensamblaje de los pentámeros y hexámeros. Cuando se



**Figura 28. Curvatura de los pentámeros y hexámeros en la cápsida viral.** (A) Estructura atómica de un vértice pentamérico de la cápsida de IBDV. En morado se muestran los trímeros de VP2, en amarillo se destacan las hélices N-terminales, en naranja el último residuo C-terminal resuelto en la estructura cristalográfica y en azul la posición de las hélices  $\alpha 5$  anfipáticas de acuerdo con la estructura obtenida por microscopía electrónica (Luque *et al.*, 2007). (B) Sección de un hexámero de la cápsida de IBDV donde se observa la distribución planar de los trímeros que lo componen. El código de color es el mismo que en (A), salvo que las hélices N-terminales están marcadas en verde. (C) Representación de superficie de los contactos entre dos trímeros pentaméricos adyacentes (rojo) y un trímero pentamérico con uno hexamérico (rojo, verde).

reduce el porcentaje de incorporación de EGFP a ~30% de las moléculas de HT-VP2-466, la limitación estérica es mucho menor y el ensamblaje de cápsidas T=13 y estructuras tubulares es eficiente.

Los análisis de las proteínas de fusión de HT-VP2-466 con diferentes antígenos del virus de la gripe A/PR8 pone de manifiesto que la eficiencia de incorporación de la proteína o péptido heterólogo en ensamblados estructurados tiene que ser determinada empíricamente en cada caso. Insertos de tamaño pequeño como el segmento extracelular de la proteína M2 (23 residuos, ~2.7 kDa) o la hélice LAH de HA (54 residuos, ~6.7 kDa), permiten el ensamblaje de VLPs y estructuras tubulares quiméricas formadas al 100% por la proteína de fusión M2-HT-VP2-466 o LAH-HT-VP2-466. Las proteínas de fusión que incorporan el dominio HA2 (174 residuos, ~20 kDa) o la proteína completa HA (502 residuos, ~57 kDa) requieren sin embargo de la coinfección con HT-VP2-466 para dar lugar a la formación de ensamblados de manera eficiente. El porcentaje de incorporación de estas proteínas de fusión es diferente entre sí y en comparación con el de EGFP. Mientras que el máximo número de copias de EGFP por cápsida es ~31%, los ensamblados que contienen el dominio HA2 admiten hasta un 45% de copias de la proteína heteróloga; esta eficiencia de incorporación se reduce hasta un 10% con HA. El número máximo de copias incorporadas de la proteína de fusión parece por tanto estar relacionada con el tamaño del inserto heterólogo; sin embargo, esta relación no es directa y no permite hacer predicciones en cuanto a la eficiencia de incorporación de un antígeno dado.

Estos resultados indican que la incorporación de fragmentos peptídicos mediante fusión génica en el extremo N-terminal de HT-VP2-466 constituye un sistema versátil con capacidad de incorporar antígenos de gran tamaño, ya que los posibles impedimentos estéricos de las moléculas fusionadas en el interior de la cápsida pueden ser contrarrestados mediante la incorporación de un menor número de copias de la proteína heteróloga. Además, estas cápsidas pueden incorporar dos antígenos diferentes fusionados en su interior, como se ha descrito en este trabajo mediante la incorporación simultánea de HA2 y M2. Este potencial podría ser utilizado para obtener cápsidas que contengan antígenos de diferentes virus: por ejemplo, estas cápsidas podrían constituir la base para formular una vacuna (al menos) triple frente a enfermedades aviares.

El dominio P de VP2 presenta 4 *loops* expuestos en la superficie de la cápsida, nombrados en función de las cadenas  $\beta$  que conectan, que son los *loops* PBC, PDE, PFG y PHI (Coulibaly et al., 2005; Garriga et al., 2006; Lee et al., 2006). Estudios previos sugieren que los *loops* PBC y PHI son óptimos para la inserción de epítopos foráneos debido a que son dos regiones fuertemente inmunogénicas (Letzel *et al.*, 2007). En nuestros estudios se han insertado dos

epítomos del virus de la gripe A, el fragmento extracelular de M2 y el dominio HA2 en el *loop* PHI, el más largo del dominio P y que se orienta hacia el exterior del trímero, sin intervenir en interacciones intratriméricas y potencialmente minimizando los impedimentos estéricos derivados de la presencia de los antígenos fusionados. Estudios recientes han mostrado que las inserciones realizadas en el lazo PHI con M2, epítomos del virus de la hepatitis B y dos epítomos de diferente longitud del virus de la fiebre aftosa también impiden el ensamblaje de VLPs (Tang *et al.*, 2012; Upadhyay *et al.*, 2011; Remond *et al.*, 2009). Sin embargo, en este último trabajo se describió que la inserción de un epítomo de 12 residuos derivado del virus de la fiebre aftosa en la región PBC, permite el ensamblaje de partículas subvirales T=1 de IBDV (Remond *et al.*, 2009). Nuestros resultados confirman que la región PHI no es adecuada para la inserción de epítomos. Sería interesante analizar la inserción en el *loop* PBC de los antígenos estudiados en el presente trabajo; si fuesen permisivos para el ensamblaje, se podría estudiar la inmunogenicidad de la proteína heteróloga en función de su localización en el vehículo presentador, bien en el interior o en la superficie de la cápsida. Estos análisis incrementarían la versatilidad del sistema, explorando la posibilidad de incorporar diferentes antígenos fusionados en distintas posiciones de una única proteína. Además, de estos resultados puede extraerse la conclusión de que, a pesar de conocer la estructura atómica de la proteína en cuestión, no es posible predecir la idoneidad de los *loops* expuestos para la inserción de epítomos teniendo en cuenta sólo una aproximación estructural.

## **5.2. Respuesta humoral inducida frente a los antígenos fusionados con HT-VP2-466**

Las VLPs de IBDV son potentes inmunógenos (Martinez-Torrecuadrada *et al.*, 2003). Además, numerosos trabajos muestran que la inserción de fragmentos de VP2 o de VP2 completa en VLPs de otros virus aviares como vehículos presentadores permite inducir una respuesta inmune doble frente a ambos patógenos (Tsukamoto *et al.*, 1999; Tsukamoto *et al.*, 2002; Francois *et al.*, 2004; Bublot *et al.*, 2007; Butter *et al.*, 2003). Sin embargo, son escasos los estudios en los que las VLPs de IBDV se han utilizado como presentadores de otros antígenos. Como se ha mencionado anteriormente, se han incorporado epítomos de pequeño tamaño eficientemente en la superficie de VLPs de IBDV (Remond *et al.*, 2009), pero hasta la fecha no se han descrito estudios sobre la incorporación de proteínas heterólogas en el interior de estas cápsidas.

El potenciamiento de la respuesta inmune inducida frente a diferentes epítomos cuando éstos son presentados utilizando VLPs como vehículos transportadores ha sido ampliamente demostrado, y ha motivado el desarrollo de sistemas basados en VLPs quiméricas como candidatos vacunales (Chackerian, 2007). Aunque la utilización de estos sistemas da lugar a una respuesta inmune doble, en ocasiones la respuesta inducida frente a la cápsida portadora no es de interés y

únicamente se busca potenciar la inmunogenicidad del antígeno insertado. Por ejemplo, VLPs de diferente origen han sido utilizadas para presentar antígenos de diversos patógenos humanos, tales como el virus del Dengue (Arora et al., 2012) y el virus de la inmunodeficiencia humana (Pastori et al., 2012), así como patógenos animales como el virus de la fiebre aftosa (Crsici et al., 2012; Clarke et al., 1987) y el virus de la coriomeningitis linfocítica (Ruedl et al., 2005). Sin embargo, en el ámbito veterinario, donde la reducción de los costes de vacunación es un requisito indispensable para la implantación de un sistema vacunal, se están desarrollando aproximaciones en las cuales la inmunización con VLPs quiméricas de lugar a una respuesta protectora frente a los dos patógenos (la VLP presentadora y el antígeno foráneo) simultáneamente. Este es el caso, por ejemplo, de la utilización de VLPs quiméricas del virus de la enfermedad de Newcastle que exponen epítomos del virus de Nipah, el virus de la gripe o el virus sincitial respiratorio (Morrison, 2010; Murawski et al., 2010).

Como se ha expuesto en el apartado anterior, el sistema basado en ensamblados estructurados quiméricos de HT-VP2-466, que ha demostrado admitir una amplia variedad de insertos sin alterar su ensamblaje, e incluso permite la inserción conjunta de dos antígenos diferentes, es un candidato óptimo para el desarrollo de vacunas aviares al menos frente a tres patógenos de manera simultánea. A pesar de que el papel adyuvante ejercido por la cápsida ha sido demostrado en numerosas ocasiones (Chakerian 2007), la utilización de un sistema presentador novedoso hizo necesaria la caracterización de la respuesta inmune inducida frente a la cápsida y los antígenos insertados. En el presente trabajo se ha demostrado que las cápsidas EGFP-HT-VP2-466 son capaces de inducir anticuerpos específicos frente a EGFP en ausencia de cualquier otro adyuvante vacunal, mientras que la inmunización con EGFP soluble, en presencia o ausencia de la cápsida HT-VP2-466, no dio lugar a un título de anticuerpo detectable. Además, se comprobó que la inmunización con estructuras que contienen conjuntamente HA2 y M2 fusionadas a los ensamblados de HT-VP2-466 provoca una respuesta de anticuerpos frente a ambos antígenos. En todos los casos el título de anticuerpos dirigidos frente a la cápsida de HT-VP2-466 es muy superior al del/los antígeno/s fusionado/s, sin embargo los resultados obtenidos demuestran que la fuerte respuesta dirigida frente a la cápsida no enmascara la respuesta frente al antígeno heterólogo, y que ésta es del orden de la obtenida utilizando un potente adyuvante vacunal como es el adyuvante de Freund. Estos resultados constituyen la base para el planteamiento de la utilización de estas estructuras quiméricas como candidatos vacunales.

### **5.3. VLPs de IBDV que incorporan proteínas del virus de la gripe A/PR8 como potenciales candidatos vacunales**

Dado que IBDV es un virus que infecta aves, consideramos relevante la incorporación de antígenos de otro patógeno aviar para evaluar el potencial de este sistema como vacuna. Se

valoraron para la generación de cápsidas quiméricas diferentes patógenos aviáres con un impacto importante en la industria avícola, ya que el desarrollo de una vacuna doble en este contexto supondría numerosas ventajas, entre ellas una disminución de los costes de vacunación de los animales. El virus de la gripe A fue seleccionado para los siguientes ensayos. El virus de la gripe es especialmente relevante no solo por su impacto económico a nivel de producciones avícolas, sino también por ser un patógeno zoonótico que por tanto conlleva un riesgo para la salud humana (Shortridge, 1992). La utilización del virus de la gripe tiene ventajas importantes; están disponibles numerosas cepas y herramientas de investigación desarrolladas para este virus, incluidas cepas adaptadas a ratón (Bouvier y Lowen, 2010), que permiten llevar a cabo estudios de infección y protección *in vivo* utilizando un modelo animal de manejo más sencillo y económico que los modelos aviáres. Por estos motivos, se utilizó como modelo la cepa A/PR/8/34 adaptada a ratón, ampliamente utilizada para evaluar la capacidad protectora en ensayos de desafío viral (Schneemann *et al.*, 2012). Dado que el virus de la gripe es un patógeno que provoca numerosas muertes humanas y gastos sanitarios anualmente, se han realizado muchos esfuerzos en los últimos años para desarrollar una vacuna universal capaz de neutralizar una amplia variedad de cepas, evitando los problemas derivados de la vacunación estacional (Kang *et al.*, 2011).

El virus de la gripe presenta dos proteínas mayoritarias en su superficie, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), (Matrosovich *et al.*, 2004; Palese y Compans, 1976). En las infecciones por virus de la gripe, la mayor parte de la respuesta neutralizante de anticuerpos se produce frente a HA, razón de peso para abordar su inserción en VLPs quiméricas. El dominio HA1 de HA conforma principalmente la cabeza globular de la proteína, e incluye la zona implicada en la unión al receptor celular, no accesible a los anticuerpos y cuyos residuos se encuentran conservados. Sin embargo, los residuos que rodean esta región están muy expuestos y constituyen las zonas inmunodominantes en la respuesta humoral del huésped (Ortín XX); la mayor parte de las mutaciones se concentran en estas zonas (Laver *et al.*, 1979) dando lugar a variaciones antigénicas responsables de que los anticuerpos producidos frente a una cepa no sean neutralizantes frente a otras cepas relacionadas. El dominio HA2, que constituye la mayor parte del tallo, presenta una conservación de secuencia entre cepas mucho mayor que la del dominio HA1 (Krystal *et al.*, 1982), en torno al 85% entre diferentes subtipos y 95% entre diferentes cepas de un mismo subtipo (Fouchier *et al.*, 2005). Estudios recientes demuestran que algunos anticuerpos monoclonales producidos específicamente frente al dominio HA2 tienen capacidad neutralizante frente a la infección con diferentes subtipos de virus de la gripe en ensayos de desafío viral de ratones (Wrarmert *et al.*, 2011; Corti *et al.*, 2011; Ekiert *et al.*, 2011; Kashyap *et al.*, 2008; Sagawa *et al.*, 1996). Además, dentro del dominio HA2 se ha descrito que la hélice denominada LAH se encuentra especialmente conservada a nivel de

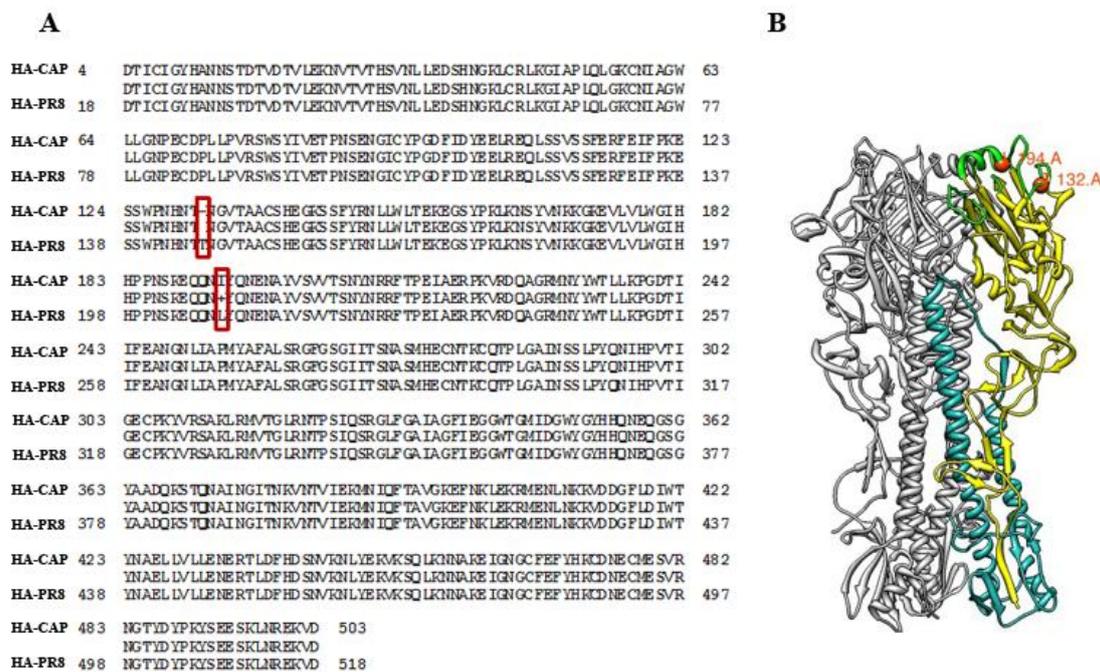
secuencia (Wang *et al.*, 2010). Los anticuerpos generados frente a péptidos sintéticos de LAH confieren protección frente a diferentes cepas de virus de la gripe con distintos subtipos de HA. Con estos antecedentes, decidimos incorporar en VLPs quiméricas tanto el dominio HA2 completo como el segmento LAH, con el objetivo de potenciar la inmunogenicidad de estas dos regiones al eliminar el dominio inmunodominante HA1, y obtener una protección contra la infección frente a diferentes cepas del virus de la gripe.

La proteína M2 es una proteína de membrana que se expresa a altos niveles en la superficie de las células infectadas por el virus de la gripe (Lamb *et al.*, 1985); también se encuentra en la membrana de la propia partícula viral, aunque en pequeñas cantidades (14-68 moléculas/virión; Zebedee y Lamb, 1988). En su forma fisiológica es un tetrámero, que constituye un canal iónico selectivo de protones (Schnell y Chou, 2008; Stouffer *et al.*, 2008). El segmento N-terminal de la proteína M2, expuesto en la superficie del virus, consta de 23 residuos altamente conservados entre todas las cepas de gripe conocidas (Ito *et al.*, 1991). Por ello constituye un excelente candidato para producir una vacuna universal contra el virus de la gripe (Neiryneck *et al.*, 1999). Desde los primeros estudios que demuestran una protección cruzada obtenida mediante la inmunización con M2 (Slepushkin *et al.*, 1995), se han estudiado numerosas variaciones de esta proteína para el desarrollo de vacunas multivalentes. Una desventaja del uso del dominio extracelular de M2 como inmunógeno es su pequeño tamaño y baja inmunogenicidad. Por ello, se han analizado una gran variedad de moléculas transportadoras que potencien su inmunogenicidad, entre ellas algunas VLPs (De Filette *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2004; Neiryneck *et al.*, 1999), observando en todos los casos protección en ensayos de desafío a dosis letal frente a virus H1N1, H3N2 y H5N1. Estas características motivaron la selección del dominio extracelular de M2 para su inserción en VLPs de IBDV.

En el presente trabajo, cinco tipos de cápsidas quiméricas (HA-CAP, HA2-CAP, LAH-CAP, M2-CAP y HA2-CAP+M2-CAP) fueron obtenidas a partir de proteínas de fusión con HT-VP2-466 y los antígenos mencionados y utilizadas para la inmunización y posterior desafío de ratones con virus de la gripe A/PR8. Las construcciones que mostraron una mayor protección frente a la enfermedad y la infección, reflejadas por una reducida pérdida de peso a lo largo de todo el experimento, fueron M2-CAP y HA2-CAP+M2-CAP. Cuando las cápsidas incorporan solo el dominio HA2 (HA2-CAP), la pérdida de peso es mayor en el 50% de los individuos inmunizados, aunque también se logra una supervivencia del 100% de los animales. En el caso de M2-CAP solo un 16% de los ratones experimenta una pérdida de peso notable. Al combinar ambos antígenos en una misma cápsida, sus efectos protectores parecen complementarse y se incrementa ligeramente el grado de protección obtenido. La comparación entre los resultados de las inmunizaciones con HA2-CAP, M2-CAP y la combinación de ambos indica que el principal

componente protector en las cápsidas mixtas posiblemente sea el fragmento de M2, ya que por sí solo desencadena una respuesta protectora más eficiente que el dominio HA2. La inmunización con LAH-CAP mostró una protección inferior a la conseguida mediante la inserción del dominio HA2 completo. Esta observación no contradice los resultados previos (Wang *et al.*, 2010), pero pone de manifiesto que la ventaja de la inmunización con LAH podría radicar en la protección parcial frente a un rango más amplio de subtipos de virus de la gripe más que en una protección más eficaz contra la infección. Otra posibilidad que no debe ser descartada es que el fragmento LAH no pueda adquirir su conformación nativa al encontrarse fusionada a la cápsida, lo cual podría distorsionar los epítomos conformacionales, reduciendo su efectividad para neutralizar la infección. El caso más llamativo es la ausencia de protección detectable en estos experimentos cuando los ratones son inmunizados con cápsidas que contienen HA, que resulta en una mortalidad igual a la de los grupos control. Existen varias hipótesis que pueden explicar este hecho. En primer lugar, no se ha comprobado que la proteína haya adquirido su conformación nativa. De hecho, trabajos previos indican que para la correcta formación de trímeros de HA en el sistema de rBVs es necesaria la presencia de un elemento adicional denominado foldón, que contribuye al plegamiento (Skehel, 2004), ausente en la construcción utilizada en este trabajo. En segundo lugar, el porcentaje de proteína de fusión incorporado en las cápsidas es el más bajo entre los grupos utilizados, ~10%, aunque se trata del antígeno de mayor tamaño. Otra posibilidad estudiada es una posible diferencia antigénica entre el virus utilizado como modelo para generar las construcciones de fusión y el utilizado en el desafío. Ambos pertenecen a la cepa A/PR8, pero al provenir de diferentes aislados se analizó su identidad de secuencia para detectar posibles desviaciones genéticas. De esta manera se comprobó que ambas secuencias difieren únicamente en dos posiciones, localizadas en el dominio HA1 (Figura 29). Estas dos posiciones se encuentran muy cercanas al sitio de unión al receptor y, por tanto, en la zona inmunodominante de la proteína. Se ha demostrado que cambios puntuales en esta región pueden ser suficientes para impedir el efecto neutralizante de los anticuerpos producidos (Strengell *et al.*, 2011).

Con objeto de caracterizar en mayor detalle la respuesta inmune inducida por las diferentes VLPs quiméricas, los sueros de los ratones inmunizados se analizaron frente al mismo virus utilizado en los desafíos por ELISA y *dot blot* cuantitativo. El motivo de la utilización de virus completo en lugar de antígenos producidos de manera recombinante fue la posibilidad de estudiar la capacidad de los anticuerpos de unirse al antígeno correspondiente en el contexto de la partícula viral, con sus consiguientes requisitos de exposición y accesibilidad. No obstante, este tipo de análisis limita la detección de anticuerpos dirigidos frente a M2, al encontrarse en bajo número de copias en la partícula viral (Zebedee y Lamb, 1988). Los títulos totales de anticuerpo, evaluados por ELISA frente a cada inmunógeno completo (incluyendo la cápsida de



**Figura 29. Comparación entre las cepas de virus de la gripe A/PR8 utilizadas para la generación de las construcciones de fusión y el desafío viral.** (A) Alineamiento de la secuencia de la proteína HA completa fusionada a CAP (arriba) frente a la secuencia de HA del virus utilizado para el desafío. Se destacan con un recuadro las mutaciones detectadas. (B) Estructura atómica de un trómero de HA (PDB RVU1) donde se desataca el dominio HA1 de un monómero en amarillo y el dominio HA2 en azul. Los segmentos involucrados en la unión con el receptor se destacan en verde, que comprenden fundamentalmente la hélice 190 y algunos residuos en los *loops* que la rodean. Se muestran con esferas rojas las dos posiciones diferentes entre las dos HAs utilizadas.

título de anticuerpo específico frente al virus presente en los sueros, ya que el suero utilizado como control positivo no dio lugar a una señal claramente distinguible del fondo de BSA. Por tanto, este método fue sustituido por el *dot blot* cuantitativo, donde el virus se encuentra también en condiciones seminativas, pero su unión a la membrana es más eficiente. Como era esperable en base a los resultados obtenidos en los desafíos, los grupos que reflejaron mayores intensidades en este análisis fueron, respectivamente, HA2-CAP+M2-CAP y HA2-CAP (Figura 21). La baja señal registrada para los anticuerpos producidos por LAH-CAP puede deberse a un bajo título de anticuerpo específico o bien a una reducida accesibilidad de esta región dentro del trómero de HA, y concuerda con el nivel moderado de protección frente al desafío observado en estos experimentos. La señal registrada para los sueros de los ratones inmunizados con M2-CAP fue también de baja intensidad, posiblemente debido a la limitada presencia de M2 en la superficie viral. Por último, la señal detectada en los sueros de HA-CAP fue prácticamente nula, de nuevo en concordancia con la ausencia total de protección frente al desafío viral. Es remarcable el hecho de que la señal media registrada por los sueros HA2-CAP+M2-CAP es

superior a la obtenida cuando se inmuniza con HA2-CAP y muy superior a la obtenida con M2-CAP. Es posible que la combinación de ambos tipos de antígenos estimule una respuesta inmune más potente en la que estén implicados diversos componentes humorales y celulares, y que resulte en un grado de protección contra la infección elevado, como demuestra el ensayo de desafío viral, y que además resulte en una producción de anticuerpos más eficiente. Estos ensayos se complementaron con ensayos de ELISA frente a un péptido con la secuencia del fragmento utilizado de M2 para evaluar de manera independiente el título de anticuerpo producido frente a M2 en las inmunizaciones con M2-CAP y HA2-CAP+M2-CAP, que mostraron que el título de anticuerpo específico frente a M2 es mayor en ausencia de HA2-CAP, posiblemente debido al menor número de copias de M2-CAP incorporado en las cápsidas mixtas, aunque demuestran que en ambos casos se ha inducido una respuesta notable frente a este antígeno.

La obtención de una señal significativa de los sueros de HA2-CAP+M2-CAP en ensayos de *dot blot* frente al virus de la gripe en condiciones seminativas motivaron la evaluación de su capacidad neutralizante mediante ensayos de neutralización *in vitro*. Sin embargo, no se observó una reducción en el número de PFU tras el tratamiento de diferentes cantidades de virus de la gripe con estos sueros con respecto a las detectadas con el virus sin tratar. La ausencia de neutralización puede indicar que el título de anticuerpo específico es insuficiente para bloquear la entrada del virus, y que posiblemente el mecanismo de neutralización de la infección viral observado *in vivo* requiera de otros componentes del sistema inmunitario para la eliminación eficiente del patógeno.

Para completar estas observaciones y establecer de manera precisa los componentes implicados en el elevado grado de protección frente a la infección demostrado en los experimentos de desafío viral, sería necesario llevar a cabo un estudio de la respuesta inmune celular mediante un análisis específico de las poblaciones de linfocitos estimuladas en los ratones inmunizados. Además, para la caracterización completa de los anticuerpos específicos inducidos frente a los epítomos insertados podrían realizarse ensayos de ELISA sobre placas tapizadas con HA expresada y purificada de forma recombinante, así como estudios de isotipo de las inmunoglobulinas presentes en los sueros, que permitirían inferir el mecanismo implicado en la protección frente al patógeno. Adicionalmente, se están llevando a cabo nuevos ensayos de desafío de ratones inmunizados con HA-CAP + M2-CAP utilizando la cepa de referencia A/California/09 (H1N1), para evaluar el potencial vacunal de las cápsidas HA2-CAP+M2-CAP frente a una cepa pandémica. Estos ensayos podrían ser complementados con experimentos de desafío heterólogo con otras cepas (H3N2 o H5N1) para evaluar la potencial protección cruzada inducida por estos dos antígenos relativamente conservados entre diferentes cepas.

Algunos estudios ya han abordado el diseño de una vacuna doble que neutralice la infección por virus de la gripe y han sido comprobados en modelos aviares. Partículas del virus de la enfermedad de Newcastle modificadas genéticamente para expresar en su superficie moléculas de HA de los subtipos H5 o H7 altamente patogénicos han demostrado ser efectivas en la protección contra ambas enfermedades en pollos (Veits *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2007; Nayak *et al.*, 2009). Una aproximación similar ha sido realizada con el herpesvirus del pavo (HVT), causante de la enfermedad de Marek. Pollos inmunizados con partículas de este virus modificadas genéticamente para expresar HA del subtipo H7 se ven protegidos frente al desafío a dosis letal de cualquiera de los dos patógenos (Iqbal, 2012). La utilización de VLPs de IBDV en sustitución de los virus atenuados utilizados en estos trabajos supondría una ventaja en cuanto a las medidas de bioseguridad necesarias para la producción de las partículas. Además, la utilización como antígenos de HA2 y M2 en lugar de HA completa potencialmente proporcionaría un espectro mayor de protección, previniendo futuros cambios antigénicos en nuevas cepas emergentes del virus de la gripe.

#### **5.4. Ensamblaje *in vitro* de cápsidas HT-VP2-466**

El desensamblaje de la cápsida de IBDV se consigue mediante diálisis frente a un tampón de baja fuerza iónica, pH básico y en presencia del agente quelante de iones divalentes EDTA. La contribución de todos estos factores es suficiente para desestabilizar al menos las interacciones inter-triméricas, provocando la desaparición de agregados relacionados con la cápsida detectables por microscopía electrónica. Estas interacciones podrían ser restauradas mediante la vuelta al tampón original, sin embargo el procesamiento de la hélice  $\alpha 5$  del extremo C-terminal de la VP2 presente en los viriones (441 residuos) impide que ésta se ensamble de nuevo en cápsidas T=13. Las cápsidas y ensamblados formados por HT-VP2-466 sí que mantienen la capacidad de establecer todas las interacciones involucradas en la formación y estabilización de la cápsida T=13, y la diálisis frente al tampón original, tras el desensamblaje en el tampón mencionado, da lugar a la formación de estas cápsidas, así como otras de menor tamaño. Estos análisis constituyen la primera demostración de la reversibilidad del ensamblaje de las cápsidas T=13 similares a las de IBDV.

El establecimiento de un sistema de desensamblaje y reensamblaje *in vitro* de las cápsidas HT-VP2-466 permite abordar la incorporación inespecífica de macromoléculas en su interior durante el proceso de reensamblado. Este sistema puede ser aprovechado para la encapsidación de ácidos nucleicos, descrita en este trabajo, o bien de proteínas u otras moléculas orgánicas. Muchas proteínas estructurales que conforman cápsidas virales interactúan con ácidos nucleicos y son capaces de encapsidar RNAs mensajeros, ribosomales o de transferencia

presentes en la célula huésped (Routh *et al.*, 2012; Branco *et al.*, 2010; Lokesh *et al.*, 2002). En el caso de las VLPs de IBDV, la interacción con el RNA está mediada por la proteína VP3 y no por la proteína VP2, que constituye la cápsida. De hecho, las VLPs purificadas a partir de la expresión de la poliproteína de IBDV en células de mamífero, y que contienen por tanto VP2, VP3 y VP4, incorporan en su interior RNAs celulares, mientras que la reconstrucción tridimensional de VLPs purificadas a partir de la expresión recombinante de HT-VP2-466 en células de insecto no presenta densidad apreciable en su interior, indicativo de la ausencia de cualquier tipo de ácido nucleico (Castón *et al.*, 2008; Saugar *et al.*, 2005a). La ausencia de material genético preexistente en las purificaciones de HT-VP2-466 también se ha comprobado en el presente trabajo mediante el análisis de las muestras en geles nativos de agarosa teñidos con BrEt. Este hecho puede suponer una desventaja en términos de la eficiencia de empaquetamiento de ácidos nucleicos exógenos, que podría verse incrementada si existiera una interacción directa con la cápsida. Sin embargo, también constituye una ventaja importante, ya que, al tratarse de cápsidas vacías, no es necesario eliminar previamente el material genético inicial para introducir el fragmento o gen deseados, y permite un mayor control sobre las secuencias incorporadas.

El mantenimiento de la integridad estructural de las VLPs permite su interacción con los receptores e internalización en las células huésped, constituyendo sistemas óptimos para el transporte dirigido de macromoléculas a un tipo celular determinado (Kaczmarczyk *et al.*, 2011). Esta característica puede ser aprovechada para la utilización de estas estructuras como vehículos transductores, en sustitución de otras técnicas más limitadas como la microinyección o la electroporación, muy efectivas en células en cultivo pero no apropiadas para su uso en animales o pacientes (Capecchi, 1980; Campbell *et al.*, 1995). Las cápsidas recombinantes T=1 de IBDV interactúan con receptores integrina  $\alpha 4\beta 1$  y son eficientemente internalizadas en las células que los presentan, que, en mamíferos, son principalmente distintas poblaciones de linfocitos (Delgui *et al.*, 2009). Las VLPs constituidas por HT-VP2-466 podrían ser utilizadas para el desarrollo de nuevas terapias génicas basadas en el transporte específico de un gen de interés a estas líneas celulares. Sin embargo, la caracterización presentada en este trabajo es preliminar, se ha demostrado la capacidad de estas cápsidas de incorporar fragmentos de DNA, aunque se hace patente la necesidad de caracterizar de manera precisa los límites de tamaño y cantidad de los ácidos nucleicos incorporados, así como comprobar la eficiencia del transporte del contenido de las VLPs al interior celular. Este último aspecto podría abordarse mediante la introducción de un gen reportador, tal como el de una proteína fluorescente, que permita detectar y cuantificar su expresión. Además, podría plantearse la incorporación *in vitro* del genoma viral en forma de RNPs purificadas o formadas *in vitro* a partir de la combinación del

dsRNA viral con VP3, que constituiría la primera aproximación a la generación de viriones sintéticos de IBDV.



---

## **6. Conclusiones**



- 1) La proteína quimérica EGFP-HT-VP2-466 expresada en células de insecto con un sistema basado en baculovirus recombinantes da lugar a ensamblados y VLPs similares a la cápsida de IBDV. Estas VLPs quiméricas incorporan en el interior de cada partícula hasta un número máximo de ~240 copias de EGFP con su estructura nativa.
- 2) La inmunización con VLPs quiméricas de EGFP-HT-VP2-466 da lugar a una respuesta humoral frente a ambos antígenos, EGFP y VP2, y está potenciada con respecto a la inmunización con la proteína soluble EGFP.
- 3) El extremo N-terminal de HT-VP2-466 constituye una plataforma versátil para fusionar proteínas y péptidos heterólogos sin alterar la formación de ensamblados macromoleculares, y admite la inserción desde los fragmentos peptídicos de M2 y LAH del virus de la gripe (23 y 54 residuos, respectivamente), hasta antígenos de gran tamaño como la proteína HA (502 residuos). La coexpresión de los baculovirus recombinantes que expresan la proteína quimérica diseñada y parental permite la incorporación de un número elevado de moléculas de antígeno/partícula.
- 4) La inmunización de ratones con VLPs quiméricas de HT-VP2-466 que incorporan los antígenos del virus de la gripe A/PR8 HA2, M2, o ambos simultáneamente, confiere protección frente a un desafío viral.
- 5) El proceso de desensamblaje y ensamblaje *in vitro* de cápsidas formadas por HT-VP2-466 es reversible. En el proceso de ensamblaje de VLPs se pueden incorporar ácidos nucleicos.



---

## **7. Bibliografía**



- Allen, M., Bulte, J. W., Liepold, L., Basu, G., Zywicke, H. A., Frank, J. A., Young, M. y Douglas, T. (2005) Paramagnetic viral nanoparticles as potential high-relaxivity magnetic resonance contrast agents. *Magn Reson Med* **4**, 807-12
- Antin, P. B. y Ordahl, C. P. (1991) Isolation and characterization of an avian myogenic cell line. *Dev Biol* **1**, 111-21
- Asokan, A., Conway, J. C., Phillips, J. L., Li, C., Hegge, J., Sinnott, R., Yadav, S., DiPrimio, N., Nam, H. J., Agbandje-McKenna, M., McPhee, S., Wolff, J. y Samulski, R. J. (2010) Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat Biotechnol* **1**, 79-82
- Barr, S. M., Keck, K. y Aposhian, H. V. (1979) Cell-free assembly of a polyoma-like particle from empty capsids and DNA. *Virology* **2**, 656-9
- Birghan, C., Mundt, E. y Gorbalenya, A. E. (2000) A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *Embo J* **1**, 114-23
- Bisht, H., Chugh, D. A., Raje, M., Swaminathan, S. S. y Khanna, N. (2002) Recombinant dengue virus type 2 envelope/hepatitis B surface antigen hybrid protein expressed in *Pichia pastoris* can function as a bivalent immunogen. *J Biotechnol* **2**, 97-110
- Böttcher, B., Kiselev, N. A., Stel'Mashchuk, V. Y., Perevozchikova, N. A., Borisov, A. V. y Crowther, R. A. (1997) Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J Virol* **1**, 325-30
- Branco, L. M., Grove, J. N., Geske, F. J., Boisen, M. L., Muncy, I. J., Magliato, S. A., Henderson, L. A., Schoepp, R. J., Cashman, K. A., Hensley, L. E. y Garry, R. F. (2010) Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever. *Virol J* **279**
- Braun, H., Boller, K., Lower, J., Bertling, W. M. y Zimmer, A. (1999) Oligonucleotide and plasmid DNA packaging into polyoma VP1 virus-like particles expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* **31-43**
- Brockman, W. W. y Nathans, D. (1974) The isolation of simian virus 40 variants with specifically altered genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **3**, 942-6
- Brun, A., Barcena, J., Blanco, E., Borrego, B., Dory, D., Escribano, J. M., Le Gall-Recule, G., Ortego, J. y Dixon, L. K. (2011) Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development. *Virus Res* **1**, 1-12
- Bublot, M., Pritchard, N., Le Gros, F. X. y Goutebroze, S. (2007) Use of a vectored vaccine against infectious bursal disease of chickens in the face of high-titred maternally derived antibody. *J Comp Pathol* **S81-4**
- Busnadiago, I., Maestre, A. M., Rodriguez, D. y Rodriguez, J. F. (2012) The Infectious Bursal Disease Virus RNA-Binding VP3 Polypeptide Inhibits PKR-Mediated Apoptosis. *PLoS One* **10**, e46768
- Butler, P. J. y Klug, A. (1971) Assembly of the particle of tobacco mosaic virus from RNA and disks of protein. *Nat New Biol* **2**, 47-50

- Butter, C., Sturman, T. D., Baaten, B. J. y Davison, T. F. (2003) Protection from infectious bursal disease virus (IBDV)-induced immunosuppression by immunization with a fowlpox recombinant containing IBDV-VP2. *Avian Pathol* **6**, 597-604
- Campbell, P., Ma, S., Yeom, B., McKellop, H., Schmalzried, T. P. y Amstutz, H. C. (1995) Isolation of predominantly submicron-sized UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. *J Biomed Mater Res* **1**, 127-31
- Capecchi, M. R. (1980) High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* **2 Pt 2**, 479-88
- Casanas, A., Navarro, A., Ferrer-Orta, C., Gonzalez, D., Rodriguez, J. F. y Verdager, N. (2008) Structural insights into the multifunctional protein VP3 of birnaviruses. *Structure* **1**, 29-37
- Caspar, D. L. D. y Klug, A. (1962) Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1-24
- Caston, J. R., Martínez-Torrecuadrada, J. L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J. F., Casal, J. I. y Carrascosa, J. L. (2001) C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J Virol* **22**, 10815-28
- Castón, J. R., Martínez-Torrecuadrada, J. L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J. F., Casal, J. I. y Carrascosa, J. L. (2001) C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J Virol* **22**, 10815-28
- Castón, J. R., Rodríguez, J. F. y Carrascosa, J. L. (2008) Infectious Bursal Disease Virus: A Segmented Double-Stranded RNA Virus With a T = 13 Capsid that Lacks a T = 1 Core. *Segmented Double-Stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology Series* Caister Academic Press
- Corti, D., Voss, J., Gamblin, S. J., Codoni, G., Macagno, A., Jarrossay, D., Vachieri, S. G., Pinna, D., Minola, A., Vanzetta, F., Silacci, C., Fernandez-Rodriguez, B. M., Agatic, G., Bianchi, S., Giacchetto-Sasselli, I., Calder, L., Sallusto, F., Collins, P., Haire, L. F., Temperton, N., Langedijk, J. P., Skehel, J. J. y Lanzavecchia, A. (2011) A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* **6044**, 850-6
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B. y Rey, F. A. (2005) The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell* **6**, 761-72
- Cox, M. M. (2012) Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine* **10**, 1759-66
- Crisci, E., Barcena, J. y Montoya, M. (2012) Virus-like particles: The new frontier of vaccines for animal viral infections. *Vet Immunol Immunopathol*
- Chackerian, B. (2007) Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev Vaccines* **3**, 381-90
- Chang, H. C., Lin, T. L. y Wu, C. C. (2003) DNA vaccination with plasmids containing various fragments of large segment genome of infectious bursal disease virus. *Vaccine* **5-6**, 507-13

- Charpilienne, A., Nejmeddine, M., Berois, M., Parez, N., Neumann, E., Hewat, E., Trugnan, G. y Cohen, J. (2001) Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *J Biol Chem* **31**, 29361-7
- Chevalier, C., Galloux, M., Pous, J., Henry, C., Denis, J., Da Costa, B., Navaza, J., Lepault, J. y Delmas, B. (2005) Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation. *J Virol* **19**, 12253-63
- Chevalier, C., Lepault, J., Da Costa, B. y Delmas, B. (2004) The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus. *J Virol* **7**, 3296-303
- Chow, M., Basavappa, R. y Hogle, J. M. (1997) The role of conformational transitions in poliovirus pathogenesis. *Structural biology of viruses* Series 157-186 Oxford University Press
- Chung, I. Y. y Paetzel, M. (2011) Crystal structure of a viral protease intramolecular acyl-enzyme complex: insights into cis-cleavage at the VP4/VP3 junction of Tellina birnavirus. *J Biol Chem* **14**, 12475-82
- Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J. C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H. y Delmas, B. (2002) The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J. Virol.* **5**, 2393-2402
- De Filette, M., Fiers, W., Martens, W., Birkett, A., Ramne, A., Lowenadler, B., Lycke, N., Jou, W. M. y Saelens, X. (2006) Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine. *Vaccine* **44-46**, 6597-601
- Delgui, L., Ona, A., Gutierrez, S., Luque, D., Navarro, A., Caston, J. R. y Rodriguez, J. F. (2009) The capsid protein of infectious bursal disease virus contains a functional alpha 4 beta 1 integrin ligand motif. *Virology* **2**, 360-72
- Dobos, P. (1993) In vitro guanylation of infectious pancreatic necrosis virus polypeptide VP1. *Virology* **1**, 403-13
- Dobos, P., Hill, B. J., Hallett, R., Kells, D. T., Becht, H. y Teninges, D. (1979) Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol* **2**, 593-605
- Dokland, T. (2000) Freedom and restraint: themes in virus capsid assembly. *Structure Fold. Des.* **8**, R157-R162
- Douglas, T., Strable, E., Willits, D., Aitouchen, A., Libera, M. y Young, M. (2002) *Adv. Mater.* 415-418
- Douglas, T. y Young, M. (1998) *Nature* 152-155
- Douglas, T. y Young, M. (2006) Viruses: making friends with old foes. *Science* **5775**, 873-5
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W. y Schultz, P. (1988) Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* **2**, 129-228
- Ekiert, D. C., Friesen, R. H., Bhabha, G., Kwaks, T., Jongeneelen, M., Yu, W., Ophorst, C., Cox, F., Korse, H. J., Brandenburg, B., Vogels, R., Brakenhoff, J. P., Kompier, R., Koldijk, M. H., Cornelissen, L. A., Poon, L. L., Peiris, M., Koudstaal, W., Wilson, I. A. y Goudsmit, J.

(2011) A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science* **6044**, 843-50

Fan, J., Liang, X., Horton, M. S., Perry, H. C., Citron, M. P., Heidecker, G. J., Fu, T. M., Joyce, J., Przysiecki, C. T., Keller, P. M., Garsky, V. M., Ionescu, R., Rippeon, Y., Shi, L., Chastain, M. A., Condra, J. H., Davies, M. E., Liao, J., Emini, E. A. y Shiver, J. W. (2004) Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine* **23-24**, 2993-3003

Feldman, A. R., Lee, J., Delmas, B. y Paetzel, M. (2006) Crystal structure of a novel viral protease with a serine/lysine catalytic dyad mechanism. *J Mol Biol* **5**, 1378-89

Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. y Rodríguez, J. F. (1998) Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J Gen Virol* 1047-54

Flint, S. J., Enquist, L. W., Krug, R. M., Rancaniello, V. R. y Skalka, A. M. (2009) Virus Structure. *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control* Series ASM Press

Fodor, I., Horvath, E., Fodor, N., Nagy, E., Rencendorsh, A., Vakharia, V. N. y Dube, S. K. (1999) Induction of protective immunity in chickens immunised with plasmid DNA encoding infectious bursal disease virus antigens. *Acta Vet Hung* **4**, 481-92

Fouchier, R. A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G. F., Olsen, B. y Osterhaus, A. D. (2005) Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* **5**, 2814-22

Francois, A., Chevalier, C., Delmas, B., Eterradossi, N., Toquin, D., Rivallan, G. y Langlois, P. (2004) Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens. *Vaccine* **17-18**, 2351-60

Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M. y Leith, A. (1996) SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol* **1**, 190-9

Galloux, M., Libersou, S., Morellet, N., Bouaziz, S., Da Costa, B., Ouldali, M., Lepault, J. y Delmas, B. (2007) Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. *J Biol Chem*

Garcea, R. L. y Gissmann, L. (2004) Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Curr Opin Biotechnol* **6**, 513-7

Garriga, D., Navarro, A., Querol-Audí, J., Abaitua, F., Rodríguez, J. F. y Verdaguer, N. (2007) Unprecedented activation mechanism of a non-canonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A pendiente de publicación*,

Garriga, D., Querol-Audi, J., Abaitua, F., Saugar, I., Pous, J., Verdaguer, N., Caston, J. R. y Rodríguez, J. F. (2006) The 2.6-Angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *J Virol* **14**, 6895-905

Ge, J., Deng, G., Wen, Z., Tian, G., Wang, Y., Shi, J., Wang, X., Li, Y., Hu, S., Jiang, Y., Yang, C., Yu, K., Bu, Z. y Chen, H. (2007) Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice from lethal challenge of homologous and heterologous H5N1 avian influenza viruses. *J Virol* **1**, 150-8

- Granzow, H., Birghan, C., Mettenleiter, T. C., Beyer, J., Kollner, B. y Mundt, E. (1997) A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *J Virol* **11**, 8879-85
- Grgacic, E. V. y Anderson, D. A. (2006) Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* **1**, 60-5
- Hjalmarsson, A., Carlemalm, E. y Everitt, E. (1999) Infectious pancreatic necrosis virus: identification of a VP3-containing ribonucleoprotein core structure and evidence for O-linked glycosylation of the capsid protein VP2. *J Virol* **4**, 3484-90
- Iqbal, M. (2012) Progress toward the development of polyvalent vaccination strategies against multiple viral infections in chickens using herpesvirus of turkeys as vector. *Bioengineered* **4**, 222-6
- Irigoyen, N., Caston, J. R. y Rodriguez, J. F. Host proteolytic activity is necessary for infectious bursal disease virus capsid protein assembly. *J Biol Chem* **29**, 24473-82
- Irigoyen, N., Caston, J. R. y Rodriguez, J. F. (2012) Host proteolytic activity is necessary for infectious bursal disease virus capsid protein assembly. *J Biol Chem* **29**, 24473-82
- Irigoyen, N., Garriga, D., Navarro, A., Verdaguer, N., Rodriguez, J. F. y Caston, J. R. (2009) Autoproteolytic activity derived from the infectious bursal disease virus capsid protein. *J Biol Chem* **12**, 8064-72
- Ito, T., Gorman, O. T., Kawaoka, Y., Bean, W. J. y Webster, R. G. (1991) Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J Virol* **10**, 5491-8
- Jegerlehner, A., Tissot, A., Lechner, F., Sebbel, P., Erdmann, I., Kundig, T., Bachi, T., Storni, T., Jennings, G., Pumpens, P., Renner, W. A. y Bachmann, M. F. (2002) A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine* **25-26**, 3104-12
- Johnson, J. E. (1996) Functional implications of protein-protein interactions in icosahedral viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1**, 27-33
- Johnson, J. E. y Chiu, W. (2000) Structures of virus and virus-like particles. *Curr Opin Struct Biol* **2**, 229-35
- Kang, J. H., Oh, C. E., Lee, J., Lee, S. Y., Cha, S. H., Kim, D. S., Kim, H. H., Lee, J. H., Kim, J. T., Ma, S. H., Hong, Y. J., Cheong, H. J. y Lee, H. J. (2011) Safety and immunogenicity of a new trivalent inactivated split-virus influenza vaccine in healthy Korean children: a randomized, double-blinded, active-controlled, phase III study. *J Korean Med Sci* **11**, 1421-7
- Kashyap, A. K., Steel, J., Oner, A. F., Dillon, M. A., Swale, R. E., Wall, K. M., Perry, K. J., Faynboym, A., Ilhan, M., Horowitz, M., Horowitz, L., Palese, P., Bhatt, R. R. y Lerner, R. A. (2008) Combinatorial antibody libraries from survivors of the Turkish H5N1 avian influenza outbreak reveal virus neutralization strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **16**, 5986-91
- Kaufers, I. y Weiss, E. (1980) Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. *Infect Immun* **2**, 364-7
- Kibenge, F. S., Dhillon, A. S. y Russell, R. G. (1988) Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol* 1757-75

- Kratz, P. A., Bottcher, B. y Nassal, M. (1999) Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **5**, 1915-20
- Krystal, M., Elliott, R. M., Benz, E. W., Jr., Young, J. F. y Palese, P. (1982) Evolution of influenza A and B viruses: conservation of structural features in the hemagglutinin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **15**, 4800-4
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **5259**, 680-5
- Lamb, R. A., Zebedee, S. L. y Richardson, C. D. (1985) Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface. *Cell* **3**, 627-33
- Laver, W. G., Gerhard, W., Webster, R. G., Frankel, M. E. y Air, G. M. (1979) Antigenic drift in type A influenza virus: peptide mapping and antigenic analysis of A/PR/8/34 (HON1) variants selected with monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **3**, 1425-9
- Lee, C. C., Ko, T. P., Chou, C. C., Yoshimura, M., Doong, S. R., Wang, M. Y. y Wang, A. H. (2006) Crystal structure of infectious bursal disease virus VP2 subviral particle at 2.6Å resolution: Implications in virion assembly and immunogenicity. *J. Struct. Biol.* **1**, 74-86
- Lee, J., Feldman, A. R., Delmas, B. y Paetzel, M. (2007) Crystal structure of the VP4 protease from infectious pancreatic necrosis virus reveals the acyl-enzyme complex for an intermolecular self-cleavage reaction. *J Biol Chem*
- Lejal, N., Da Costa, B., Huet, J. C. y Delmas, B. (2000) Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *J Gen Virol* **Pt 4**, 983-92
- Letzel, T., Coulibaly, F., Rey, F. A., Delmas, B., Jagt, E., van Loon, A. A. y Mundt, E. (2007) Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *J Virol* **23**, 12827-35
- Liu, M. y Vakharia, V. N. (2006) Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *J Virol* **7**, 3369-77
- Lokesh, G. L., Gowri, T. D., Satheshkumar, P. S., Murthy, M. R. y Savithri, H. S. (2002) A molecular switch in the capsid protein controls the particle polymorphism in an icosahedral virus. *Virology* **2**, 211-23
- Lombardo, E., Maraver, A., Caston, J. R., Rivera, J., Fernandez-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. y Rodriguez, J. F. (1999) VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J Virol* **8**, 6973-83
- Lombardo, E., Maraver, A., Espinosa, I., Fernandez-Arias, A. y Rodriguez, J. F. (2000) VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology* **2**, 345-57
- Lu, B., Taraporewala, F., Stubbs, G. y Culver, J. N. (1998) Intersubunit interactions allowing a carboxylate mutant coat protein to inhibit tobamovirus disassembly. *Virology* **1**, 13-9
- Luckow, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F. y Olins, P. O. (1993) Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in Escherichia coli. *J Virol* **8**, 4566-79

- Ludwig, C. y Wagner, R. (2007) Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Curr Opin Biotechnol* **6**, 537-45
- Luque, D., Rivas, G., Alfonso, C., Carrascosa, J. L., Rodriguez, J. F. y Caston, J. R. (2009a) Infectious bursal disease virus is an icosahedral polypliod dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **7**, 2148-52
- Luque, D., Saugar, I., Rejas, M. T., Carrascosa, J. L., Rodriguez, J. F. y Caston, J. R. (2009b) Infectious Bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. *J Mol Biol* **3**, 891-901
- Luque, D., Saugar, I., Rodriguez, J. F., Verdaguer, N., Garriga, D., Martin, C. S., Velazquez-Muriel, J. A., Trus, B. L., Carrascosa, J. L. y Caston, J. R. (2007) Infectious bursal disease virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch. *J Virol* **13**, 6869-78
- Madin, S. H. y Darby, N. B., Jr. (1958) Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc Soc Exp Biol Med* **3**, 574-6
- Mahgoub, H. A., Bailey, M. y Kaiser, P. (2012) An overview of infectious bursal disease. *Arch Virol* **11**, 2047-57
- Manayani, D. J., Thomas, D., Dryden, K. A., Reddy, V., Siladi, M. E., Marlett, J. M., Rainey, G. J., Pique, M. E., Scobie, H. M., Yeager, M., Young, J. A., Manchester, M. y Schneemann, A. (2007) A viral nanoparticle with dual function as an anthrax antitoxin and vaccine. *PLoS Pathog* **10**, 1422-31
- Marabini, R., Masegosa, I. M., San Martin, M. C., Marco, S., Fernandez, J. J., de la Fraga, L. G., Vaquerizo, C. y Carazo, J. M. (1996) Xmipp: An Image Processing Package for Electron Microscopy. *J Struct Biol* **1**, 237-40
- Maranga, L., Rueda, P., Antonis, A. F., Vela, C., Langeveld, J. P., Casal, J. I. y Carrondo, M. J. (2002) Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine. *Appl Microbiol Biotechnol* **1**, 45-50
- Maraver, A., Clemente, R., Rodriguez, J. F. y Lombardo, E. (2003a) Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *J Virol* **4**, 2459-68
- Maraver, A., Ona, A., Abaitua, F., Gonzalez, D., Clemente, R., Ruiz-Diaz, J. A., Caston, J. R., Pazos, F. y Rodriguez, J. F. (2003b) The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J Virol* **11**, 6438-49
- Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. y Casal, J. I. (2000) Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* **2**, 322-31
- Martinez-Torrecuadrada, J. L., Saubi, N., Pages-Mante, A., Caston, J. R., Espuna, E. y Casal, J. I. (2003) Structure-dependent efficacy of infectious bursal disease virus (IBDV) recombinant vaccines. *Vaccine* **23**, 3342-50
- Mateo, R. (2004) Disección funcional de las interfases entre subunidades de la cápsida del virus de la fiebre aftosa y aproximaciones al diseño de cápsidas más estables. *Tesis Doctoral*

- Mateu, M. G. (1995) Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res* **1**, 1-24
- Mateu, M. G. (2010) Virus engineering: functionalization and stabilization. *Protein Eng Des Sel* **1-2**, 53-63
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A. y Klenk, H. D. (2004) Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol* **22**, 12665-7
- McAleer, W. J., Buynak, E. B., Maigetter, R. Z., Wampler, D. E., Miller, W. J. y Hilleman, M. R. (1984) Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* **5947**, 178-80
- Miyanochara, A., Imamura, T., Araki, M., Sugawara, K., Ohtomo, N. y Matsubara, K. (1986) Expression of hepatitis B virus core antigen gene in *Saccharomyces cerevisiae*: synthesis of two polypeptides translated from different initiation codons. *J Virol* **1**, 176-80
- Morais, M. C., Fisher, M., Kanamaru, S., Przybyla, L., Burgner, J., Fane, B. A. y Rossmann, M. G. (2004) Conformational switching by the scaffolding protein D directs the assembly of bacteriophage  $\phi$ X174. *Mol. Cell* **6**, 991-997
- Morgan, M. M., Macreadie, I. G., Harley, V. R., Hudson, P. J. y Azad, A. A. (1988) Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product. *Virology* **1**, 240-2
- Muller, H. y Nitschke, R. (1987a) Molecular weight determination of the two segments of double-stranded RNA of infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **2**, 113-21
- Muller, H. y Nitschke, R. (1987b) The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology* **1**, 174-7
- Muller, H., Scholtissek, C. y Becht, H. (1979) The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J Virol* **3**, 584-9
- Mundt, E., Kollner, B. y Kretzschmar, D. (1997) VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J Virol* **7**, 5647-51
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C. y Studdert, M. J. (1999) *Veterinary Virology*. Series 405-409 Academic Press
- Nayak, B., Rout, S. N., Kumar, S., Khalil, M. S., Fouda, M. M., Ahmed, L. E., Earhart, K. C., Perez, D. R., Collins, P. L. y Samal, S. K. (2009) Immunization of chickens with Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin protects against highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses. *PLoS One* **8**, e6509
- Neiryck, S., Deroo, T., Saelens, X., Vanlandschoot, P., Jou, W. M. y Fiers, W. (1999) A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* **10**, 1157-63
- Noad, R. y Roy, P. (2003) Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol* **9**, 438-44

- Ona, A., Luque, D., Abaitua, F., Maraver, A., Caston, J. R. y Rodriguez, J. F. (2004) The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology* **1**, 135-42
- Palese, P. y Compans, R. W. (1976) Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J Gen Virol* **1**, 159-63
- Pan, J., Vakharia, V. N. y Tao, Y. J. (2007) The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **18**, 7385-90
- Petit, S., Lejal, N., Huet, J. C. y Delmas, B. (2000) Active residues and viral substrate cleavage sites of the protease of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol* **5**, 2057-66
- Pielak, R. M. y Chou, J. J. (2010) Influenza M2 proton channels. *Biochim Biophys Acta* **2**, 522-9
- Plummer, E. M. y Manchester, M. (2010) Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*
- Pradhan, S. N., Prince, P. R., Madhumathi, J., Roy, P., Narayanan, R. B. y Antony, U. (2012) Protective immune responses of recombinant VP2 subunit antigen of infectious bursal disease virus in chickens. *Vet Immunol Immunopathol* **3-4**, 293-301
- Prendergast, F. G. y Mann, K. G. (1978) Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskalea*. *Biochemistry* **17**, 3448-53
- Remond, M., Da Costa, B., Riffault, S., Parida, S., Breard, E., Lebreton, F., Zientara, S. y Delmas, B. (2009) Infectious bursal disease subviral particles displaying the foot-and-mouth disease virus major antigenic site. *Vaccine* **1**, 93-8
- Rogan, D. y Babiuk, L. A. (2005) Novel vaccines from biotechnology. *Rev Sci Tech* **1**, 159-74
- Rong, J., Jiang, T., Cheng, T., Shen, M., Du, Y., Li, S., Wang, S., Xu, B. y Fan, G. (2007) Large-scale manufacture and use of recombinant VP2 vaccine against infectious bursal disease in chickens. *Vaccine* **46**, 7900-8
- Rossmann, M. G., Greeve, J. M., Kolatkar, P. R., Olson, N. H., Smith, T. J., McKinlay, M. A. y Rueckert, R. R. (1997) Rhinovirus attachment and cell entry *Structural biology of viruses* Series 105-133 Oxford University Press
- Routh, A., Domitrovic, T. y Johnson, J. E. (2012) Host RNAs, including transposons, are encapsidated by a eukaryotic single-stranded RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **6**, 1907-12
- Rueda, P., Fominaya, J., Langeveld, J. P., Brusckhe, C., Vela, C. y Casal, J. I. (2000) Effect of different baculovirus inactivation procedures on the integrity and immunogenicity of porcine parvovirus-like particles. *Vaccine* **7-8**, 726-34
- Russell, R. J., Gamblin, S. J., Haire, L. F., Stevens, D. J., Xiao, B., Ha, Y. y Skehel, J. J. (2004) H1 and H7 influenza haemagglutinin structures extend a structural classification of haemagglutinin subtypes. *Virology* **2**, 287-96
- Sagawa, H., Ohshima, A., Kato, I., Okuno, Y. y Isegawa, Y. (1996) The immunological activity of a deletion mutant of influenza virus haemagglutinin lacking the globular region. *J Gen Virol* **1483-7**

- Sánchez, A. B. y Rodríguez, J. F. (1999) Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology* **1**, 190-199
- Saugar, I., Irigoyen, N., Luque, D., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. y Caston, J. R. (2010) Electrostatic interactions between capsid and scaffolding proteins mediate the structural polymorphism of a double-stranded RNA virus. *J Biol Chem* **6**, 3643-50
- Saugar, I., Luque, D., Ona, A., Rodríguez, J. F., Carrascosa, J. L., Trus, B. L. y Caston, J. R. (2005a) Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic alpha helix as a molecular switch. *Structure* **7**, 1007-17
- Saugar, I., Luque, D., Oña, A., Rodríguez, J. F., Carrascosa, J. L., Trus, B. L. y Castón, J. R. (2005b) Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic alpha helix as a molecular switch. *Structure* **7**, 1007-17
- Schneemann, A., Speir, J. A., Tan, G. S., Khayat, R., Ekiert, D. C., Matsuoka, Y. y Wilson, I. A. (2012) A virus-like particle that elicits cross-reactive antibodies to the conserved stem of influenza virus hemagglutinin. *J Virol* **21**, 11686-97
- Schnell, J. R. y Chou, J. J. (2008) Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature* **7178**, 591-5
- Schodel, F., Moriarty, A. M., Peterson, D. L., Zheng, J. A., Hughes, J. L., Will, H., Leturcq, D. J., McGee, J. S. y Milich, D. R. (1992) The position of heterologous epitopes inserted in hepatitis B virus core particles determines their immunogenicity. *J Virol* **1**, 106-14
- Shivachandra, S. B., Li, Q., Peachman, K. K., Matyas, G. R., Leppla, S. H., Alving, C. R., Rao, M. y Rao, V. B. (2007) Multicomponent anthrax toxin display and delivery using bacteriophage T4. *Vaccine* **7**, 1225-35
- Shwed, P. S., Dobos, P., Cameron, L. A., Vakharia, V. N. y Duncan, R. (2002) Birnavirus VP1 proteins form a distinct subgroup of RNA-dependent RNA polymerases lacking a GDD motif. *Virology* **2**, 241-50
- Skehel, J. M. (2004) Preparation of extracts from animal tissues. *Methods Mol Biol* 15-20
- Slepushkin, V. A., Katz, J. M., Black, R. A., Gamble, W. C., Rota, P. A. y Cox, N. J. (1995) Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine* **15**, 1399-402
- Smith, G. P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **4705**, 1315-7
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. y Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **1**, 76-85
- Soong, N. W., Nomura, L., Pekrun, K., Reed, M., Sheppard, L., Dawes, G. y Stemmer, W. P. (2000) Molecular breeding of viruses. *Nat Genet* **4**, 436-9
- Spies, U. y Muller, H. (1990) Demonstration of enzyme activities required for cap structure formation in infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *J Gen Virol* 977-81

- Spies, U., Muller, H. y Becht, H. (1987) Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res* **2**, 127-40
- Stouffer, A. L., Acharya, R., Salom, D., Levine, A. S., Di Costanzo, L., Soto, C. S., Tereshko, V., Nanda, V., Stayrook, S. y DeGrado, W. F. (2008) Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature* **7178**, 596-9
- Strengell, M., Ikonen, N., Ziegler, T. y Julkunen, I. (2011) Minor changes in the hemagglutinin of influenza A(H1N1)2009 virus alter its antigenic properties. *PLoS One* **10**, e25848
- Tacken, M. G., Peeters, B. P., Thomas, A. A., Rottier, P. J. y Boot, H. J. (2002) Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J Virol* **22**, 11301-11
- Tacken, M. G., Rottier, P. J., Gielkens, A. L. y Peeters, B. P. (2000) Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. *J Gen Virol Pt 1*, 209-18
- Tang, Y., Gong, Y., Wang, Y., Lu, J., Wu, P., Gao, F., Chen, T., He, J. y Hou, J. (2012) [Characterization the immunogenicity of recombinant VP2 of infectious bursal disease virus containing N-terminal M2e of avian influenza virus]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **6**, 753-9
- Tsukamoto, K., Kojima, C., Komori, Y., Tanimura, N., Mase, M. y Yamaguchi, S. (1999) Protection of chickens against very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) and Marek's disease virus (MDV) with a recombinant MDV expressing IBDV VP2. *Virology* **2**, 352-62
- Tsukamoto, K., Saito, S., Saeki, S., Sato, T., Tanimura, N., Isobe, T., Mase, M., Imada, T., Yuasa, N. y Yamaguchi, S. (2002) Complete, long-lasting protection against lethal infectious bursal disease virus challenge by a single vaccination with an avian herpesvirus vector expressing VP2 antigens. *J Virol* **11**, 5637-45
- Upadhyay, C., Ammayappan, A., Patel, D., Kovesdi, I. y Vakharia, V. N. (2011) Recombinant infectious bursal disease virus carrying hepatitis C virus epitopes. *J Virol* **3**, 1408-14
- Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W. J., Ammerer, G. y Hall, B. D. (1982) Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* **5872**, 347-50
- Valli, A., Busnadiago, I., Maliogka, V., Ferrero, D., Caston, J. R., Rodriguez, J. F. y Garcia, J. A. (2012) The VP3 factor from viruses of Birnaviridae family suppresses RNA silencing by binding both long and small RNA duplexes. *PLoS One* **9**, e45957
- Veits, J., Wiesner, D., Fuchs, W., Hoffmann, B., Granzow, H., Starick, E., Mundt, E., Schirrmeier, H., Mebatsion, T., Mettenleiter, T. C. y Romer-Oberdorfer, A. (2006) Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A* **21**, 8197-202
- Venter, P. A. y Schneemann, A. (2008) Recent insights into the biology and biomedical applications of Flock House virus. *Cell Mol Life Sci* **17**, 2675-87
- Verma, I. M. y Weitzman, M. D. (2005) Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* **711-38**

- Villanueva, R. A., Galaz, J. L., Valdes, J. A., Jashes, M. M. y Sandino, A. M. (2004) Genome assembly and particle maturation of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* **24**, 13829-13838
- Wang, T. T., Tan, G. S., Hai, R., Pica, N., Ngai, L., Ekiert, D. C., Wilson, I. A., Garcia-Sastre, A., Moran, T. M. y Palese, P. (2010) Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**, 18979-84
- Wei, L., Hou, L., Zhu, S., Wang, J., Zhou, J. y Liu, J. (2011) Infectious bursal disease virus activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway by interaction of VP5 protein with the p85alpha subunit of PI3K. *Virology* **1**, 211-20
- Wrammert, J., Koutsonanos, D., Li, G. M., Edupuganti, S., Sui, J., Morrissey, M., McCausland, M., Skountzou, I., Hornig, M., Lipkin, W. I., Mehta, A., Razavi, B., Del Rio, C., Zheng, N. Y., Lee, J. H., Huang, M., Ali, Z., Kaur, K., Andrews, S., Amara, R. R., Wang, Y., Das, S. R., O'Donnell, C. D., Yewdell, J. W., Subbarao, K., Marasco, W. A., Mulligan, M. J., Compans, R., Ahmed, R. y Wilson, P. C. (2011) Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *J Exp Med* **1**, 181-93
- Wu, Y., Hong, L., Ye, J., Huang, Z. y Zhou, J. (2009) The VP5 protein of infectious bursal disease virus promotes virion release from infected cells and is not involved in cell death. *Arch Virol* **12**, 1873-82
- Wu, Z., Asokan, A. y Samulski, R. J. (2006) Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* **3**, 316-27
- Xu, H. T., Si, W. D. y Dobos, P. (2004) Mapping the site of guanylation on VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis. *Virology* **1**, 199-210
- Yang, F., Moss, L. G. y Phillips, G. N., Jr. (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **10**, 1246-51
- Zebedee, S. L. y Lamb, R. A. (1988) Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol* **8**, 2762-72