



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Desarrollo de una vacuna recombinante contra la enfermedad
de Aujeszky en partículas paracristalinas biológicas.

TESIS

que para optar por el grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA:

M. en C. Alicia Sampieri García

TUTOR:

Dr. LUIS A. VACA DOMÍNGUEZ
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

Dra. EDDA L. SCIUTTO CONDE
Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. KAREN MANUCHARIAN AIRAPETIAN
Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM

MÉXICO, D. F.

Enero, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO

- Presidente: Dr. Lourival Possani Postay
Instituto de Biotecnología, UNAM
- Secretario: Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
- Vocal: Dra. Gladis Fragoso González
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
- Vocal: Dr. Julio César Carrero Sánchez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
- Vocal: Dr. Carlos Rosales Ledezma
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Agradecimientos

Esta tesis se llevó a cabo con los apoyos económicos de los siguientes proyectos: 127822, 215122 y 214836 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), IN203315-PAPIIT de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT) y ICYTDF/200 de la Secretaría de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal.

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, al Instituto de Fisiología Celular y a la Universidad Nacional Autónoma de México que me han dado la posibilidad de alcanzar este logro tan largamente esperado.

Al Dr. Luis Alfonso Vaca, en primer lugar por haberme aceptado a formar parte de su equipo de trabajo; en segundo lugar por haberme impulsado a realizar mis estudios de Doctorado y por último por su confianza y apoyo en este trabajo. Muchas, muchas gracias.

A mi Comité Tutorial, a la Dra. Edda Lidia Sciutto Conde y al Dr. Karen Manoutcharian Airapetian por sus valiosas sugerencias y comentarios en el desarrollo de este trabajo.

A los sinodales designados por el Comité del Posgrado para la revisión de esta tesis y jurado en el examen de grado, el Dr. Lourival Domingos Possani Postay, el Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez, la Dra. Gladis del Carmen Fragoso González, el Dr. Julio César Carrero Sánchez y el Dr. Carlos Rosales Ledezma, a todos ellos por sus correcciones, comentarios y sugerencias a este trabajo.

Al Dr. Agustín Luz Madrigal, porque este trabajo no hubiera sido el que es sin nuestras pláticas y el análisis, las observaciones y el aprendizaje juntos.

Al Dr. José Iván Sánchez Betancourt y a la M. en C. Rosalba Carreón Nápoles por la donación del virus de Aujeszky y su apoyo en el cuidado de los ratones infectados por este virus.

A las Sras. Gloria y Salustia Salgado Guzmán, porque su trabajo, amistad y paciencia siempre han sido un apoyo para mí.

Al Biol. Gabriel Orozco Oyuela y al Dr. Rodolfo Paredes Díaz por su apoyo en el trabajo de Microscopía Confocal y Electrónica.

A las integrantes de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, la Dra. Laura Ma. Ongay Larios, a la Biol. Ma. Guadalupe Códiz Huerta y a la M. en C. Dolores Minerva Mora Cabrera por su apoyo técnico en el uso de los diferentes equipos a su cargo.

A los Ing. Aurey Galván Lobato y Manuel Ortínez Benavides por su apoyo en todos los trabajos de reparación del equipo y su apoyo inmediato en otros servicios de mantenimiento del laboratorio.

Al Biol. Gerardo Coello Coutiño, y a los Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo e Ivett Rosas Arciniega, por su apoyo siempre incondicional y eficaz en materia de computación.

A los Doctores Claudia Rivera Cerecedo y Héctor Malagón Rivero y a la M. en IBB. Gabriela Xóchitl Ayala Méndez por su apoyo en la entrega y manejo de los animales del bioterio requeridos para el desarrollo de este trabajo.

Al personal adscrito a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM, el Dr. Jorge Yáñez, Dr. Rubén Paul Gaytán Colín y al M. en C. Eugenio López Bustos, quienes siempre llevaron a cabo su trabajo de manera rápida y eficiente, elementos necesarios en el desarrollo de Investigación de calidad.

Al todo el personal de la Biblioteca a través de la Mtra. Sandra Guillermina Moncada Hernández y el CD Javier Gallegos Infante.

Quiero agradecer también a las asistentes educativas Lic. Zenaida Martínez Estrella en el Posgrado en Ciencias Biomédicas y a Sara Noguera Solano en la Secretaría de Enseñanza del Instituto de Fisiología Celular por su apoyo en todos los trámites durante mis estudios de Doctorado.

A todas mis amigas y amigos Técnicos Académicos, porque de alguna u otra manera siempre nos apoyamos con el material necesario para llevar a cabo nuestro trabajo día a día por su valioso apoyo técnico, en particular a: Biol. Alma Olivia Sánchez González, Dra. María Teresa Romero Ávila, Dr. Valentín Mendoza Rodríguez, Biol. Marcela Sosa Garrocho, Biol. Ma. Cristina Aranda Fraustro, Biol. Beatriz Aguirre López, M. en C. Blanca Alicia Delgado Coello, M. en C. Natalia Ivanovna Copitin, Biol. Nallely Cabrera González, Biol. Georgina Avendaño Guerrero, Biol. Miriam Vázquez Acevedo, Dra. Norma Sánchez Espinosa, Dra. Martha Calhorra Fuertes, M. en C. Norma Silvia Sánchez, Sánchez, Biol. Teresa Montiel Montes, Biol. Gonzalo Asariel Acero Galindo y a todos mis compañeros técnicos académicos que compartimos estas magníficas instalaciones, a todos ellos en especial por su apoyo y confianza en mí y por su amistad.

Por último quiero agradecer a todo el personal del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, quienes siempre me han brindado el apoyo en diversos menesteres, en especial a Rosario Villaseñor Ávila, Asistente Ejecutivo del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Dominga Vera García, Asistente Ejecutivo de la Dirección, Diana Osorio Icaza, Asistente Ejecutivo de la Secretaría Académica, al personal que labora en los departamentos de compras tanto nacional como al extranjero, los departamentos de Ingresos Extraordinarios y la Oficina de DGAPA a cargo del C. Fidel Valdovinos Luna y del P-A. Pablo Montiel González respectivamente, y en general a todo el personal que día a día contribuye al mantenimiento del IFC lo que permite el desarrollo de la Investigación que aquí se realiza, todos ellos a cargo de la LAE. Ma. Del Pilar Martínez Martínez.

Dedicatoria

A mis hijos,
por todo su amor,
amor limpio y desinteresado.

Índice

Agradecimientos
Dedicatoria

Abreviaciones y sus traducciones

Resumen
Abstract

Introducción.....	1
Sistema de expresión en células de insecto (Baculovirus Expression Vector System, BEVS).....	3
Los baculovirus.....	5
Ciclo de vida de los baculovirus y sus fenotipos.....	8
Las poliedras.....	11
Biomateriales y biopolímeros.....	16
Nueva generación de vacunas: Antígenos y proteínas particuladas recombinantes.....	18
Desarrollo de nuevos adyuvantes.....	19
Partículas biodegradables de origen natural como sistema de expresión y presentación de antígenos y proteínas recombinantes.....	20
La enfermedad de Aujeszky.....	23
Hipótesis.....	26
Objetivo general.....	27
Objetivos específicos.....	27
Material y métodos.....	28
I. Líneas celulares de insecto y baculovirus.....	28
II. Construcción de baculovirus recombinantes.....	28
III. Producción y purificación de poliedras recombinantes y partículas tipo poliedra expresando la EGFP.....	32

IV. Análisis de la expresión de proteína en geles de acrilamida.....	32
V. Microscopia confocal y reconstrucciones en 3D.....	33
VI. Microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET).....	33
VII. Citometría de flujo (FACS).....	34
VIII. Detección de la EGFP inmovilizada sobre la poliedra por inmunohistoquímica.....	34
IX. Detección de la fluorescencia in vivo en ratones inmunizados con poliedras expresando la EGFP.....	35
X. Análisis de tamaño de las poliedras por NTA.....	35
XI. Inmunización de ratones Balb/c y reto con virus PRV.....	36

Resultados

1) Identificación de la secuencia mínima en la proteína poliedrina capaz de autoagregarse y generar poliedras.....	37
2) La poliedrina completa y los fragmentos 1-58, 58-110 y 1-110 fusionada a la EGFP solo producen poliedras canónicas cuando son expresados con la poliedrina silvestre.....	38
3) Análisis cuantitativo de la incorporación de una proteína exógena a la poliedra.....	48
4) Determinación de la accesibilidad de la EGFP en las poliedras recombinantes a anticuerpos.....	50
5) Análisis del tamaño de las partículas recombinantes de poliedrina mediante Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).....	50
6) Determinación del tiempo de permanencia de las poliedras recombinantes expresando PH-EGFP <i>in vivo</i>	52
7) Producción de partículas de poliedrina que integren los antígenos gB, gC y gD del virus de Aujeszky.....	53

Discusión y conclusiones.....	57
-------------------------------	----

Bibliografía.....	60
-------------------	----

Anexos.....	73
-------------	----

Resumen

La familia Baculoviridae comprende 4 géneros con un total de 47 especies de virus que infectan selectivamente a diversos tipos de insectos.

Uno de los baculovirus más estudiados a la fecha es, sin duda, *Autographa californica* MNPV, el cual infecta específicamente a lepidópteros. Este virus se utiliza desde finales de los años 80s, en combinación con el sistema de células de insecto en cultivo, como un eficiente y poderoso sistema de expresión para proteínas recombinantes. Actualmente el sistema de expresión en células de insecto mediado por estos virus es ampliamente usado para la producción de muchas de las proteínas recombinantes utilizadas en experimentación, así como para la producción de proteínas recombinantes de uso en medicina humana y veterinaria. Los baculovirus modificados también han sido utilizados como biopesticidas y existen múltiples estudios donde se les utiliza como sistemas de transducción de genes en tratamientos para la corrección de problemas de origen genético o en cáncer.

AcMNPV es parte del grupo de virus conocidos como nucleopoliedrovirus, es decir, virus que se ocluyen en cristales proteicos dentro del núcleo de células infectadas. Por lo tanto este virus tiene dos fenotipos: el virión libre y el ocluido dentro de una matriz proteica formada mayoritariamente por la proteína poliedrina. Esta partícula proteica conocida como poliedra contiene en su interior cientos de virus. El virus libre se encarga de la infección de célula a célula, dentro de las larvas de insecto infectadas por el mismo. Las poliedras conteniendo el virus ocluido, son liberadas al medio ambiente, una vez que los virus libres lisan todas las células y la larva prácticamente se deshace. En la forma ocluida, el virus puede sobrevivir en el medio ambiente por años. Uno de los fenotipos de este virus es cuando está inmerso o protegido por una matriz proteica llamada poliedra. En las últimas décadas se han desarrollado metodologías para la incorporación de diferentes péptidos y proteínas en estas partículas y usarlas como un biomaterial para la liberación de sustancias biológicas, purificación de proteínas recombinantes, etc. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce el mecanismo por el cual la poliedrina es capaz de formar las poliedras. Cabe mencionar que el mecanismo de producción de poliedras es muy robusto, el núcleo de células infectadas contiene decenas de poliedras, todas con la misma geometría y tamaño.

El primer objetivo del presente trabajo consistió en identificar el mecanismo por el cual la poliedrina produce poliedras. Seguimos la hipótesis más simple: la poliedrina es un péptido con propiedades de autoagregación, lo que le permite ensamblar los cristales de poliedra. Para lograr este objetivo produjimos varios fragmentos de la poliedrina y los fusionamos a la proteína verde fluorescente (EGFP), con el fin de poder realizar estudios estructurales mediante microscopia confocal y electrónica. La selección de los fragmentos a producir se llevó a cabo mediante un extenso análisis de estructura secundaria y terciaria in silico dirigido a predecir qué fragmentos mínimos pueden autoagregarse, buscando estructuras beta plegadas, las cuales sirven como punto de agregación para otros péptidos con actividad autoagregatoria conocida, tales como el beta amiloide responsable de la enfermedad de Alzheimer.

En este estudio encontramos que las propiedades de autoagregación se ubicaban hacia el fragmento amino terminal de la proteína poliedrina. El primer fragmento identificado fue el correspondiente a la secuencia 1-110 de la poliedrina. En esta secuencia se encuentran inmersos dos motivos repetidos, formados cada uno por dos cadenas beta seguidas por una hélice alfa (la primera en secuencia 1-58 y la segunda en la secuencia 58-110). Estudios subsecuentes con cada uno de estos péptidos por separado, mostraron que ambos (1-58 y 58-110) mantienen la propiedad de autoagregación.

El segundo objetivo del trabajo consistió en fusionar 3 fragmentos de las glicoproteínas gB, gC y gD del virus de Aujeszky al péptido de poliedrina 1-110 (PH₍₁₋₁₁₀₎) y producir partículas para ser utilizadas como acarreadores de vacunas contra esta enfermedad. La hipótesis que sustentó esta segunda parte del trabajo, se basa en que la poliedra es capaz de mantener en su interior baculovirus en buen estado por varios años. Esto nos llevó a pensar que antígenos introducidos dentro de las partículas de poliedra podrían mantener sus propiedades funcionales por años, pudiendo ser utilizados como vacunas que rompen con el paradigma de la cadena fría y la vida de anaquel limitada a meses.

Los resultados obtenidos en esta segunda parte muestran que los antígenos fusionados a la poliedrina y contenidos dentro de la poliedra, son capaces de generar una respuesta inmune protectora sin la necesidad del uso de adyuvantes en la vacunación. Lo anterior demuestra que la poliedra, además de proteger los antígenos y permitir mantenerlos a temperatura ambiente por años, tiene propiedades adyuvantes útiles en vacunación.

Abstract

The Baculoviridae family is formed by 4 genera comprising a total of 47 species of viruses that selectively infect various types of insects.

One of the species of baculovirus most studied to date is undoubtedly *Autographa californica*, MNPV which infects specifically lepidopteran. This virus has been used since the late 80s, in combination with the system of cultured insect cells, as an efficient and powerful expression system for recombinant proteins. Currently the expression system in insect cells mediated by these viruses is widely used for the production of many recombinant proteins to be used in particular experiments and for production of recombinant proteins for human and veterinary medicine. The modified baculoviruses have also been used as biopesticides and there are many studies where they are used as transduction systems for gene therapies to correct genetic problems or cancer.

AcMNP belongs to the group of viruses known as nucleopolyhedrovirus, ie, viruses occluded in protein crystals within the nucleus of infected cells. Therefore, this virus has two phenotypes: the free virion and the one entrapped within a protein matrix consisting mainly of the polyhedrin protein. This protein particle known as polyhedra contains within hundreds of viruses. Free virus is responsible in nature for cell to cell infection in the larvae. The polyhedra containing occluded viruses are released into the environment, after free viruses lyse all cells when the larva is virtually liquefied. In the occluded form, the virus can survive in the environment for years. In recent decades methodologies have been developed for incorporation of different peptides and proteins in these particles and use them as a biomaterial for the release of biomaterials, purification of recombinant proteins, etc. However, the mechanism by which the polyhedrin is capable of forming the polyhedral is unknown until today. It is noteworthy that the production of the polyhedral is a very robust mechanism, the nucleus of infected cells contains a lot of polyhedras, all with the same geometry and size.

The first aim of this study was to identify the mechanism by which the polyhedrin produces polyhedra. We follow the simplest hypothesis: the polyhedrin is a peptide with self-assembly properties, allowing to its assemble into polyhedra crystals. To achieve this goal we produced various fragments of the polyhedrin and merge to green fluorescent protein (EGFP) in order to perform structural studies by confocal and electron microscopy. The selection of fragments to be produced was conducted through an extensive analysis of secondary and tertiary structure in silico and directed to predict which were the smallest peptides with the capacity to auto assemble. This was done by seeking beta-sheet structures, which serve as aggregation point for other peptides with known self assemble activity such as the beta amyloid peptide responsible for Alzheimer's disease.

In this study we found that the self-aggregation properties were located towards the amino terminal fragment of the polyhedrin protein. The first fragment to be identified corresponded to the sequence 5' of the polyhedrin protein from amino acids 1-110. In this sequence there are immersed two repeated motifs, each of them formed by two beta-sheet strands followed by an alpha helix (the first sequence from amino acids 1-58, and the second one from amino acids 58-110). Subsequent studies with each of these peptides individually, showed that both fragments (1-58 and 58-110) had the property for self-aggregation.

The second objective involved to clone one fragments of each of the glycoproteins, gB, gC and gD from the Aujeszky virus to polyhedrin peptide 1-110 (PH₍₁₋₁₁₀₎) and produce polyhedras to be used as vaccines carriers against the disease. The hypothesis that supported the second part of the work was based on that polyhedra is able to keep baculovirus in good condition for years. This led us to think that antigens introduced into polyhedra particles could also be maintained for years with their antigenic properties for long

time and then could be used as stable vaccines and then breaking the paradigm of the cold chain and life limited shelf for months of the actual vaccines.

The results obtained in this second part shown that antigens fused to the polyhedrin and contained within the polyhedra, were capable of generating a protective response without the need to use adjuvant in vaccination. This result showed that the polyhedra in addition to be able to protect antigens from degradation, and allow keep them at room temperature for years, it has adjuvant properties very important in vaccination.

Introducción

El creciente interés en la producción de proteínas recombinantes ha llevado al desarrollo de diversos sistemas de expresión de proteínas. Uno de los primeros sistemas desarrollados y aún uno de los más utilizados es el de la bacteria *E. coli*, creado hace más de dos décadas. Aunque éste bien establecido sistema tiene una larga historia en la producción de muchas proteínas recombinantes, y, a pesar de sus ventajas como son los cortos tiempos de incubación, fácil manipulación genética y bajos costos (Assenberg R., *et al.* 2013, Rosano GL., *et al.*, 2014), la expresión en bacterias tiene varios problemas, el principal es que las proteínas en las bacterias no son glicosiladas.

La falta de glicosilación de las proteínas recombinantes expresadas en bacteria ha llevado a la búsqueda de sistemas alternativos de expresión, debido a que la glicosilación de muchas proteínas es vital para mantener su función (Aydin H., *et al.*, 2012, Assenberg R., *et al.*, 2013). Además la presencia de endotoxinas en las muestras preparadas en bacterias es otro de los inconvenientes del uso de este sistema de expresión (Wicks IP., *et al.*, 1995). Con el fin de resolver estos problemas del sistema de expresión bacteriano, se han desarrollado métodos de expresión de proteínas recombinantes en levaduras, células de insecto y células de mamífero (Fernández FJ. y Vega MC., 2013).

El sistema de expresión en células de insecto, basado en la infección de estas células por baculovirus recombinantes que llevan en su genoma el gen de interés, al ser un sistema eucarionte, lo convierte en un sistema ideal para la producción de proteínas para uso biotecnológico. Las proteínas que se han expresado en este sistema presentan glicosilaciones (van Oers MM., 2011), que si bien no son similares a las producidas en células de mamífero, son suficientes para sustentar su actividad biológica (Shi X. y Jarvis DL., 2007).

Otra de las características importantes del sistema de expresión en células de insecto es que al ser un sistema viral replicativo, la cantidad de proteína que suele

obtenerse es cientos e incluso, miles de veces mayor a la obtenida en células de mamífero mediante la transfección de plásmidos. Hoy en día una varias vacunas para uso humano y animal son producidas en células de insecto mediante el sistema de baculovirus recombinantes, así como una inmunoterapia contra cáncer de próstata y una terapia génica (van Oers MM., Pijlman GP. y Vlak JM., 2015).

Sistema de expresión en células de insecto mediante baculovirus recombinantes.

El desarrollo de un sistema viral de expresión de proteínas en células de insecto ha generado un gran avance en la producción de proteínas recombinantes, tanto para uso en los laboratorios de Investigación, como para la producción de proteínas para uso comercial, ya sea para el tratamiento de algunas enfermedades, o para su uso en vacunas, tanto de origen y aplicación en medicina humana o veterinaria.

Las primeras proteínas expresadas en este sistema fueron la beta-galactosidasa por el grupo de L. K. Miller (Pennock GD., *et al.*, 1984.) e Interferón beta humano por G. Smith y D. L. Summers (Smith GE., *et al.*, 1983), lo que marcó el inicio de una nueva era en la producción de proteínas recombinantes en un sistema de expresión eucarionte.

Los primeros sistemas de expresión por baculovirus fueron diseñados para que la proteína fuera expresada bajo el promotor de poliedrina, y la recombinación viral se llevaba a cabo usando el virus silvestre, por lo que el aislamiento de placas virales era arduo y tedioso. A partir de su comercialización y a la fecha, este sistema de expresión ha tenido grandes avances, y se pueden encontrar en el mercado metodologías donde la recombinación se hace en el tubo de ensayo, con genes de resistencia a antibióticos que facilitan la purificación de los virus recombinantes, así como el uso de banderas o etiquetas para la fácil purificación de las proteínas expresadas (Buchs M., *et al.*, 2009).

Más aún, las células de insecto donde se producen estas proteínas han sido modificadas para expresar una mayor cantidad de proteína y para que las modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, sean similares a las llevadas por las células de mamífero (Shi X. y Jarvis DL., 2007, Contreras-Gómez A., *et al.*, 2014). Los cultivos de células de insecto han sido adecuados para crecer en suspensión y en ausencia de suero fetal bovino, lo cual ha permitido producir

proteínas recombinantes libres de los factores tróficos normalmente presentes en el suero de origen animal (van Oers MM., 2011, Contreras-Gómez A., *et al.*, 2014).

Los avances que se han logrado con el desarrollo de esta tecnología han avanzado de la mano con el conocimiento de la biología de estos virus. La biogénesis de los baculovirus es muy compleja porque, estos virus poseen un genoma de alrededor de 140 kilobases (kb). Los baculovirus se ensamblan en el núcleo de las células infectadas y tienen dos formas principales: los virus libres y los ocluidos dentro de un cristal proteico formado mayoritariamente por la proteína poliedrina. Este cristal es llamado poliedra por su forma.

El desarrollo de proteínas recombinantes en el sistema de vectores de expresión por baculovirus (Baculovirus Expression Vector System, BEVS), ha sido llevado a cabo de manera satisfactoria para el tratamiento de enfermedades como cáncer, esclerosis múltiple, problemas en el crecimiento y desarrollo, así como en la producción de varias vacunas, a través de la expresión de antígenos solubles, o de proteínas que se auto-ensamblan, las llamadas partículas tipo virus (VLPs, Virus-like-particles) en diferentes sistemas de expresión (Papilomavirus e influenza; Srinivasan A., *et al.*, 2014, Tan M. y Jiang X., 2014, Chroboczek J., *et al.*, 2014, Jain NK., *et al.*, 2014). Muchas de ellas, han sido aprobadas por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA, Food and Drug Administration, EUA), que se encarga de regular los productos medicinales comercializados en los EUA, y que se aplica de base en muchos países para la distribución de estos productos. La calidad de las proteínas producidas en el sistema BEVS, además de sus bajos costos de producción, lo hacen por lo tanto, hoy en día, un sistema importante en el desarrollo y producción de diversos fármacos y vacunas.

Los baculovirus

Los baculovirus son virus envueltos con forma alargada que infectan principalmente artrópodos del orden *Lepidoptera* (mariposas y larvas), *Hymenoptera* (moscas) y Díptera (moscas y mosquitos). Se agrupan dentro de la familia *Baculoviridae* (Blissard GW. y Rohrmann GF., 1990, Herniou EA. y Jehle JA., 2007). Su nombre proviene de las primeras observaciones del virus mediante microscopía electrónica, ya que el virus tiene forma de bastón (en latín *baculum*).

De acuerdo al Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses), en su ratificación del 2014, esta familia está a la fecha clasificada en cuatro géneros de acuerdo al animal que infectan, los *Alphabaculovirus* (nucleopoliedrovirus (NPVs, que infectan lepidópteros), con 32 especies, los *Betabaculovirus* (granulovirus (GVs, que infectan lepidópteros), con 14 especies, los *Deltabaculovirus* (NPVs, que infectan himenópteros), 1 sola especie y los *Gammabaculovirus* (NPVs, que infectan dípteros) con 2 especies conocidas ([ictv.org/virus taxonomy.asp](http://ictv.org/virus-taxonomy.asp), Jehle JA., *et al.*, 2006).

El genoma de estos virus es un ADN circular de doble cadena de entre 80 y 180 kb, (Herniou EA., *et al* 2003), y una de sus principales características es que estos virus se ocluyen en una matriz proteica, que por su forma se le ha denominado poliedra y por su función, cuerpos de oclusión (Smith GE. y Summers MD., 1974, Blissard GW. y Rohrmann GF., 1990, van Oers MM. y Vlak JM., 2007). Las primeras clasificaciones de estos virus estaban basadas en el tipo de proteína que compone a estos cuerpos de oclusión, en el caso de los GVs, la matriz proteica está formada por una proteína denominada granulina, mientras que en los NPVs, por poliedrina. Otra característica que se ha tomado en cuenta para su clasificación es el número de nucleocápsides (NCs) por envoltura, así, los granulovirus contienen solo una, mientras que los nucleopoliedrovirus pueden tener una sola (SNPV, single NPVs) o varias de ellas (Fig. 1) (MNPV, multiple NPVs) (Summers MD. y Smith GE., 1975-1976, Lange M., *et al.*, 2004).

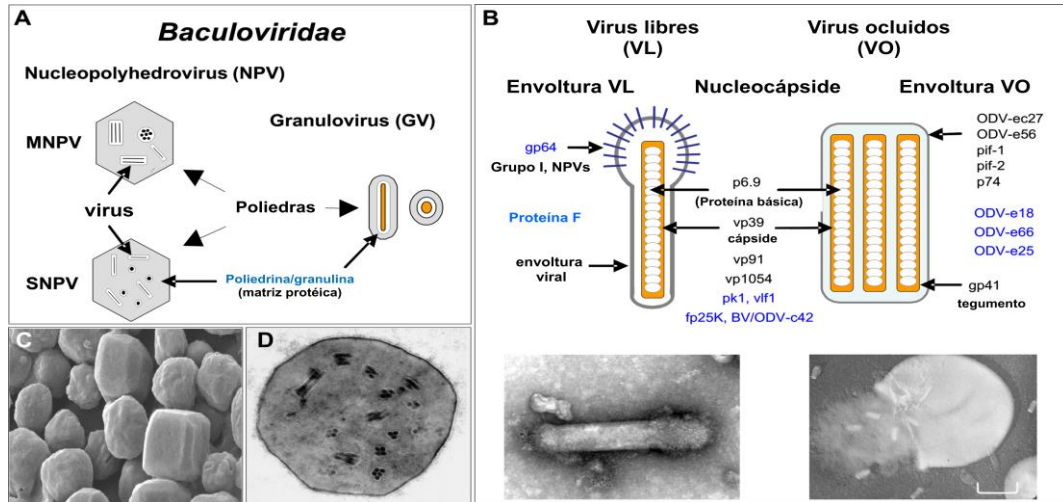


Fig.1. Los diferentes fenotipos de los baculovirus. A. Dentro de la familia Baculoviridae, hay 4 géneros, los cuáles se caracterizan por la formación de partículas cristalinas o poliedras en el núcleo de las células donde los virus quedan “ocuidos” o inmersos en ellas. Las poliedras de los nucleopoliedrovirus (NPVs) están formadas principalmente por la poliedrina y cientos de virus ya sea individualmente (SNPVs) o agrupados en paquetes (MNPVs) quedan ocuidos en ellas. Las poliedras de los granulovirus están formadas por la proteína granulina y solo se encuentra un virus en cada poliedra. B. En la infección por baculovirus, se pueden producir virus libres (VL), o virus ocuidos (VO), es decir, aquellos que quedan dentro de las poliedras. C. Fotografía de microscopía electrónica de barrido de granulovirus. D. Fotografía de microscopía electrónica de transferencia de un corte mostrando los MNPV. (Modificado de: Van Oers and Vlak (2007), Current Drug Targets 8, 1051-68, <http://www.wageningenur.nl/en/Expertise-Services/Chair-groups/Plant-Sciences/Laboratory-of-Virology/Research/Biology-and-Biotechnology-of-Baculoviruses.htm>).

Las poliedras están formadas en su mayor parte por una proteína de aproximadamente 29 kiloDaltones (kDa) llamada poliedrina, codificada en el genoma viral la cual se sintetiza en la fase tardía de infección. Se ha descrito que esta proteína tiene una señal de localización nuclear entre los aminoácidos 32-35 (KRKK) (Jarvis DL., *et al.*, 1991), y su tamaño varía entre los diferentes géneros. En los alphabaculovirus la poliedrina forma partículas de entre 0.15 y 3 μm , mientras que las especies de los betabaculovirus se forman OBs pequeños (de 0.1 a 0.5 μm de diámetro).

Una de las especies más estudiadas a nivel molecular ha sido el virus tipo *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) del género alphabaculovirus. Este virus fue aislado inicialmente del gusano de la alfalfa, por lo

que lleva su nombre. Su genoma es de 134 kb el cual codifica para 154 proteínas. Un dato histórico interesante es que otro virus de este género, *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV), infecta al gusano de la seda, y lo convirtió en un blanco de estudio, ya que produce pérdidas de millones de dólares anuales para la industria textil. Los primeros reportes de la infección aparecen en textos chinos que datan del siglo XVII, sin embargo se desconocía que la afección del gusano se debía a la infección por un virus.

En 1983, Lois Miller trabajó y desarrolló un sistema de expresión de proteínas recombinantes basado en baculovirus, utilizando la especie prototipo AcMNPV, tomando en consideración la alta expresión a partir de un promotor fuerte, el del gen de la poliedrina (Pennock GD., *et al.*, 1984) Son sin embargo, Gale Smith y Max Summers quienes publican por primera vez el uso este sistema con la expresión de Interferón beta humano (Smith GE., *et al.* 1983). Cabe mencionar, que nuestro grupo de trabajo también fue pionero en el uso del sistema de expresión de baculovirus, para 1987 habíamos desarrollado nuestro propio sistema de expresión basado en la recombinación del genoma del virus de AcMNPV con un vector de transferencia que confería resistencia a ampicilina, con el fin de aislar recombinantes positivas.

Ciclo de vida de los baculovirus y sus fenotipos

En el ciclo de vida de los baculovirus se pueden observar dos fenotipos, los virus libres, responsables de la infección célula a célula, y los viriones ocluidos, responsables de la transmisión vertical de insecto a insecto (Fig. 2).

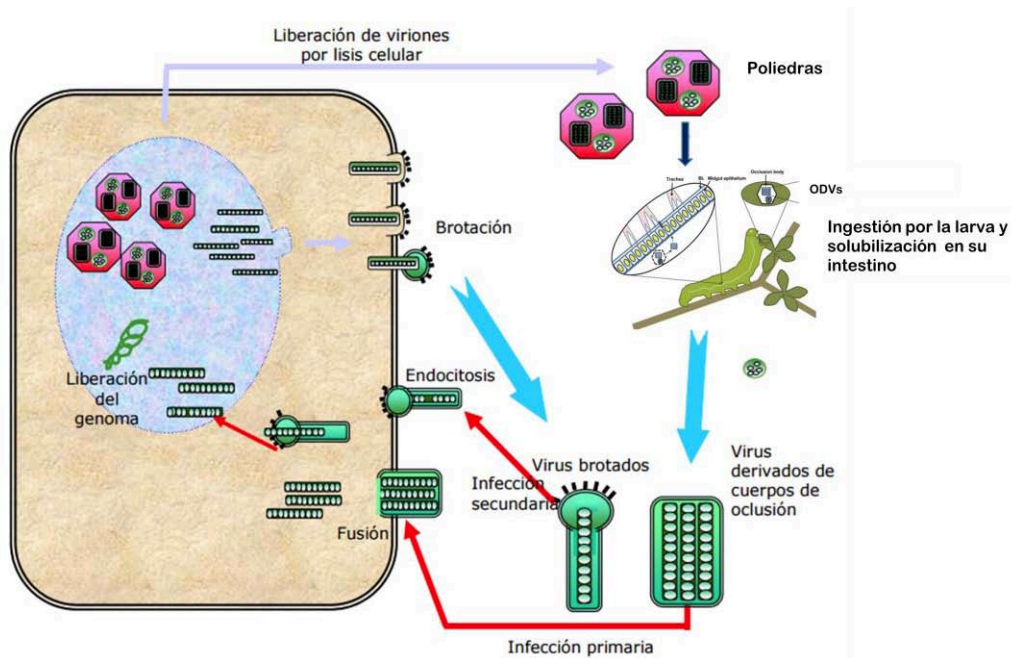


Fig. 2. Ciclo de vida de los baculovirus, infección primaria y secundaria. En la infección primaria, las poliedras liberadas por la disolución de las larvas infectadas, son ingeridas por otras larvas y en el intestino son solubilizadas debido al alto pH presente en este sitio e infectan a estas células, donde se replican, para dar lugar a la infección secundaria. Los virus se replican y salen de la célula para infectar a las células vecinas y a todas las células de la larva. En una etapa tardía, los virus son “ocluídos” en partículas llamadas poliedros, las cuáles son liberadas cuando las larvas son solubilizadas por la infección viral.

Las poliedras liberadas en las plantas por una larva infectada, contienen los viriones ocluidos. Cuando las poliedras son ingeridas por el insecto, y llegan al tracto digestivo donde el pH es muy básico (10.5-11) son desensambladas, y los virus son liberados en la luz del tracto intestinal. Estos virus, interactúan a través de GP64, una proteína estructural de la envoltura del virus, con el colesterol presente en las células epiteliales del intestino medio. Esta interacción permite la fusión de la cápside viral y la internalización del genoma en la célula hospedera. Durante años permaneció

como un enigma el mecanismo de ingreso del baculovirus a las células epiteliales del intestino del insecto, no fue sino hasta 2013 que nuestro grupo de trabajo dilucidó el mecanismo molecular de ingreso a la célula (Luz-Madrigal A., *et al.*, 2013). La unión de GP64 a colesterol se da a partir de un dominio de unión a colesterol/esteroles presente en el sitio de fusión de la proteína de la cápside GP64.

Los virus derivados de las poliedras (ODVs) presentan una composición proteica diferente a los viriones libres (budded virus, BVs). No obstante, se ha descrito que ambos contienen más de 30 proteínas necesarias para la replicación inmediata del virus en la célula, como son ADN polimerasa, lef1 (late expression factors), lef3, helicasa, y el factor de transcripción temprana IE-1, formando parte de un sistema de optimización de la infección primaria (Braunagel SC. y Summers MD., 1994., Braunagel SC., *et al.*, 2003). La diferencia en las proteínas presentes en los ODVs versus los BVs se da durante la salida de los BVs a través de la membrana plasmática de la célula hospedera, donde adquieren la envoltura (se llevan una fracción de la membrana plasmática de la célula hospedera) y las proteínas presentes en ella, mientras que los ODVs son ocluidos en las poliedras en el núcleo de las células infectadas y nunca están en contacto con la membrana plasmática del hospedero. El mecanismo de sorteo que decide que un virus viaje a la membrana plasmática y sea liberado como virión libre, o bien que quede ocluido en la poliedra dentro del núcleo celular permanece aún desconocido.

Una vez dentro de las células, las NCs son tomadas por los endosomas, de donde escapan mediante la fusión de GP64 con el endosoma, posteriormente los NCs son transportados al núcleo celular, por un mecanismo aún no claro, el cual involucra el transporte mediado por filamentos de actina. Una vez en el núcleo, la transcripción viral es iniciada utilizando la maquinaria de la célula. Dependiendo de los genes expresados, el ciclo de infección se ha dividido en 4 fases: Inmediatamente-temprana, temprana, tardía y muy tardía. La replicación viral ocurre aproximadamente a las 6 horas postinfección, considerada dentro de la fase tardía,

así como la síntesis de otras proteínas estructurales como son las proteínas de la cápside y glicoproteínas de la envoltura viral.

Las proteínas expresadas en la fase muy tardía son aquellas que contribuyen a la formación de los OBs o poliedras, como son la proteína poliedrina y p10, aunque esta última no se encuentra formando parte de las poliedras. Estas dos proteínas no son necesarias para el ensamblado de los BVs, y pueden ser eliminadas del genoma sin afectar la producción de baculovirus libres. Las poliedras están también recubiertas por una membrana rica en carbohidratos (PEP, polyhedral envelope proteína), formada por la proteína pp34 (Whitt MA. y Manning JS., 1988, Gombart AF., *et al.* 1989). Los promotores de estas dos proteínas, poliedrina y p10 son considerados eficientes o fuertes y combinados llegan a constituir hasta el 50% de la proteína presente en las células infectadas (Chaabihi H., *et al.*, 1997, Kelly BJ., *et al.*, 2007). Es por esta razón que el promotor de poliedrina ha sido clásicamente utilizado para la expresión de proteínas recombinantes en el sistema de expresión de baculovirus.

Las poliedras

Las poliedras, también conocidas como cuerpos de oclusión (del inglés “occlusion bodies” o OBs), han dado a los baculovirus, evolutivamente hablando, una gran ventaja, su función principal ha sido estabilizar a los viriones en el medio ambiente, protegiendo el ADN viral y a los componentes estructurales del virus de los rayos ultravioleta, del calor y de otras condiciones ambientales. Estas partículas tienen tamaños que varían desde 0.5 a 15 μM de diámetro y pueden tener diferentes formas, dodecaedro, tetraedro, cubos o poliedros irregulares, dependiendo de la especie de virus y del huésped que estén infectando (Woo SD., *et al.*, 1998).

La matriz de la poliedras está formada por una sola proteína viral de aproximadamente 29 kDa, la poliedrina. Es una de las proteínas mas estudiadas de los baculovirus, debido a que se expresa en grandes cantidades, llegando a acumularse durante la fase tardía de infección hasta 1 mg en $1-2 \times 10^6$ células infectadas, constituyendo entre 30-50% de la proteína total de la célula hospedera (Rohrmann GF., 1986).

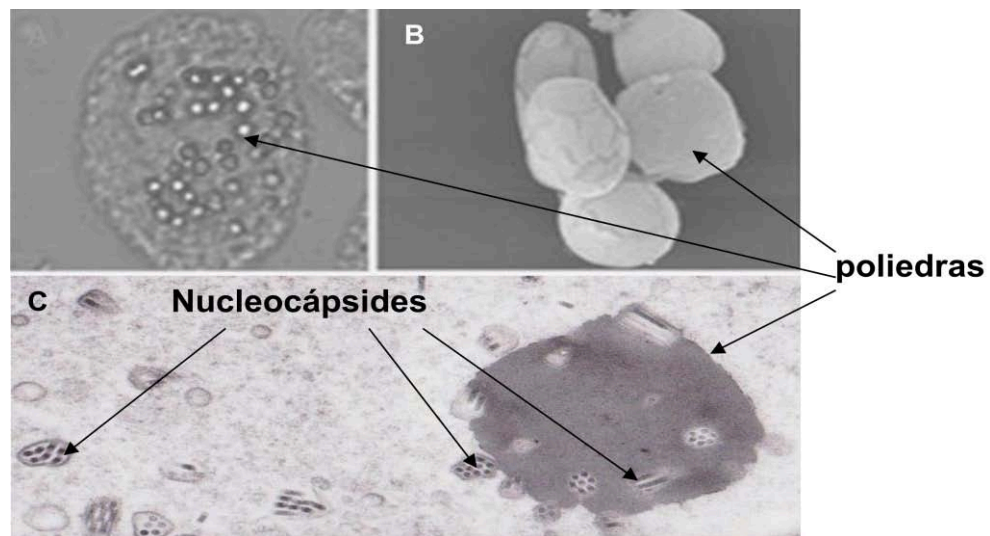


Fig. 3. Poliedras: Su localización nuclear y su alta estabilidad parecen contribuir significativamente a su abundancia. A. Célula SF9 infectada con baculovirus WT, B. Fotografía de microscopía electrónica de barrido de poliedras WT purificadas y C,

microscopía electrónica de transmisión mostrando el corte de una poliedra y baculovirus ocluidos.

Las poliedras de los baculovirus de AcMNPV comparten características estructurales con otro grupo de virus no relacionados, los cipo virus que infectan larvas de insecto (virus de RNA de doble cadena, Familia *Reoviridae*, Género *Cypovirus*) (Coulibaly F., *et al.*, 2007, Coulibaly F., *et al.*, 2009).

Las poliedrinas de estos dos grupos de virus, no comparten ninguna homología en su secuencia de aminoácidos, sin embargo, la estructura cristalina de las poliedras de ambos, es indistinguible en cuanto a tamaño y geometría, mostrando que estas propiedades conservadas han sido retenidas en la naturaleza para el propósito específico de conservar y preservar a estos virus (Coulibaly F., *et al.*, 2007, Coulibaly F., *et al.*, 2009, Ji X., *et al.*, 2010).

La estructura del cristal de ambas poliedras AcMNPV y *Bombix mori* CPV (BmCPV) ha sido determinada y se encontró que la poliedrina en ambos casos forma trímeros, con un dominio nuclear de cadenas β en sándwich, pero se empaquetan de manera diferente, las hélices amino (N)- y carboxi (C)- terminales se proyectan hacia fuera, pero su topología es diferente y las hélices interactúan de manera diferente (Chiu E., *et al.*, 2012). En los baculovirus AcMNPV, los puentes disulfuro y los dominios N-terminales se interconectan y los brazos c-terminales se entrelazan para darle una alta estabilidad a las poliedras. Resulta un fenómeno muy interesante cómo dos proteínas con secuencias completamente diferentes pueden producir estructuras cristalinas prácticamente idénticas. Nuestro grupo de trabajo lleva más de 20 años tratando de entender este interesante y complejo fenómeno de estructuras proteicas. Parte del trabajo de la presente tesis ha permitido dilucidar algunos aspectos estructurales que explican cómo se forma el cristal de la poliedra, su geometría y tamaño.

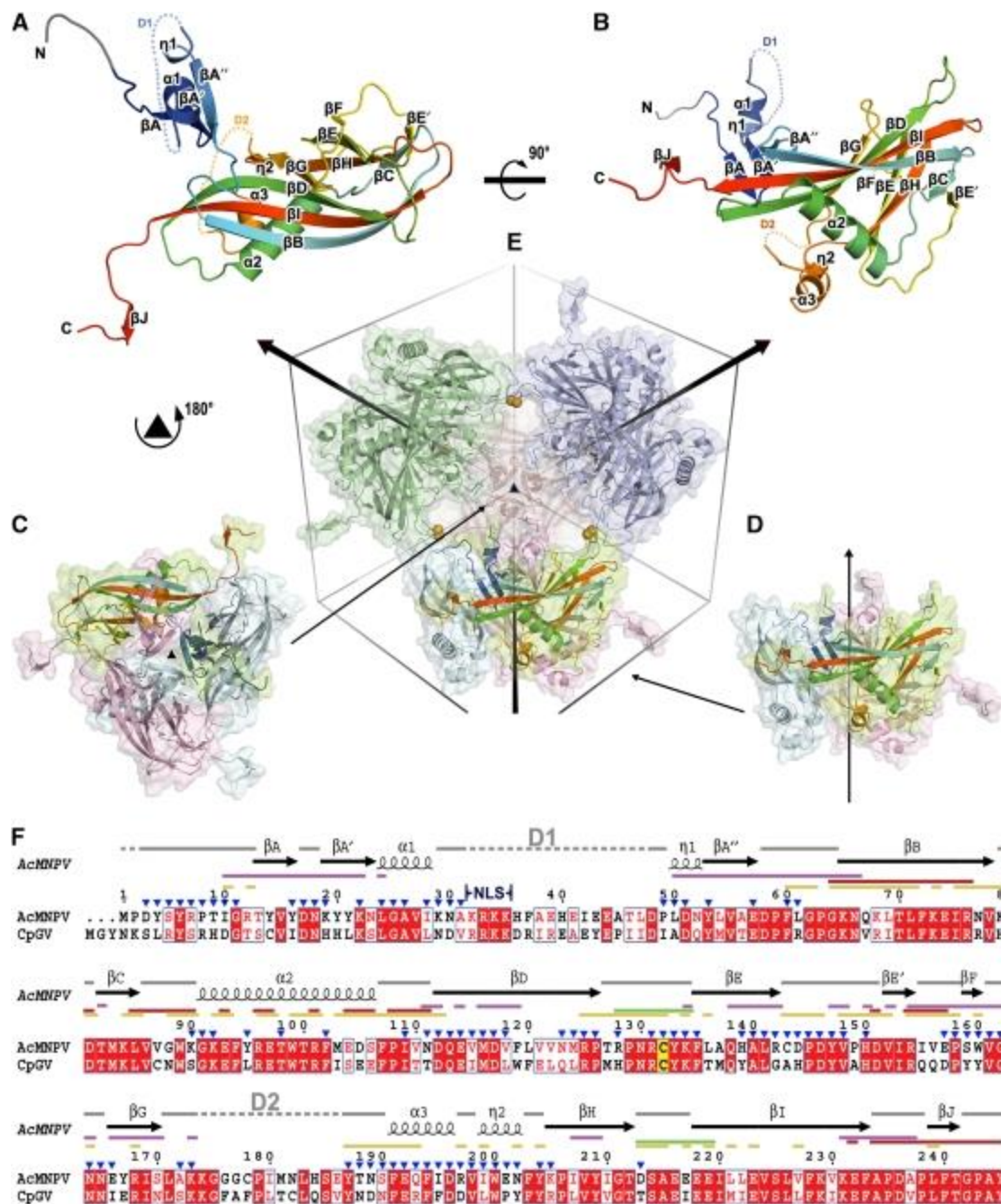


Fig. 4. Estructura de la poliedra. A, B Representación de La estructura de la poliedrina de AcMNPV en dos vistas ortogonales, se muestran los dominios en diferentes colores, de azul en el extremo N -terminal a rojo en el extremo C -terminal. Residuos 3-7, que fueron construidos como poli -ala se dibujan en gris. C, D Representaciones en dos orientaciones de trímeros de poliedrina alineados a (E). Las subunidades están coloreadas en diferente color y una de ellas está coloreada como en A. E, Unidad dodecamérica de cuatro trímeros unidos por enlaces disulfuro (representados como esferas de color naranja). F, Alineamiento de la secuencia de aminoácidos para mostrar la conservación de la secuencia de aa de la

proteína entre las especie tipo de los alphabaculovirus (AcMNPV) y de los betabaculovirus (CpGV). Los residuos conservados están dibujados en cajas rojas y los residuos similares en tinta roja. La estructura secundaria asignada para AcMNPV está dibujada arriba de la secuencia de aa. La cisteína conservada está remarcada en amarillo (Ji X., *et al.*EMBO J. 2010, 29: 505–14).

Es muy interesante ver que la estructura de las poliedras de estas dos familias de virus, comparten la simetría I23 y la dimensión de la unidad mínima del cristal y lo más importante la función es la misma, sin embargo, la conclusión ha sido que no hay evidencia estructural para concluir que tengan un origen evolutivo común.

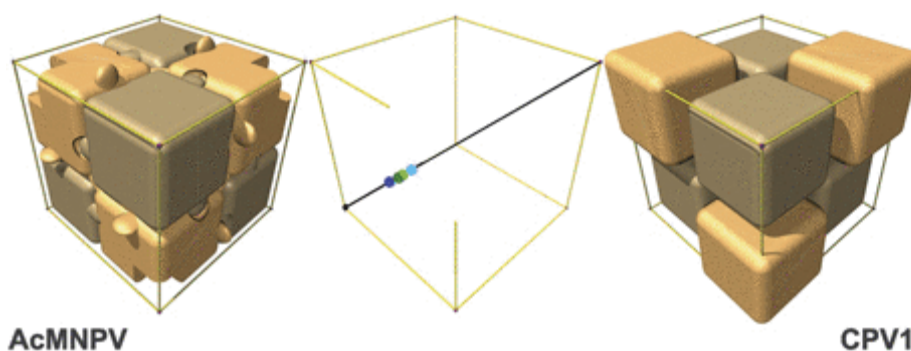


Fig. 5. Representación del empaquetamiento de los trómeros de poliedrina de AcMNPV y CPV en sus unidades celulares (Ji X., *et al.* EMBO J. 2010, 29: 505–14).

Todos estos hallazgos han permitido determinar los aminoácidos importantes en la formación de las partículas y determinar cuáles son los responsables de la forma y estructura de las poliedras.

Basados en estos hallazgos, Ijiri H., *et al.* 2009, pudieron incorporar varias proteínas en la poliedra de BmCPV por la fusión de proteínas modelo al fragmento amino-terminal H1 (primeros 30 aa) de la poliedrina. Sin embargo, la poliedra canónica se forma únicamente al combinar la proteína fusionada con la secuencia completa de la poliedrina silvestre (WT).

La coexpresión de proteínas fusionadas al fragmento H1 y poliedrina WT ha sido usada como un mecanismo de incorporación de proteínas exógenas a la poliedra,

para uso como un sistema de andamiaje, como soporte para expresar y facilitar la purificación de proteínas de uso biofarmacéutico (Nishishita N., *et al.*, 2011, Matsumoto G., *et al.*, 2012). Una estrategia similar ha sido también desarrollada para la expresión de proteínas recombinantes en el baculovirus de *Bombix mori*, *BmNPV* (Furuta T., *et al.*, 2010, Lee KS., *et al.*, 2012, Chen L., *et al.*, 2013). Las poliedras generadas por ambas familias de virus, han sido postuladas para ser usadas en diferentes aplicaciones biotecnológicas hasta ahora en el campo de la Biomedicina.

Biomateriales y biopolímeros

En las últimas décadas, el estudio de los biomateriales se ha desarrollado aceleradamente, dando origen a la Ciencia en Biomateriales. Durante los últimos 50 años, se ha llevado a cabo mucha investigación y se han hecho grandes inversiones tanto por la industria privada como por el sector académico para el desarrollo y aplicación de biomateriales novedosos.

Un biomaterial se define como cualquier sustancia que ha sido obtenida de algún sistema biológico y que tenga utilidad en medicina o biotecnología. Por lo tanto, se involucran con esta nueva ciencia elementos de Medicina, Biología, Química, e Ingeniería de tejidos, entre otras disciplinas.

Una forma de clasificar a los biomateriales que se usan actualmente puede ser por su origen y así tenemos a materiales sintéticos y a los materiales naturales. Los materiales naturales han sido producidos 1) a partir de fuentes alimenticias, como almidón y celulosa 2) subproductos de la fermentación bacteriana como son el ácido poliláctico, succinato de polibutileno y polietileno, y 3) de otras fuentes naturales y entre los que están incluidos azúcares como el quitosano, ácidos nucleicos y proteínas como son la elastina, la seda, el colágeno, etc. (Babu RP., *et al.* 2013).

Algunas proteínas fibrilares como son colágena, keratina, elastina, o aquellas producidas de la lana, y la seda, constituyen un grupo de biomateriales conocidos como biopolímeros. Estas macromoléculas constituyen actualmente uno de los campos con mayor interés para el desarrollo de dispositivos terapéuticos, cardiovasculares, ortopédicos, oftálmicos y dentales, sustitutos de la piel, sistemas de liberación de fármacos y sensores con propósitos de diagnóstico.

Existe una creciente necesidad de producir biomateriales más seguros y de menor costo. El uso de sistemas de expresión de proteínas recombinantes permite que las proteínas purificadas sean más puras, libres de patógenos; se pueda asegurar

también su homogeneidad entre lote y lote y una productividad a gran escala con costos competitivos.

Nueva generación de vacunas: Antígenos y proteínas particuladas recombinantes

El desarrollo de las vacunas es ahora considerado como uno de los más grandes avances de la humanidad. Varias enfermedades han sido controladas y algunas de ellas incluso erradicadas. Y el gran avance en la esperanza de vida es debido al desarrollo de las vacunas.

En los estudios de Pasteur sobre la atenuación viral, descansa gran parte del éxito de la eficacia de las vacunas desarrolladas contra las infecciones virales. Sin embargo, el riesgo que existe sobre una posible reversión de estos virus ha sido siempre de considerable importancia. Uno de los siguientes pasos ha sido el desarrollo de vacunas subunitarias, proteínas virales expresadas en un sistema heterólogo, y aunque han sido efectivas para algunos patógenos, han resultado ser poco inmunogénicas, debido a la falta de las modificaciones postraduccionales como son glicosilación o plegamiento incorrecto de la proteína (cuando se producen en bacterias o sistemas de expresión basadas en procariontes).

Así, encontramos que la gran mayoría de las vacunas en uso actualmente, tanto para humanos como para uso veterinario, siguen estando basadas en los patógenos inactivados o atenuados. Es decir, tenemos un atraso de más de 200 años en vacunación. El hallazgo de que algunas proteínas virales purificadas pueden auto-agregarse, mimetizando la estructura de algunos virus y preservando la conformación antigénica nativa de las proteínas virales ha llevado al desarrollo de una nueva clase de vacunas seguras y efectivas conocidas como partículas virales similares a virus (virus-like particles, VLPs).

Desarrollo de nuevos adyuvantes

Los adyuvantes están definidos como compuestos que potencian la respuesta inmunológica cuando son administrados con un antígeno. Estos materiales, ayudan a aumentar la respuesta inmune de un antígeno usado en una vacuna modulando la respuesta innata, facilitando su transporte y presentación a las células del sistema inmune. Una de las características más importantes, además de su eficacia es su seguridad, esto es, que no tenga efectos secundarios.

Los adyuvantes funcionan directamente o indirectamente sobre las células presentadoras de antígeno (APCs, Antigen Presenting Cells), como son las células dendríticas uniéndose en su mayoría a los receptores moleculares asociados a patógenos con el reconocimiento de patógenos conocidos como PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), iniciando así las vías de señalización. Los adyuvantes, inducen también las vías de señalización proinflamatorias y promueven infiltración celular, presentación del antígeno y maduración de la respuesta efectora.

Los adyuvantes en uso o en desarrollo a la fecha se pueden dividir en inorgánicos, como las sales minerales (hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio), y orgánicos como son las emulsiones de aceite, algunos tipos de nanopartículas basadas en proteínas o en algún otro material, oligodeoxinucleótidos sintéticos (CpG), entre otros. Son muy pocos los adyuvantes aprobados para el uso en vacunas, así, en las de uso en humanos solo han sido aprobadas las sales de hidróxido de aluminio, mientras que en las de uso en veterinaria son más comunes las emulsiones aceite-agua. Al día de hoy, diferentes laboratorios siguen estudiando y desarrollando nuevos compuestos que puedan servir como adyuvantes.

Poliedras, partículas biodegradables de origen natural como sistema de expresión y presentación de antígenos y proteínas recombinantes.

A pesar de que las vacunas en uso actualmente han sido efectivas en la prevención y erradicación de enfermedades, existe una necesidad constante en el desarrollo de vacunas, y sus adyuvantes que sean más seguros, con mejores formulaciones, y sobre todo en contra de patógenos que no han podido ser desarrolladas. De manera importante, es necesario el desarrollo de vacunas que rompan con el paradigma de la cadena fría y que presenten vidas de anaquel de años. Ninguna vacuna existente a la fecha cumple con estos requisitos.

La nueva generación de vacunas recombinantes, basadas algunas de ellas en nuevos biomateriales que son biodegradables, poliméricas y de autoensamblaje, han mostrado tener las propiedades deseadas que además de ser seguras, son capaces de generar protección de largo plazo (Boraschi D. e Italiani P., 2014, Qasim M., *et al.*, 2014, Seth A., Oh DB., y Lim YT., 2015).

Debido a que las poliedras son partículas formadas por una proteína (poliedrina), de origen natural y biodegradables, son buenos candidatos para expresar proteínas recombinantes y pueden ser usadas como acarreadores de antígenos en vacunas de nueva generación. Esta es la propuesta del presente trabajo.

Las poliedras de AcMNPV tiene además varias características que las hacen ideales para la expresión de proteínas recombinantes:

- ✓ Son partículas de alrededor de 1 μm de diámetro que pueden ser purificadas fácilmente por centrifugación
- ✓ Son producidas en un sistema viral muy robusto (baculovirus), por lo que puede obtenerse un alto rendimiento en la producción de la proteína recombinante
- ✓ Son producidas en un sistema eucarionte el cual produce modificaciones postraduccionales similares al mamífero

- ✓ Son estables a temperatura ambiente y pueden mantener estable la proteína recombinante que se introduzca en ellas por varios años a temperatura ambiente

El primer reto consistió en encontrar un mecanismo para introducir de forma selectiva y eficiente, péptidos o proteínas al cristal de poliedra. El primer acercamiento para obtener poliedras recombinantes fue llevado a cabo por el grupo de Je *et al.* usando la proteína verde fluorescente (GFP). Ellos lograron incorporar esta proteína dentro de la poliedra, fusionando la GFP al carboxilo terminal de la poliedrina. Sin embargo, la expresión de la proteína de fusión recombinante no formó poliedra, solo hasta que se coexpresó con la poliedrina WT (Je YH., *et al.*, 2003). Este resultado demostró que la fusión de proteínas a la poliedrina evita la formación de poliedras, pero el fenotipo puede ser rescatado por la coexpresión con poliedrina silvestre.

Posteriormente, Ijiri *et al.* incorporaron otras proteínas en las poliedras de BmCPV fusionadas a la poliedrina o a un fragmento conteniendo los primeros 30 aa de la poliedrina, el cual contiene una hélice α conocida como H1 (Ijiri H., *et al.*, 2009). Ya que este fragmento se proyecta hacia afuera de la proteína, se forma independientemente cuando la molécula se va doblando y parece interactuar con otras moléculas de poliedrina para formar la poliedra.

Recientemente, también se han obtenido poliedras recombinantes en BmNPV coexpresando la poliedrina silvestre y la proteína recombinante fusionada a un fragmento de 110 aa de la poliedrina (Lee KS., *et al.*, 2012, Chen LS., *et al.*, 2013). En el primer estudio, fusionan la proteína E2 de la cápside del virus de la fiebre porcina clásica (CSFV classical swine fever virus). La proteína recombinante fue incorporada a las poliedras, de donde fue recuperada y purificada por centrifugación y filtración (Lee KS., *et al.*, 2012). La proteína purificada fue entonces usada para inmunizar ratones y determinar la respuesta inmune a esta proteína. Los ratones tuvieron una buena respuesta por anticuerpos, y estos anticuerpos fueron capaces

de neutralizar a los CSFV, mostrando que es una forma fácil y económica de producir proteínas recombinantes para su uso como vacunas.

La enfermedad de Aujeszky

La enfermedad de Aujeszky es producida por un virus tipo herpes, y causa millones de pérdidas anuales en la industria porcina mexicana. Este virus, a pesar de ser un herpesvirus, ha sido clasificado dentro de una familia a la que no se ha sido asignada dentro de un orden. A partir de 1975 se le colocó dentro de la familia *Herpetoviridae*, dentro del género, *Herpesvirus* y el nombre que adquirió es Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus (ictv.org/virus_taxonomy.asp).

El DNA del virus de la enfermedad de Aujeszky (o PRV) está protegido por una cápside icosaédrica, la nucleocápside y ésta a su vez está embebida en una matriz proteica conocida como tegumento; finalmente el tegumento está recubierto por la envoltura, una bícapa lipídica que adquiere al salir de las células infectadas conteniendo además de proteínas de la célula huésped, varias glicoproteínas codificadas en el genoma viral (Pomeranz LE., *et al.*, 2005). Estas glicoproteínas le sirven al virus en la infección, en la salida de las células, así como en la dispersión de célula a célula. Estas glicoproteínas son reconocidas por el sistema inmune, generando anticuerpos neutralizantes contra el virus. Tres de estas glicoproteínas, la gB, la gC y la gD representan blancos importantes para la generación de una buena respuesta inmune contra el virus (Pomeranz LE., *et al.*, 2005). Nuevas estrategias basadas en el uso de estas glicoproteínas expresadas de manera recombinante como antígenos, se encuentran en desarrollo, ya que esto permitiría un mayor grado de seguridad, debido a que ya no se requeriría el uso de partículas virales para la preparación de vacunas contra este virus.

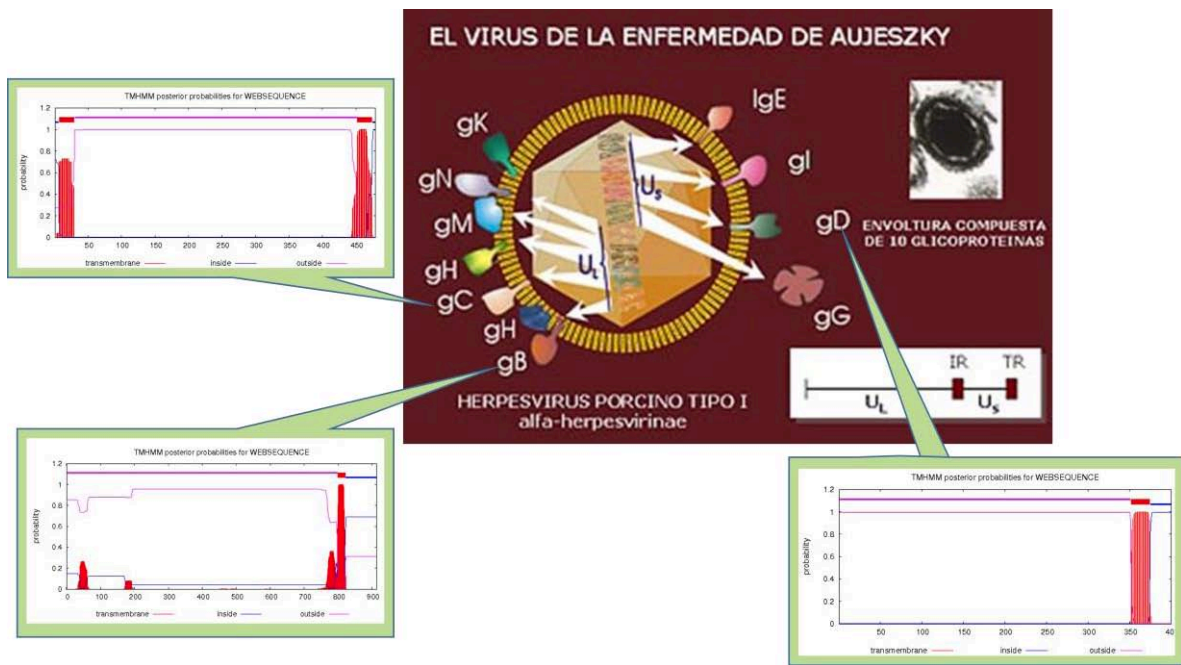


Fig. 6. Esquema y fotografía del virus de la enfermedad de Aujeszky: Glicoproteínas más abundantes presentes en la envoltura y estructura del genoma viral. Los recuadros muestran el perfil hidrofóbico de las 3 glicoproteínas involucradas en la respuesta inmune al virus usadas en este trabajo. Modificado de: Curso de infecciones porcinas: La enfermedad de Aujeszky, Arias M., Sierr MA., Sánchez-Vizcaíno JM., <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/2/etiologia.htm>.

Esta enfermedad aunque casi inocua para los cerdos adultos, tiene efecto en la producción porcina, al provocar pérdida de peso, abortos en las cerdas gestantes, y es letal para los lechones, de igual manera para otros mamíferos, como los conejos, los perros, ratas y ratones, pero no así para los humanos, donde no produce sintomatología alguna, ya que no son infectados por este virus (Pomeranz LE., *et al.*, 2005).

Estas características de la enfermedad la convirtieron en un modelo experimental muy interesante para nosotros útil para explorar una nueva generación de vacunas. Otra ventaja es que existen en el mercado alrededor de 4 vacunas diferentes para esta enfermedad, lo que nos brinda la posibilidad de realizar estudios comparativos con nuestra vacuna.

Se considera que los huéspedes no naturales del PRV como en el ratón, mueren en pocos días de encefalitis clásica por herpesvirus, definida como lesión necrotizante masiva. Parte del trabajo del presente proyecto fue el desarrollar un modelo de infección de Aujeszky en ratones de laboratorio, como bioensayo para la prueba de vacunas.

Justificación

Las poliedras de los baculovirus y de los cipoovirus son partículas de un tamaño aproximado de entre 1 y 2 μM , lo que permite su fácil separación de los restos celulares presentes en un lisado celular mediante centrifugación de relativamente baja velocidad. Estas partículas cristalinas están formadas por la asociación de miles de moléculas de poliedrina, una proteína codificada en el DNA viral y producida en muy altas cantidades debido a que contiene uno de los promotores virales más fuertes conocidos a la fecha.

La poliedrina ha sido usada para la fusión de diversas proteínas con la finalidad de incorporar la proteína exógena a las partículas y facilitar su purificación. Estos ensayos han sido realizados mediante fusiones aleatorias, tanto al amino como al carboxilo terminales de la poliedrina. Sin embargo, el mecanismo molecular que dirige el ensamblado de las proteínas de fusión (poliedrina-proteína de interés) se desconoce a la fecha. La poliedrina recombinante (fusionada a una proteína de interés) es capaz de incorporarse al cristal solo y cuando es coexpresada con la poliedrina silvestre. Las poliedras recombinantes han sido usadas como un sistema acarreador y presentador de diversas proteínas en diferentes sistemas biológicos, como son factores de crecimiento, inmunógenos para uso en vacunas, factores involucrados en el ciclo celular, entre otros.

Nuestro trabajo se basó inicialmente en encontrar el fragmento mínimo de la poliedrina que pudiera generar nanopartículas, sin la necesidad de coexpresarla con una copia de poliedrina silvestre. La intención de esta estrategia era doble: primero nos permitiría explorar el mecanismo por el cual se ensamblan estos cristales (identificando la secuencia mínima responsable por el autoagregamiento). En segundo lugar, al expresar únicamente un fragmento de poliedrina fusionada al antígeno de interés, permitiría tener un mayor control de la cantidad de antígeno usado para la inmunización (una vez iniciados los estudios inmunológicos en ratón). Lo anterior debido a que cuando se mezclan copias silvestres de poliedrina con

copias recombinantes, no es posible controlar la relación de silvestre:recombinante presente en las nanopartículas.

Hipótesis

- 1) La formación de poliedros de AcMNPV recombinantes, puede ser llevada a través de la fusión de la proteína de interés a los dominios de las cadenas beta plegadas presentes en la porción amino terminal de la poliedrina.
- 2) La inmunización con nanopartículas de poliedrina recombinantes conteniendo fragmentos de las proteínas gB, gC y gD del virus de Aujeszky, generará protección contra la enfermedad en un modelo murino.

Objetivo General

Conocer el fragmento mínimo de la poliedrina de AcMNPV necesario para la incorporación de una proteína exógena, para poder obtener poliedras recombinantes que puedan ser utilizadas como vacunas.

Objetivos específicos

- i. Hacer un análisis bioinformático de los fragmentos de la poliedrina de AcMNPV que pudieran estar involucrados en la formación de la poliedra o sitios de autoagregación, en base a su estructura secundaria.
- ii. Llevar a cabo la construcción de los plásmidos de transferencia del sistema de expresión de baculovirus (Bac-N-blue o Bac-to-bac) conteniendo la poliedrina WT, o diferentes fragmentos de esta proteína fusionados a la proteína verde fluorescente (EGFP) usada como reportero.
- iii. Generar los baculovirus conteniendo la poliedrina WT o fragmentos de esta proteína para producir poliedras recombinantes expresando la proteína EGFP.
- iv. Clonar un fragmento de cada una de las proteínas gB, gC y gD del virus de Aujeszky al plásmido conteniendo el fragmento amino terminal 1-110 de la poliedrina para producir poliedras que contengan estos antígenos.
- v. Inmunizar ratones BALB/c con las poliedras recombinantes conteniendo la PH₍₁₋₁₁₀₎-gB, la PH₍₁₋₁₁₀₎-gC, y la PH₍₁₋₁₁₀₎-gD y evaluar la capacidad protectora de estas partículas mediante un ensayo de reto con el virus de Aujeszky.

Material y Métodos

I. Líneas celulares de insecto y baculovirus

Para la producción y amplificación de los baculovirus, se utilizó la línea celular Sf9 (*Spodoptera frugiperda*), la cual se creció en medio Grace (Invitrogen, EUA) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (30 min a 56°C) (Wisent, Inc. Canadá), 1X yeastolate (Invitrogen, EUA) y 1X lactalbúmina (SIGMA, EUA) y 1X antibiótico-antimicótico (Invitrogen, EUA) conforme a métodos estandarizados. Para el cultivo en suspensión de estas células, se agregó además ácido plurónico F-68 a una concentración final de 0.1%, subcultivando las células cada 2 o 3 días.

Dos tipos de sistema de expresión de baculovirus fueron utilizados en el estudio para la construcción de los baculovirus recombinantes, el sistema Bac-N-blue (Invitrogen, EUA) y el Bac-to-bac (Invitrogen, EUA). El baculovirus WT se obtuvo de uno de los kits y todos ellos WT y recombinantes fueron propagados en las células SF9).

II. Construcción de baculovirus recombinantes

El gen completo de poliedrina fue obtenido del DNA purificado del baculovirus WT por amplificación por PCR usando los oligonucleótidos “Baculovirus Forward PCR Priming site” y “Baculovirus Reverse PCR Priming site” del sistema Bac-N-blue (Invitrogen, EUA) y clonado en el vector pDrive (Qiagen, Alemania). De ahí, fue digerido con EcoRI para clonarlo en marco de lectura abierto en el vector pEGFPC2 (Clontech, EUA). Este plásmido fue digerido con las enzimas de restricción NcoI y Sall para obtener el fragmento de DNA conteniendo el gen que codifica a la EGFP fusionado al gen que codifica para la poliedrina y ligado al vector de transferencia pBlueBac4.

Posteriormente se construyeron varios plásmidos siguiendo la misma estrategia de amplificación por PCR y clonación en pDrive, de los diferentes fragmentos del gen de poliedrina (Fig. 7) y ligados a los vectores pEGFP -N1, -N2 o -N3 (Clontech, EUA) para obtener marcos de lectura abierto de las proteínas de fusión con la EGFP con cada uno de ellos.

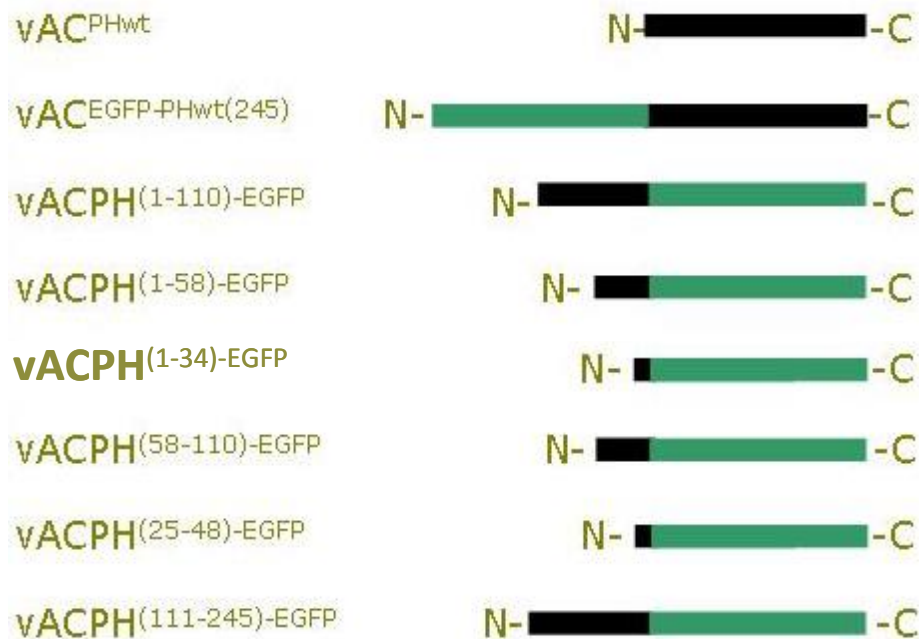


Fig. 7. Representación gráfica de los diferentes fragmentos de poliedrina clonados en el pBlueBac4 y fusionados a la EGFP utilizados en este estudio.

La secuencia y marcos de lectura abierto de cada uno de ellos fue confirmada por análisis con enzimas de restricción y secuenciación.

Todos los fragmentos de poliedrina fusionados a la EGFP fueron entonces subclonados al plásmido de transferencia pBlueBac4 (Invitrogen, EUA), y usados con el kit Bac-N-Blue para la producción de los baculovirus recombinantes (Invitrogen, EUA). Los baculovirus recombinantes fueron purificados por ensayo de placa y amplificados para obtener reservas con altos títulos virales. El título viral de cada uno de estos stocks fue determinado por ensayo de placa y expresado como unidades formadoras de placa (pfu) por mililitro de acuerdo a protocolos desarrollados por el proveedor (Invitrogen, EUA).

La estructura del cristal de la poliedrina WT de AcMNPV disponible en 2WUY.pdb, <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2wuy>, fué utilizada en este estudio para la identificación de la estructura secundaria de la proteína, lo que nos condujo a la generación de los diferentes fragmentos de poliedrina reportados en este trabajo.

Para la construcción de los baculovirus recombinantes conteniendo los fragmentos de las glicoproteínas gB, gC y gD del PRV se hizo un análisis de hidrofobicidad de las 3 glicoproteínas (figura 6) para seleccionar las regiones hidrosolubles que nos permitieran que las glicoproteínas no se dirigieran a las membranas celulares pero que contuvieran los epítopes antigénicos conocidos para estas proteínas. Se diseñaron cebadores para amplificarlas por PCR, a partir del DNA genómico del virus PRV de la cepa Shope (donado por el Dr. Iván Betancourt, Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdo, Facultad de Veterinaria, UNAM), en la fig 8 se muestran los fragmentos clonados de dichas glicoproteínas y el número de aminoácidos que contiene cada proteína fusionada al fragmento de 110 aa de la poliedrina. Los cebadores fueron diseñados para contener los sitios NcoI (delanteros o “forward”) y Sall (reversos) en los extremos para facilitar su clonación en el vector de transferencia pFastBac1PH₍₁₋₁₁₀₎.

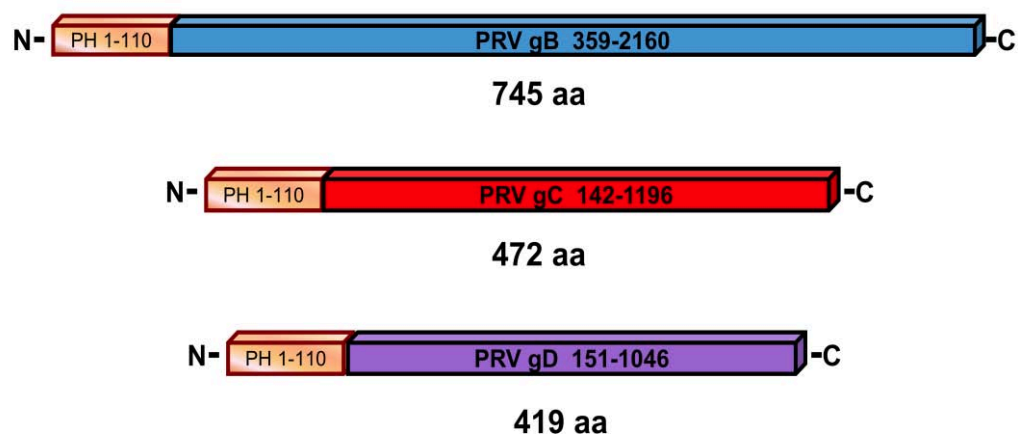


Fig. 8. Representación de los fragmentos de las glicoproteínas gB, gC y gD del virus de Aujeszky fusionadas al fragmento de poliedrina 1-110 para su expresión en el sistema de insecto.

Para la construcción de estos tres baculovirus, se utilizó el sistema de expresión de proteínas Bac-to-bac (Invitrogen, EUA). El vector de transferencia pFastBac1 había sido modificado por la clonación de todo el cassette conteniendo el promotor de poliedrina, los primeros 110 aminoácidos del amino terminal del gen de poliedrina fusionada a la EGFP (proveniente de el pBluBac4-PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP) quedando los sitios NcoI y Sall disponibles para la clonación de los nuevos fragmentos de DNA (pFastBac1-PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP).

Una vez confirmados la presencia de los fragmentos de los genes con enzimas de restricción y por secuenciación, fueron usados para transformar células DH10Bac. Estas bacterias contienen el DNA del baculovirus modificado, bMON14272 (136 kb), un vector llamado bÁcmido, el cual contiene un sitio de replicación bacteriana de bajo número de copias (mini-F replicon), un gen de resistencia a Kanamicina y un segmento de DNA que codifica para el péptido LacZ α proveniente de un vector de clonación pUC, y dentro de este fragmento se han insertado los sitios de transposición attA y attB del transposón bacteriano Tn7 (mini att-Tn7). Los bÁcmidos recombinantes son generados por la transposición de los elementos del mini att-Tn7 presente en el vector de transferencia pFastBac1 y por la acción de una transposasa cuyo gen es expresado en un plÁsmido de ayuda (o helper) presente en las células DH10 Bac (Tetraciclina resistente). En caso de recombinación y la presencia del sustrato X-gal y el inductor, IPTG, las bacterias son blancas en lugar de azules. El plÁsmido pFastBac1, contiene el gen de resistencia a gentamicina entre las regiones attA y attB del mini att-Tn7, que facilita la selección de las bacterias recombinantes.

Los bÁcmidos son purificados de las bacterias de igual manera que un plÁsmido usando columnas para la purificación del DNA plasmídico (Wizard, Promega) y fueron usados para transfectar 1×10^6 células SF9 con el lípido catiónico Cellfectin (Invitrogen) y producir los virus recombinantes. 72 horas después, los virus fueron recolectados y utilizados para su reamplificación y producir stocks con altos títulos virales y para producir las poliedras recombinantes conteniendo los fragmentos de las glicoproteínas gB, gC y gD del PRV.

III. Producción y purificación de poliedras recombinantes y partículas tipo poliedra expresando la EGFP

Se infectaron células SF9 con cada uno de los virus recombinantes o se llevaron a cabo coinfecciones con el virus WT usando títulos 1:5 (WT:recombinante) por 72 hrs. Las células fueron entonces recuperadas por centrifugación a 1500 g por 10 min, resuspendidas en solución de fosfatos salina (PBS; Na₂H₂PO₄, 20 mmol/L; Na₂HPO₄, 20 mmol/L; NaCl, 150 mmol/L, pH 7.2) y sonicadas 3 veces por 30 segundos cada vez a 60 J/seg (Cole Parmer, EUA). Los lisados fueron centrifugados a 12000 g por 10 min a 4°C. El precipitado fue lavado 2 veces con PBS y las poliedras resuspendidas en este mismo buffer. Una alícuota fue usada para la cuantificación por el método del Ácido bicinconínico (BCA, Pierce, EUA).

IV. Análisis de la expresión de proteína en geles de acrilamida

50 µg de las poliedras recombinantes fueron mezcladas con 3X buffer de muestra de Laemmli (50 mM Tris-HCl, 3% SDS, 1% β-mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.7% azul de bromofenol pH 6.8), hervidas por 5 minutos y colocadas en los pozos de un gel de acrilamida al 12% para electroforesis (SDS-PAGE). El gel fue entonces teñido usando azul de Coomasie al 0.5%.

V. Microscopia confocal y reconstrucciones en 3D

Las células SF9 o las poliedras purificadas se pusieron y se dejaron adherir al portaobjetos de una placa LabTek II (NalgeNunc, Int, EUA). Las células fueron infectadas con cada uno de los virus recombinantes por 72 hrs para permitir la expresión de poliedrina, entonces lavadas con PBS, marcadas con DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride, Molecular Probes, EUA) a una concentración de 0.5 µg/ml por 5 min. Tanto células como poliedras fueron fijadas con medio de montaje (DakoCytomation, EUA).

Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal Olympus FV1000 (Olympus, Japón) y analizadas usando el software Fluoview 10-ASW-2.1 (Olympus, Japón).

VI. Microscopía electrónica de barrido (MEB) y de transmisión (MET)

Las células SF9 infectadas con los diferentes baculovirus por 72 hrs, fueron colectadas por centrifugación y lavadas con una solución amortiguadora de cacodilato al 0.08 M pH 7.4 (Sigma, EUA) y fijadas por 10 min con glutaraldehído al 0.6% (SIGMA, EUA) y paraformaldehído al 0.4% en buffer de cacodilato al 0.8 M. La postfijación fue hecha con 1% tetróxido de osmio (Fluka, EUA) en buffer de cacodilato. Las células se incluyeron en una resina epóxica de donde se obtuvieron cortes de 90 nm de espesor y fueron contrastadas con acetato de uranilo al 1% y citrato de plomo. Para la MET, las muestras fueron observadas en un equipo Jeol 1010 a 80 kV (Jeol USA, Inc, EUA), en donde se tomaron varias fotografías.

Para la MEB, las poliedras y las partículas similares a poliedras purificadas de las células infectadas por sonicación y centrifugación, fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfatos pH 7.4. La postfijación se llevó a cabo en tetróxido de osmio al 1% en buffer de fosfatos y posteriormente deshidratadas en gradientes de alcohol. Las muestras fueron entonces secadas al punto crítico y recubiertas con oro para su observación en un equipo Jeol JSM 5410LV (Jeol USA, Inc. EUA).

VII. Citometría de flujo (FACS)

Las poliedras formadas en las células por los diferentes baculovirus recombinantes conteniendo el gen o los fragmentos del gen de poliedrina fusionados a la EGFP de manera individual o con la poliedra WT fueron purificadas como se mencionó anteriormente y sometidas al análisis por citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences, EUA). El número de eventos por muestra fue de 10000, usando la señal de fluorescencia para EGFP a 525 nm. Los resultados obtenidos fueron

graficados como histogramas con una escala logarítmica. Las cuentas o eventos reflejaron partículas de poliedra individuales y los valores fueron utilizados para calcular el porcentaje de partículas GFP positivas. La poliedra WT fue usada para calcular el nivel basal de autofluorescencia.

VIII. Detección de la EGFP inmovilizada sobre la poliedra por inmunohistoquímica

Las poliedras purificadas expresando EGFP fueron incubadas por 30 min con 5% de suero de caballo (SC) en PBS. Las poliedras fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas con un anticuerpo anti EGFP (Full-Length A.v. Polyclonal Antibody, Clontech, EUA), por una hora diluído 1:5000 en PBS-SC 3%. Al finalizar este tiempo, fueron lavadas con PBS-Tween (PBST), 3 veces. El botón de poliedras en el tubo fue resuspendido con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado al rojo Texas (Jackson, ImmuneResearch laboratorios, Inc. EUA) e incubadas por 1 hr. Después de 3 lavados con PBST, las poliedras fueron entonces resuspendidas en un volumen pequeño de PBS y un volumen igual de medio de montaje DAKO (Agilent Technologies Co., Dinamarca). Las poliedras fueron colocadas entre un portaobjetos y cubreobjetos para ser visualizadas en un microscopio confocal Olympus FV10 (Olympus, Japón).

IX. Análisis de la estabilidad de la EGFP *in vivo* en ratones inoculados con poliedras expresando la EGFP

Para observar la estabilidad de las poliedras *in vivo*, 2 ratones BALB/c de 8 semanas fueron inyectados vía subcutánea en la zona inguinal con 50 µg de poliedras recombinantes expresando la EGFP (coinfeción PH_{WT} y PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP). La fluorescencia fue detectada 1 día, 5 y 10 días posinoculación en un sistema de Imágenes Multiespectral (Kodak In-Vivo Multispectral Imaging System FX, Kodak, Rochester, NY, USA). Para llevar a cabo este procedimiento, los ratones fueron anestesiados por inyección intramuscular de una mezcla de ketamina (80 mg/kg) y

xilacina (16mg/kg), y una vez anestesiados fueron colocados boca abajo para tomar la imagen.

X. Determinación del tamaño de las poliedras por NTA

El análisis por seguimiento de nanopartículas o NTA (en inglés: Nanoparticle Tracking Analysis) es un método que combina microscopía por dispersión de luz y una cámara CCD permitiendo la visualización y rastreo de nanopartículas en una suspensión. El tamaño de las nanopartículas es derivado de la ecuación Stokes-Einstein que utiliza el movimiento browniano propio de las partículas y la forma como se dispersa la luz durante dicho movimiento. Las partículas purificadas fueron analizadas en un Nano-Sight NTA system (Malvern instruments Ltd, GRB). Dos concentraciones de PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP y PH₍₅₈₋₁₁₀₎-EGFP fueron analizadas. Los datos obtenidos representan millones de eventos y se muestran los tamaños de las poliedras por mililitro de muestra.

XI. Inmunización de ratones BALB/c y reto con virus PRV

4 grupos de 9 ratones BALB/c de 7-8 semanas fueron inmunizados intramuscularmente (im) con (a) PBS o (b) con poliedras (150 µg) conteniendo la EGFP, y (c) con una mezcla de las poliedras recombinantes conteniendo la gB, gC y gD (150 µg total). Los ratones fueron sangrados antes de la primera inmunización para obtener el suero preinmune como control negativo. Dos semanas después los ratones fueron sangrados y reinmunizados con la misma dosis de antígenos. Dos semanas después de la segunda inmunización fueron sangrados y utilizados en un ensayo de sobrevivencia al reto con el virus PRV. El reto fue llevado a cabo por la inyección intramuscular de 200 pfu de virus PRV de la cepa Shope (Figura 9).

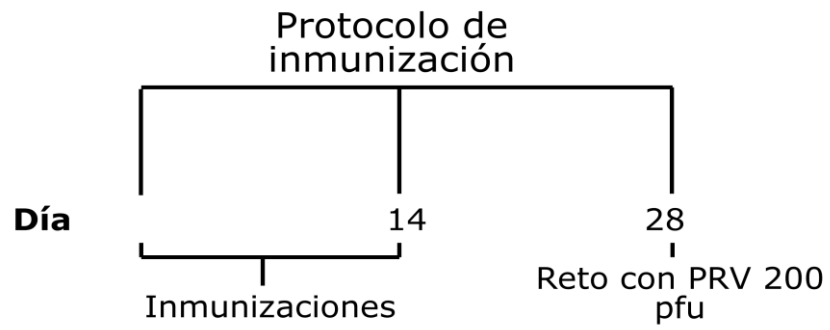


Fig. 9. Esquema de inmunización y reto con el virus PRV.

La sobrevivencia de los animales fue registrada y los datos graficados y analizados usando el programa Graph Pad Prisma (GraphPad Software, EUA).

Resultados

1) Identificación de la secuencia mínima de la proteína poliedrina capaz de autoagregarse y generar partículas tipo poliedra.

La proteína EGFP ha sido utilizada como proteína reportera en la expresión de diferentes promotores o fusionada a diferentes proteínas. Nosotros usamos esta proteína para la determinación, observación y caracterización del fragmento mínimo o de menor tamaño de la poliedrina, que mantiene las propiedades de autoagregación y formación de poliedras. El uso de la EGFP nos permitió visualizar en 3 dimensiones a las poliedras, mediante microscopia confocal, además de brindarnos la posibilidad de purificar nanopartículas por citometría de flujo. Estas fueron las razones de utilizar a la EGFP como proteína de fusión a la poliedrina.

Los baculovirus generados se designaron en base al número de aminoácidos, de acuerdo al fragmento de poliedrina que contenían, siendo los siguientes: Poliedrina WT (EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎), aminoácidos, 1-25 (PH₍₁₋₂₅₎-EGFP), 1-34 (PH₍₁₋₃₄₎-EGFP), 1-48 (PH₍₁₋₄₈₎-EGFP), 1-58 (PH₍₁₋₅₈₎-EGFP), 17-58 (PH₍₁₇₋₅₈₎-EGFP), 58-110 (PH₍₅₈₋₁₁₀₎-EGFP), 1-110 (PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP), and 111-245 (PH₍₁₁₁₋₂₄₅₎-EGFP). Todos los genes fueron clonados bajo el promotor de poliedrina en el vector pBlueBac4.

La EGFP fue clonada en todos los casos en el extremo carboxilo terminal de los fragmentos de poliedrina, excepto en la poliedrina WT (1-245), donde fue clonada tanto en el amino como en la región carboxilo terminales.

El primer baculovirus que generamos fue el que llevaba la construcción EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎ y cuando observamos las células SF9 infectadas al microscopio confocal, observamos agregados fluorescentes de la fusión poliedrina-EGFP, pero que no llegaban a núcleo como la poliedrina WT y tampoco producían poliedras canónicas, sino agregados amorfos (Figura 10). Como se muestra en la figura representativa, no se encontró colocalización entre EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎ y el marcador de núcleo DAPI.

Estos hallazgos sugirieron que la EGFP se encontraba bloqueando el sitio de localización nuclear presente entre los aminoácidos 33-35 de la poliedrina y previniendo así la posible formación de poliedras en el núcleo. Sin embargo, fue un hallazgo muy relevante el encontrar que la proteína era capaz de autoagregarse sin la ayuda de una copia de la poliedrina silvestre. Lo anterior nos permitió generar la hipótesis de que la formación de poliedra se debe (al menos en parte) por la capacidad de autoagregación de la proteína poliedrina. Esta conclusión es novedosa y no había sido presentada con anterioridad en la literatura del campo.

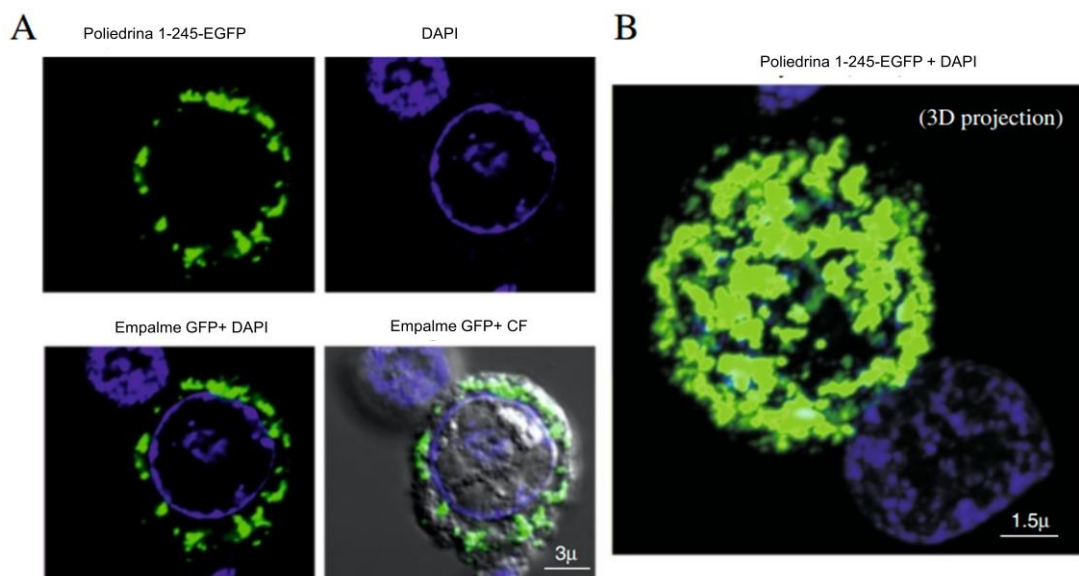


Fig. 10. La proteína poliedrina fusionada a la EGFP forma agregados en el citoplasma. A. Imagen de microscopía confocal donde se muestra la localización citoplásmica de la poliedrina completa fusionada al carboxiterminal de la EGFP (EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎). El panel de la izquierda muestra la fluorescencia de la EGFP y el panel de la derecha la tinción con DAPI para mostrar el núcleo. El panel inferior, muestra las imágenes sobrelapadas (EGFP + DAPI) y el de la derecha, las imágenes sobrelapadas + la imagen de contraste de fases (DIC, differential interference contrast). B. Proyección tridimensional de una célula expresando EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎ observada por microscopía confocal. La EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎ se encuentra formando agregados que impiden la observación de la tinción del núcleo por el DAPI.

La observación de que la poliedrina podía autoagregarse nos invitó a iniciar una búsqueda exhaustiva para identificar la señal de oligomerización en la poliedrina. Para ello realizamos un estudio *in silico* de la poliedrina, e identificamos varios dominios de estructura beta plegada que nos parecieron interesantes, ya que dominios similares son responsables de la autoagregación de péptidos como el beta amiloide, entre otros.

Por este motivo dividimos a la poliedrina en dos partes, produciendo dos proteínas de fusión: la primera PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP y la segunda PH₍₁₁₁₋₂₄₅₎-EGFP. El análisis de la expresión de estas dos proteínas de fusión corroboró nuestra primera hipótesis, el fragmento amino terminal de la poliedrina PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP se autoagregaba en el núcleo de las células de insecto, mientras que el fragmento carboxilo terminal PH₍₁₁₁₋₂₄₅₎-EGFP se veía como una proteína soluble presente en el citosol celular (Figura 11 y 12).

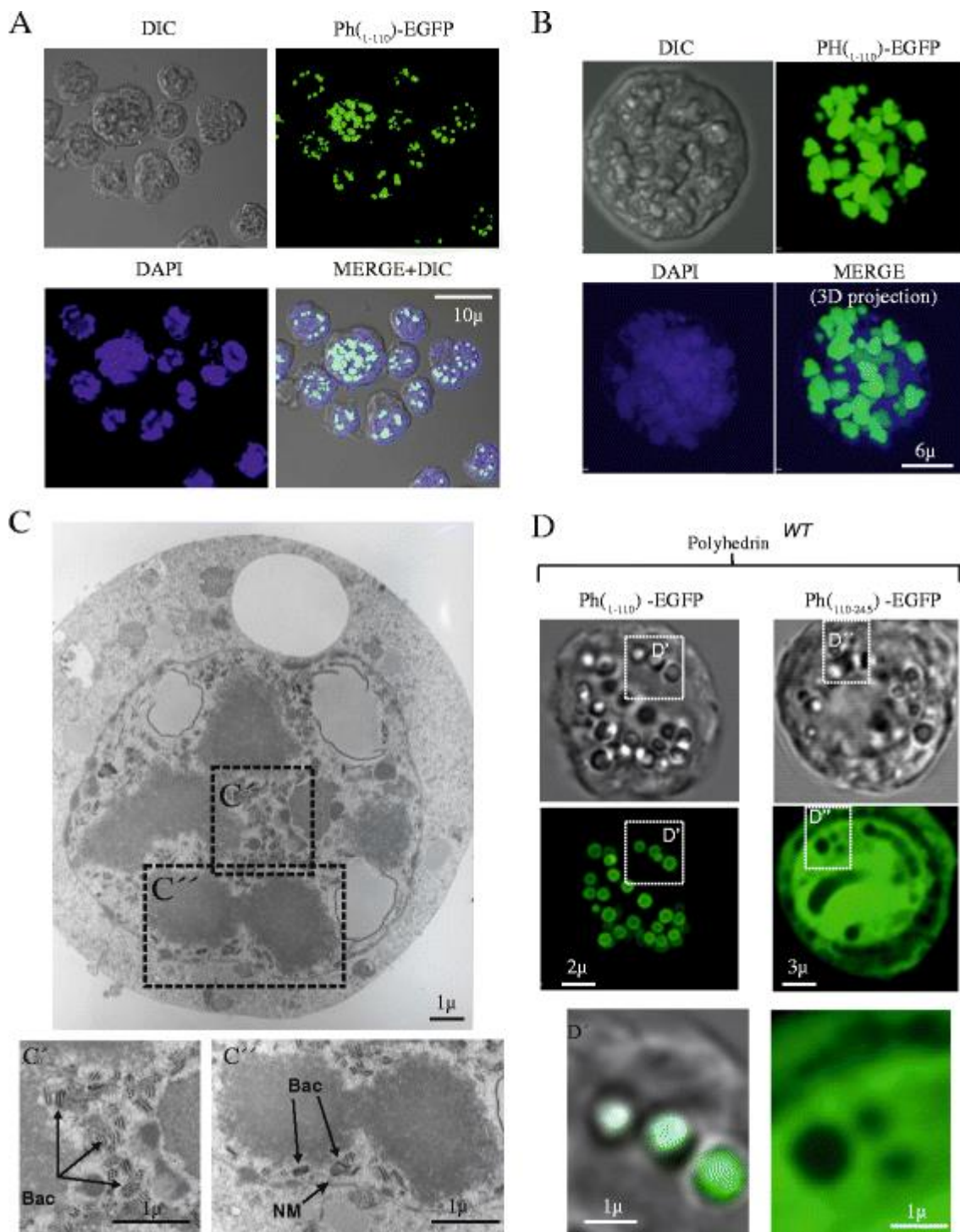


Fig 11. La coinfección del fragmento PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP, es incorporado en la poliedra por la presencia de la poliedrina WT, pero no el fragmento PH₍₁₁₁₋₂₄₅₎-EGFP. En los cuadros de A, y en un acercamiento en B, la fluorescencia de la EGFP en las células infectadas con PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP es observada en el núcleo como agregados o partículas similares a poliedras, pero que no tienen forma definida como la poliedra WT. Las células fueron observadas en DIC y también teñidas con DAPI para determinar la localización de las partículas en la célula,

mostrando que estaban presentes en el núcleo. En las imágenes de los cortes de MET, (Paneles C, C' y C''), de las células infectadas con PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP se pueden observar claramente los agregados electrodensos correspondientes a la PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP. Mientras que la PH₍₁₁₁₋₂₄₅₎-EGFP, no mostró formación de agregados ni cuando fue expresada sola o en presencia de la poliedrina WT (D). De hecho, esta proteína se observó excluida de las poliedras formadas solo de poliedrina WT como se ilustra en las insertos D'', comparadas a las poliedras recombinantes formadas por PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP y poliedrina WT (Insertos D').

El análisis *in silico* nos dirigió hacia el extremo amino terminal de la proteína, ya que en ese extremo se encontraban dos regiones estructuralmente idénticas (aunque de secuencias completamente diferentes). Estas dos regiones consistían en dos estructuras beta plegadas seguidas de una alfa hélice (aminoácidos 1-58 y 58-110).

Para continuar con la identificación del fragmento mínimo, y determinar si las estructuras de doble beta plegada seguidas por una alfa hélice realmente estaban involucradas en la autoagregación de la poliedrina, produjimos los fragmentos PH₍₁₋₅₈₎-EGFP y PH₍₅₈₋₁₁₀₎-EGFP (es decir, partimos el fragmento PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP en dos partes, donde las estructuras doble beta y alfa mencionadas anteriormente se mantienen en cada fragmento resultante) (Figura 12). Los resultados obtenidos con estos fragmentos indicaron que efectivamente estas estructuras de doble beta seguidas de una alfa hélice estaban involucradas en la autoagregación de la poliedrina (Figura 12).

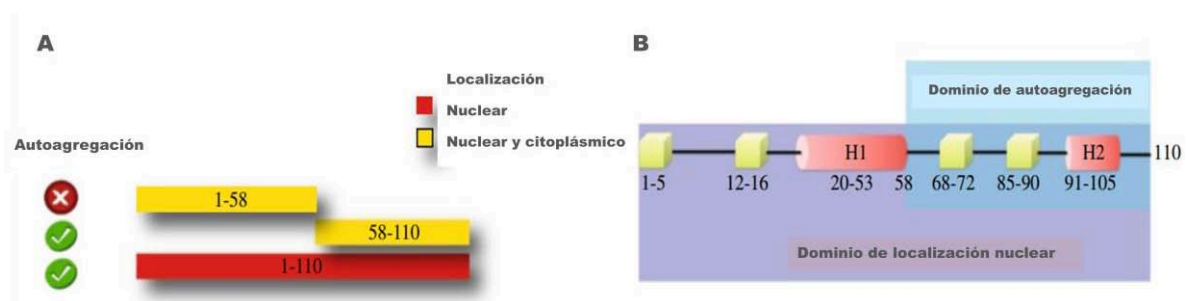


Fig. 12. Representación de la identificación de las secuencias de localización nuclear, autoagregación y de incorporación en la poliedra de la poliedrina. En A, se muestran los fragmentos que son capaces de autoagregarse y su localización en la célula y en B, los dominios de estructura secundaria presentes en el fragmento aminoterminal 1-110 de la poliedrina de acuerdo a los resultados de cristalografía de rayos X.

De manera muy interesante, al dividir esta estructura ($\text{PH}_{(1-58)}$) de doble beta seguida de alfa hélice, eliminaba la capacidad de autoagregarse de la proteína recombinante resultante. De acuerdo a los estudios de cristalografía, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el fragmento $\text{PH}_{(1-58)}$ -EGFP en dos partes ($\text{PH}_{(1-25)}$ -EGFP y $\text{PH}_{(25-58)}$ -EGFP), conteniendo cada uno una sola de las cadenas beta plegadas. Los resultados mostraron que ninguno de los fragmentos se autoagregaba, produciendo proteínas solubles distribuidas homogéneamente en el citosol de manera similar a la $\text{PH}_{(111-245)}$ (datos no mostrados). Cabe recalcar que el fragmento $\text{PH}_{(1-25)}$ -EGFP retiene solo una de las estructuras beta plegadas y el fragmento $\text{PH}_{(25-58)}$ -EGFP una beta plegada y el alfa hélice. Otros fragmentos que ayudaron a corroborar la relevancia de esta estructura de doble beta seguida de una alfa hélice en la autoagregación de la poliedrina fueron: $\text{PH}_{(1-48)}$ -EGFP, el cual contenía las dos betas y la mitad de la alfa hélice y el $\text{PH}_{(1-34)}$ -EGFP, el cual contenía las dos betas y el inicio de la alfa hélice (Figura 12B).

2) La poliedrina completa y los fragmentos 1-58, 58-110 y 1-110 fusionada a la EGFP solo producen poliedras canónicas cuando es expresada con la poliedrina silvestre.

Posteriormente utilizamos tanto la proteína completa fusionada a la EGFP así como los fragmentos capaces de autoagregarse y los coexpresamos con una copia de la poliedrina silvestre, con el fin de determinar si estas proteínas (además de autoagregarse) podían formar parte de una poliedra canónica. El primer ensayo lo hicimos con la fusión de la EGFP a la poliedrina completa ($\text{EGFP-PH}_{(1-245)}$ -EGFP) y fue muy interesante observar que la coexpresión de la proteína silvestre permite muy probablemente a la proteína recombinante asociarse a ella y translocarse juntas al núcleo de las células infectadas (Fig. 13).

El caso de la GFP

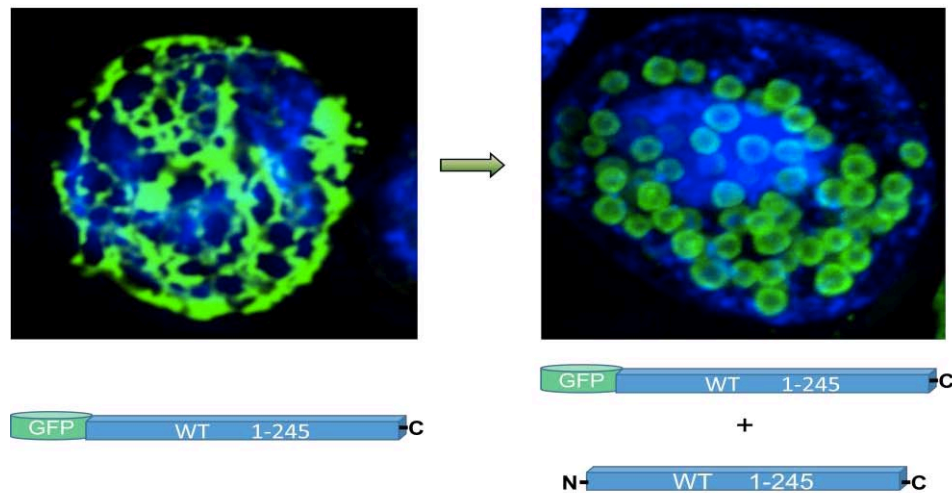


Fig. 13. La fusión poliedrina (1-245)-EGFP es expresada en citoplasma como agregados, pero es “rescatada” por la poliedrina WT y trasladada al núcleo.

Para conocer la relevancia de la poliedrina WT en la formación de las poliedras, se realizó un ensayo de titulación, donde la concentración o multiplicidad de infección (MOI, multiplicity of infection) del virus EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎ (MOI = 1) se mantuvo constante en varios pozos conteniendo células SF9 y se agregó el virus WT en concentraciones crecientes (MOIs 0.5, 1, 2, 3 y 5). Estos resultados muestran que además de que la poliedrina WT es capaz de asociarse con la poliedrina recombinante en el citoplasma y llevarla al núcleo, la relación de ambas es crítica para el ensamblaje correcto del cristal. La figura 14A, muestra las reconstrucciones tridimensionales obtenidas por microscopía confocal de las coinfecciones, y en la figura 14B, se muestra el análisis de los pixeles generados en las imágenes de confocal por la colocalización de EGFP/DAPI, revelando que la formación de poliedras recombinantes en el núcleo de las células infectadas ocurre cuando la relación de PH_{WT}: EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎ es 3 a 1. Es de consideración la relación de incorporación de poliedrina WT y poliedrina recombinante de 3 a 1, debido a que la unidad mínima de formación del cristal de poliedra es un trímero. Podemos decir que los resultados sugieren que cada trímero puede estar formado por dos moléculas de la poliedrina WT y una de la proteína EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎. Aumentando la cantidad de virus

expresando EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎ resultó en la acumulación de esta proteína en el citoplasma, por lo que todos los posibles sitios estarían ocupados en la poliedrina WT.

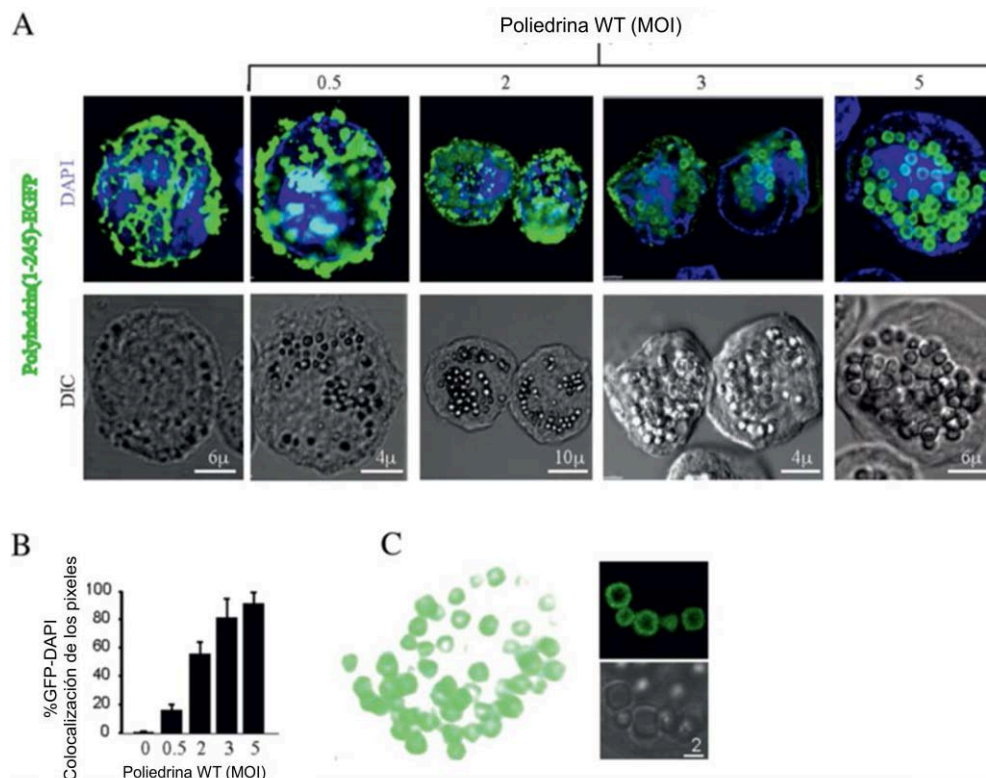


Fig. 14. Titulación de la cantidad de poliedrina WT requerida para formar poliedras recombinantes expresando EGFP. A. Las imágenes de arriba muestra la fluorescencia de una o dos células representativas de cada una de las coinfecciones usando MOI de 1 del virus EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎ y concentraciones crecientes de virus WT (MOIs 0.5, 1, 2, 3 y 5). La tinción del núcleo con DAPI se observa en azul. Los paneles inferiores son las imágenes en DIC de las mismas células. B. Determinación de pixel colocalización de la EGFP y DAPI, para determinar la cantidad de EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎ que es trasladada al núcleo por el aumento de la expresión de la poliedrina WT. Es de resaltar que a partir de una MOI de 3, toda la EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎ es localizada en el núcleo y no hay diferencia significativa con títulos más elevados de virus (e.g. MOI 10, datos no mostrados). C. Poliedras formadas de la coinfección de poliedrina WT y EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎ fueron purificadas por centrifugación después de sonicar las células SF9, y la presencia de la EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎ fue observada en todas las poliedras.

Los resultados obtenidos con los diferentes fragmentos muestran que todos aquellos que pueden autoagregarse (PH₍₁₋₅₈₎-EGFP, PH₍₅₈₋₁₁₀₎-EGFP, PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP) también se asocian a la poliedrina silvestre y se forman poliedras canónicas (Figura 15). Estas poliedras se forman en el núcleo de las células infectadas, al igual

que la poliedra formada exclusivamente por copias silvestres de la poliedrina. Desde el punto de vista ultra estructural (morfologías obtenidas por microscopía confocal y electrónica de transmisión y barrido), todas estas poliedras son indistinguibles de la silvestre (Figura 15B).. Más aún, estas poliedras contienen en su interior baculovirus, al igual que la poliedra silvestre (Datos no mostrados). De manera muy interesante cabe recalcar, que las estructuras formadas por los agregados de los fragmentos $\text{PH}_{(1-58)}$ -EGFP, $\text{PH}_{(58-110)}$ -EGFP y $\text{PH}_{(1-110)}$ -EGFP no contienen baculovirus en su interior, es decir, a pesar de formarse en el núcleo de las células infectadas, son incapaces de empacar baculovirus en su interior (Figura 16B).

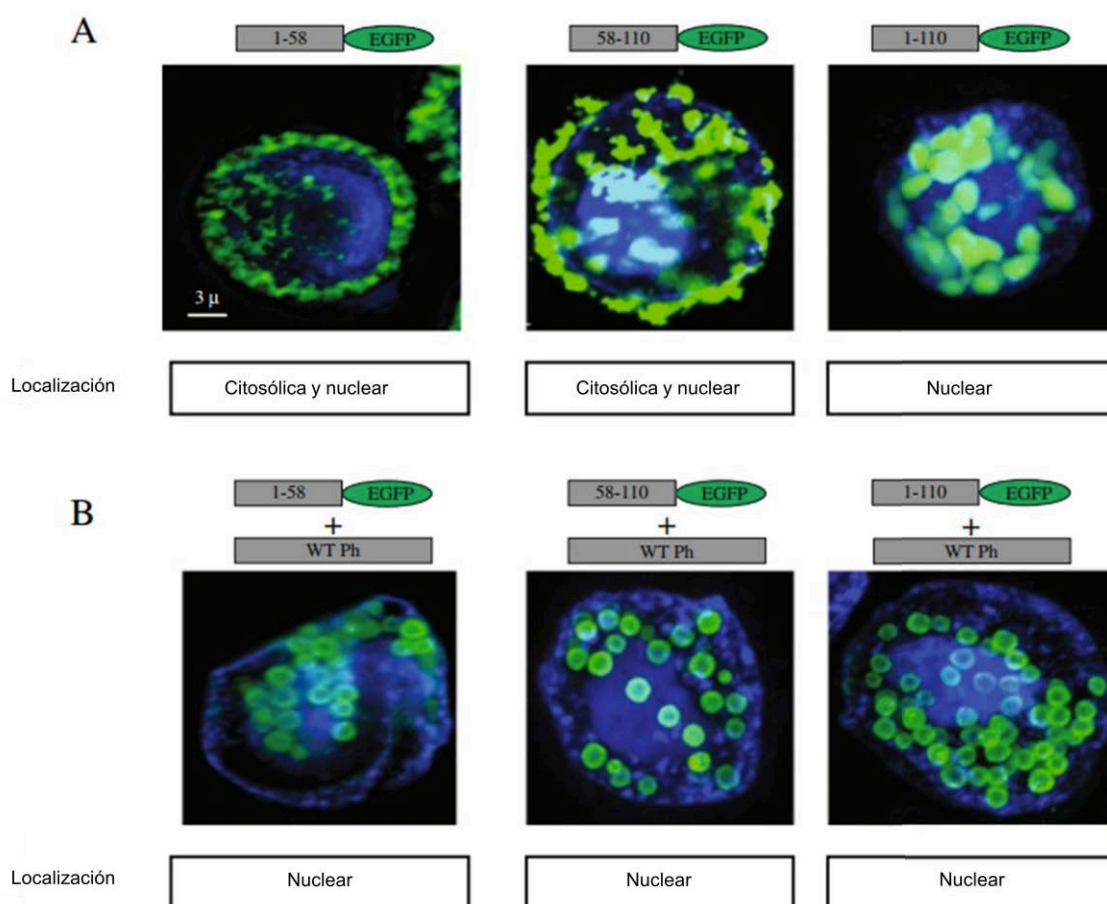


Fig. 15. Los fragmentos aminoterminal 1-110, 1-58 y 58-110 de la poliedrina fusionados a EGFP, pueden autoagregarse expresados de manera individual y formar poliedras cuando son coexpresados con la poliedrina WT. A. Imágenes de microscopía confocal mostrando la expresión de los fragmentos $\text{PH}_{(1-110)}$, $\text{PH}_{(1-58)}$ y $\text{PH}_{(58-110)}$ fusionados a la EGFP en ausencia de poliedrina WT. Los agregados de estas proteínas pueden estar localizados tanto en el núcleo y en el citoplasma de las células infectadas. B. Reconstrucción tridimensional de las

células infectadas con los mismos baculovirus recombinantes que en A, pero coinfectadas con poliedrina WT, observándose la formación de poliedras tipo WT. En todas las infecciones las células fueron teñidas con DAPI para determinar la localización de las partículas en las células.

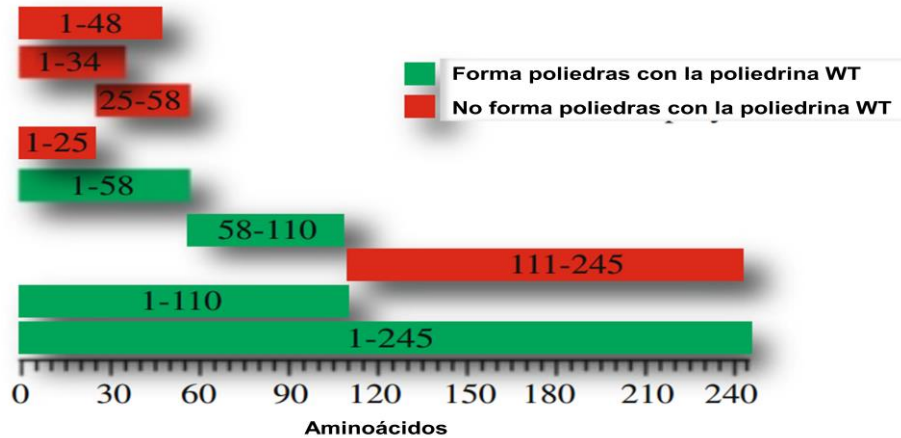


Fig 16A. Esquema ilustrando los diferentes fragmentos de la poliedrina expresados en el presente trabajo. A. Los rectángulos en rojo muestran los fragmentos que no forman poliedra cuando son coexpresados con la poliedrina WT, mientras que los verdes sí.

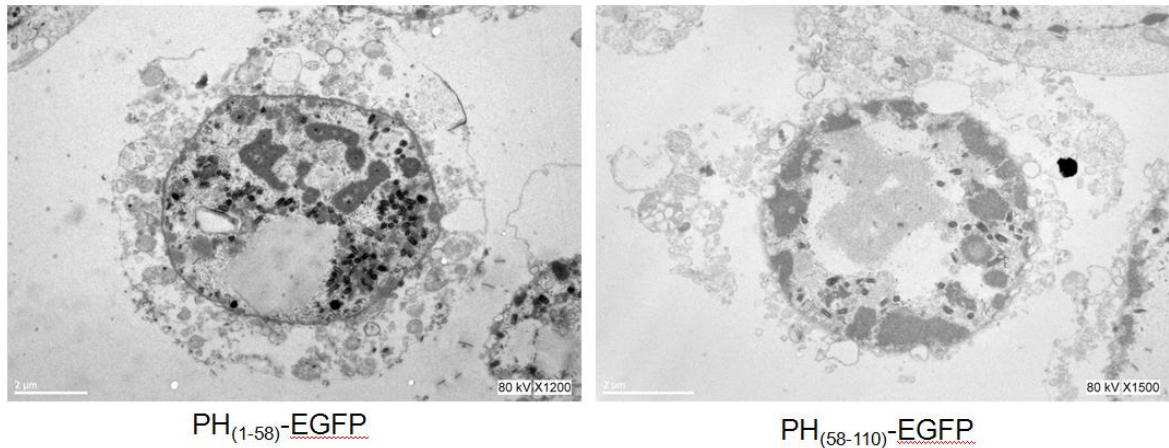


Fig.16B. Fotografías de MET de células infectadas con los baculovirus expresando las poliedras PH₍₁₋₅₈₎-EGFP y PH₍₅₈₋₁₁₀₎-EGFP.

3) Análisis cuantitativo de la incorporación de una proteína recombinante a la poliedra.

Las poliedras canónicas recombinantes obtenidas por la coinfección de baculovirus silvestre o expresando los diferentes fragmentos antes mencionados

fueron purificadas y se usaron para hacer un análisis cuantitativo de la incorporación de EGFP por citometría de flujo (FACS).

En la figura 17A se muestran los histogramas de la fluorescencia de las partículas individuales de cada muestra. En la figura 17B, se muestran los resultados (media \pm DS) de al menos tres mediciones diferentes. Concordante con las observaciones por microscopia confocal, solo las muestras de las partículas PH₍₁₋₅₈₎-EGFP, PH₍₅₈₋₁₁₀₎-EGFP, PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP y EGFP-PH₍₁₋₂₄₅₎ contenían partículas fluorescentes, y de todas ellas, la más fluorescente fue la de las poliedras PH₍₅₈₋₁₁₀₎-EGFP. Estos resultados son de gran utilidad para conocer la estrategia que puede resultar en una mejor expresión de una proteína recombinante en las poliedras canónicas.

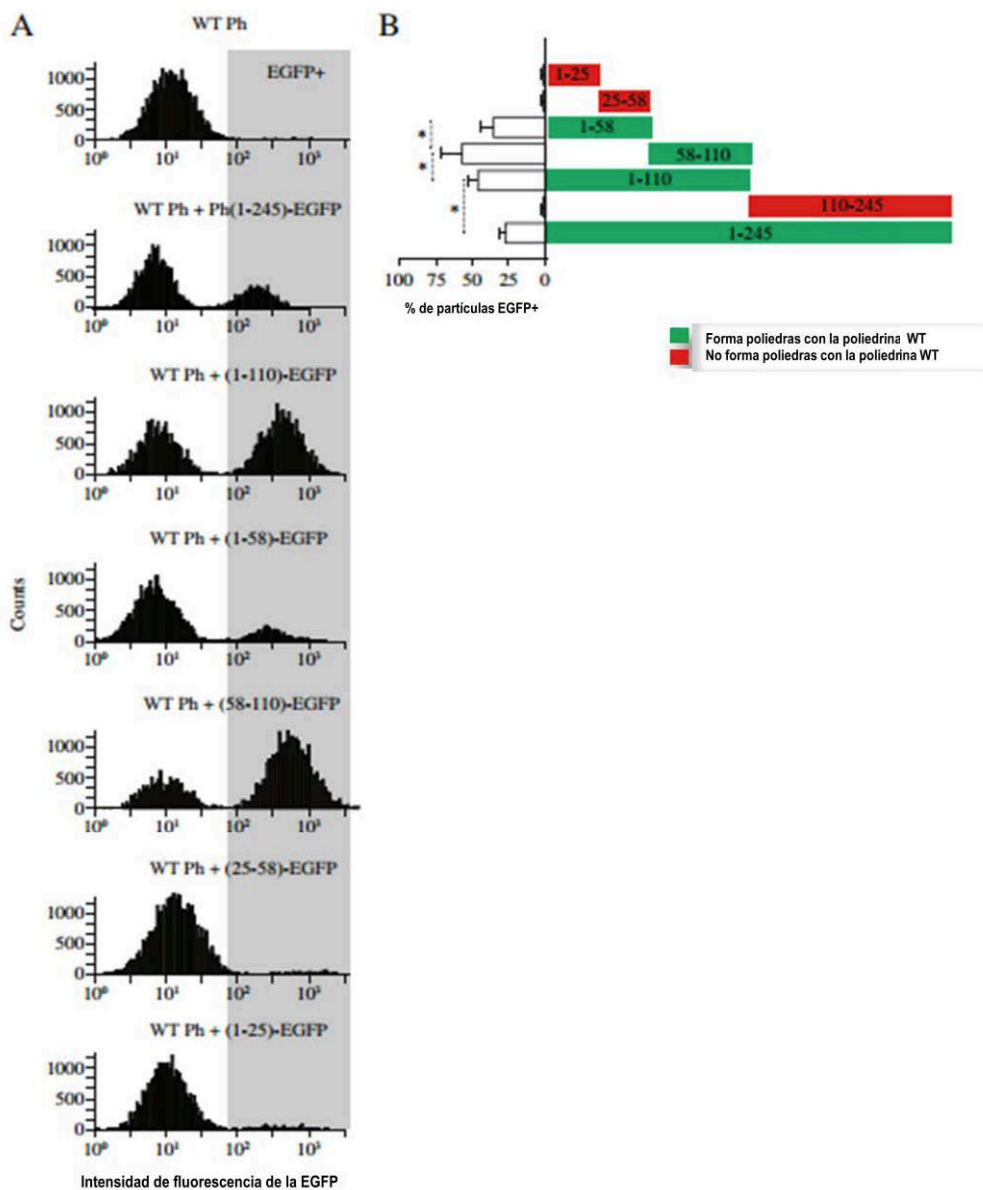


Fig. 17. Diferencias en la eficiencia de incorporación de la proteína recombinante en las poliedras obtenidas con los diferentes fragmentos de poliedrina estudiados. A. Las poliedras producidas por la coinfección de los diferentes fragmentos de poliedrina-EGFP y poliedrina WT (MOI 1:3) fueron purificadas y se les hizo un análisis por citometría de flujo para medir la intensidad de fluorescencia (canal de emisión 525 nm). El nivel basal de fluorescencia o autofluorescencia fue determinado usando las poliedras WT (sin EGFP), mostrado en el primer panel de la figura. Con este resultado, se identificó la fluorescencia de las otras poliedras obtenidas (EGFP+, señalado por el rectángulo gris). B. De 10,000 eventos que se obtuvieron en el análisis, se calculó el porcentaje de poliedras EGFP+, los resultados se muestran en el histograma de la derecha.

4) Determinación de la accesibilidad de la EGFP en las poliedras recombinantes a anticuerpos.

Para precisar si la proteína EGFP contenida en las poliedras recombinantes está accesible al sistema inmune, realizamos ensayos de inmunohistoquímica usando un anticuerpo de conejo anti EGFP (Clontech, EUA) y un anticuerpo secundario anti conejo conjugado a rojo Texas y el pegado del anticuerpo primario fue determinado por microscopía confocal. Los resultados muestran que, aún cuando la EGFP está contenida dentro del cristal de poliedra, los anticuerpos anti-EGFP son capaces de reconocer al antígeno y marcar la superficie de las partículas de poliedra.

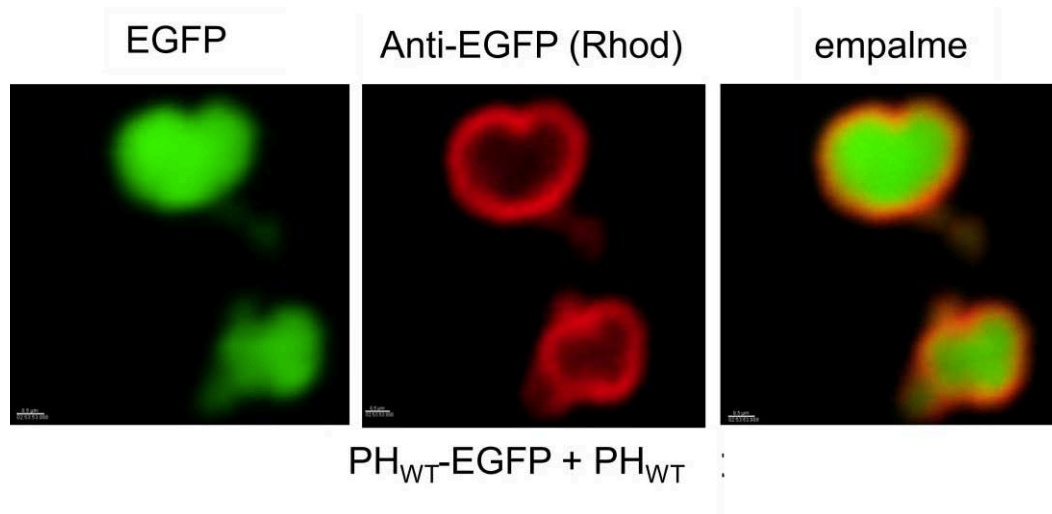


Fig. 18. La EGFP está expuesta y accesible en la superficie de las poliedras recombinantes. Poliedras EGFP purificadas fueron marcadas con un anticuerpo anti-EGFP y un anticuerpo secundario anti conejo conjugado a rojo Texas (Panel “anti-GFP”). La fluorescencia de la EGFP se observa en el panel “GFP” y la colocalización en el panel “merge”.

5) Análisis del tamaño de las partículas recombinantes de poliedrina mediante Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).

Usando un método alternativo (a la microscopía y citometría de flujo), el Análisis de Rastreo de Nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA, Malvern Instruments Ltd, UK), determinamos que las diferentes partículas presentan tamaños variables desde 100 nm hasta casi 1 μ m (Fig. 19 D). NTA es un método estándar utilizado para el análisis de nanopartículas, que combina la microscopía de la dispersión de la luz de un láser acoplado a una cámara CCD, logrando la visualización y el rastreo de nanopartículas en solución. La determinación del tamaño de las nanopartículas es derivado de la ecuación Stokes-Einstein, monitoreando el movimiento Browniano de las nanopartículas y la dirección de la luz dispersada.

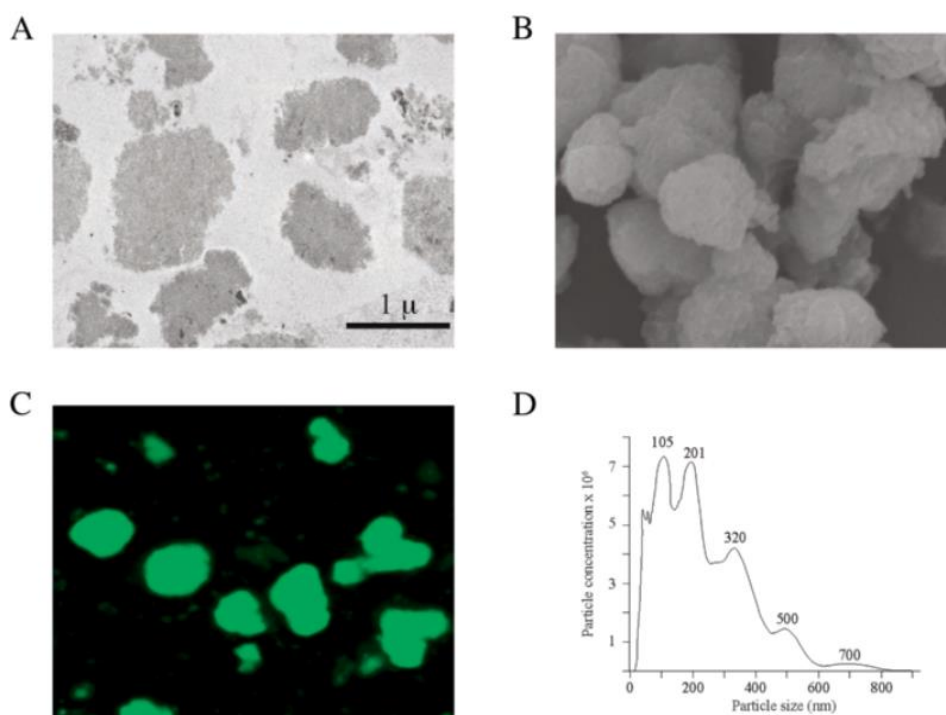


Fig. 19. Los fragmentos de poliedrina PH₍₅₈₋₁₁₀₎-EGFP y PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP producen partículas electrodensas. Imágenes representativas de agregados de la proteína PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP purificados y observados por A, microscopía electrónica de transmisión (MET), B, microscopía electrónica de barrido (MEB) y C, microscopía confocal. La barra en A indica 1 μ m y aplica para las tres imágenes de microscopía. En D, identificación de los tamaños de las partículas en solución utilizando el análisis por NTA. Puede observarse que los grupos de partículas son múltiplos de las más pequeñas con un tamaño de 100 nm. El número arriba de cada pico identifica el tamaño promedio de cada tamaño de partícula mostrado en nm. Partículas de características similares fueron observadas por la expresión de la proteína PH₍₅₈₋₁₁₀₎-EGFP (datos no mostrados).

6) Determinación del tiempo de permanencia de las poliedras recombinantes expresando PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP *in vivo*.

En el desarrollo de la respuesta inmune a un antígeno, es importante el tiempo de permanencia en el organismo. Si éste es eliminado de manera inmediata, el sistema inmune no tendrá un tiempo de activación para montar una buena respuesta inmune, por lo que es importante que la forma física del antígeno tenga o presente un efecto de depósito y liberación prolongada de ser posible.

Dentro de nuestros estudios para el desarrollo y uso de las partículas de poliedrina como vehículos para vacunas usamos las poliedras formadas por PH_{WT}/PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP y por PH_{WT}/PH₍₁₋₅₈₎-EGFP para evaluar las características mencionadas teniendo la ventaja de poder detectar la proteína EGFP con un sistema de Imágenes Multiespectral (Kodak In-Vivo Multispectral Imaging System FX, Kodak, Rochester, NY, USA) en animales vivos anestesiados. Más aún, pudimos seguir la fluorescencia de las partículas durante varias semanas. La figura 20 muestra a los ratones inyectados por vía subcutánea en la región inguinal de ambas extremidades traseras con 10,000 partículas de poliedras recombinantes. Como puede observarse en la figura, las poliedras permanecieron en el sitio de inoculación hasta por 10 días, mientras que esto no llegó a ocurrir con las PH_{WT}/PH₍₁₋₅₈₎-EGFP, mostrando que pueden ser diferentes en su estabilidad y/o desensamblado *in vivo*.

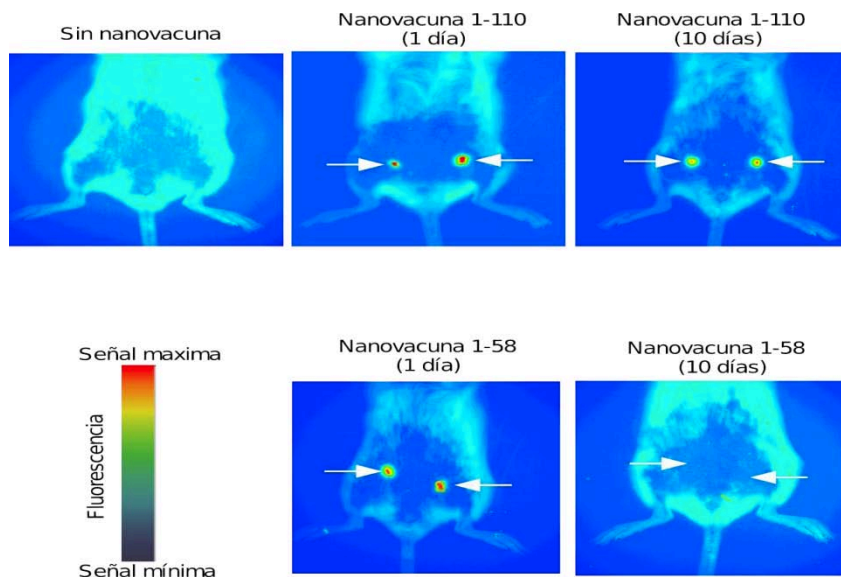


Fig. 20. Determinación del efecto de depósito de las poliedras recombinantes en ratones BALB/c (n=2 de cada poliedra) 1, 5 y 10 días después de la inyección subcutánea de las poliedras formadas con PH_{WT}/PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP y con PH_{WT}/PH₍₁₋₅₈₎-EGFP. Las poliedras conteniendo la PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP estuvieron presentes por más tiempo en la zona de inoculación que las poliedras conteniendo la PH₍₁₋₅₈₎-EGFP. La señal máxima está indicada en rojo y la mínima en azul como se indica en la barra a la izquierda.

7) Producción de poliedras conteniendo fragmentos de los antígenos gB, gC y gD del virus de Aujeszky.

Con el fin de determinar si las partículas de poliedra son capaces de montar una respuesta inmune adecuada que sea capaz de proteger contra una infección viral, desarrollamos un bioensayo de sobrevivencia en ratones utilizando un virus letal en estos animales, el virus de Aujeszky (conocido también como pseudorrabia, o PRV). La idea fue inmunizar ratones con nuestra “nanovacuna” (poliedras recombinantes conteniendo los 3 principales antígenos del virus PRV) y retarlos con una dosis letal del virus de Aujeszky para determinar la sobrevivencia al reto. Para lograr este fin, primero identificamos las regiones hidrosolubles de las glicoproteína gB, gC y gD (estas proteínas son estructurales y poseen varias regiones transmembranales que podrían interferir con su incorporación dentro de las poliedras) para clonaras como proteínas de fusión al fragmento 1-110 de la poliedrina. Estas 3 secuencias seleccionadas mediante análisis bioinformático fueron clonadas en marco de lectura

a la región carboxilo terminal de la secuencia PH₍₁₋₁₁₀₎ y producir proteínas de fusión y formar poliedras conteniendo las copias de nuestros antígenos de PRV.

Las poliedras fueron purificadas por centrifugación, lavadas 3 veces con PBS para eliminar la mayor cantidad de proteínas de las células. Las poliedras fueron solubilizadas aumentando el pH a 10.5 y la proteína fue cuantificada. Se usaron 50 µg de cada una de las poliedras recombinante para separarlas en un gel PAGE-SDS al 10% para determinar si tenían el peso molecular estimado, mediante análisis electroforético PAGE-SDS.

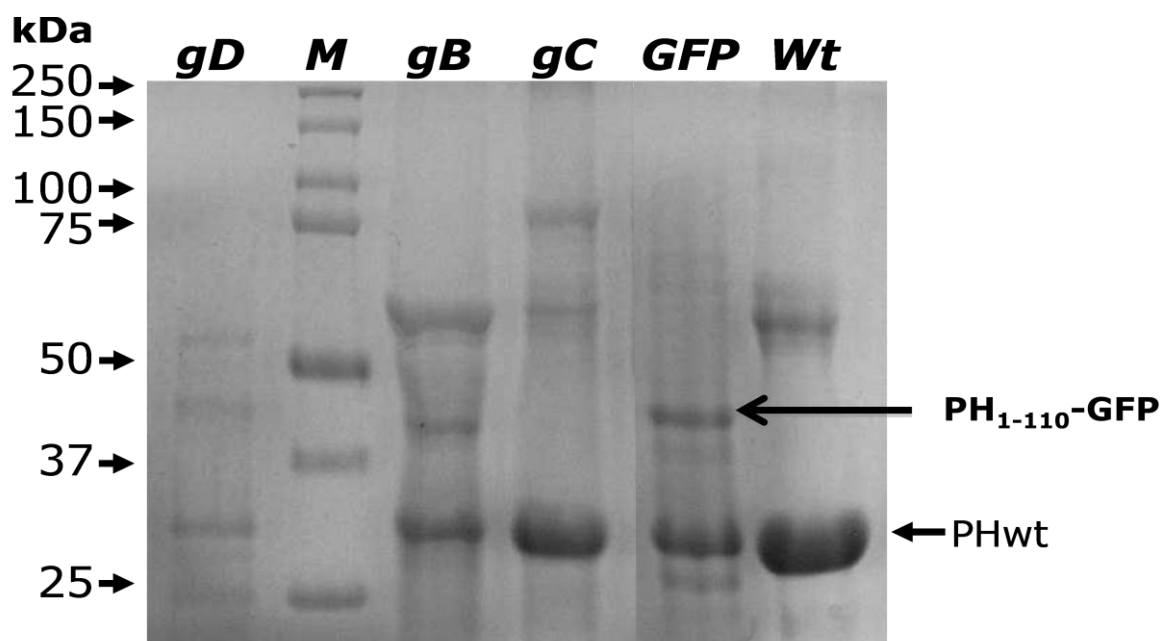


Fig. 21. PAGE-SDS de los fragmentos de las glicoproteínas gB, gC, gD del virus de Aujeszky, y de la EGFP fusionados al fragmento 1-110 de la poliedrina y coexpresadas con la poliedrina WT. Los pesos moleculares aproximados correspondientes al marcador de peso molecular se indican a la izquierda (M = marcador de peso molecular). Los pesos esperados para la fusión de las glicoproteínas de Aujeszky son (en kDa); para la gB 84.7, para la gC, 52 y para la gD 50. El peso esperado de la proteína EGFP fusionada a PH₍₁₋₁₁₀₎ es 41 y para la poliedrina WT es de 27 kDa.

Una vez que se determinó que las proteínas contenidas en las proteínas recombinantes mostraban el peso molecular esperado para las fusiones PH₍₁₋₁₁₀₎-gB, PH₍₁₋₁₁₀₎-gC y PH₍₁₋₁₁₀₎-gD, se procedió a utilizar estas partículas como inmunógenos

en bioensayos con ratones. Los animales fueron inmunizados vía intramuscular con una mezcla de los 3 antígenos (50 µg de cada una de las poliedras) o con 150 µg de PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP.

La gráfica de la figura 22, muestra la sobrevivencia de 2 grupos de 9 ratones BALB/c inmunizados con la mezcla de tres poliedras conteniendo cada una, uno de los fragmentos de las glicoproteínas del virus de Aujeszky. Un número igual de ratones fue

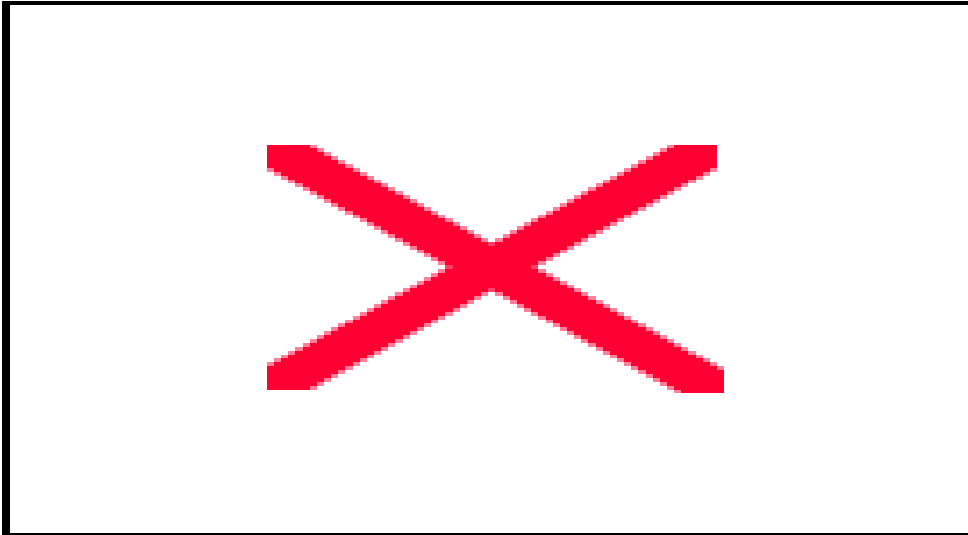


Fig. 22. Curva de sobrevivencia de ratones BALB/c inmunizados con 3 fragmentos de cada una de las glicoproteínas gB, gC y gD del virus PRV. Solo un ratón PBS (¡! %) y 2 de 8 (25 %) ratones del grupo inmunizados im con dos dosis de 150 µg de las poliedras recombinantes expresando EGFP al desafío con el virus PRV. 6 de 9 (66 %) ratones que recibieron las poliedras expresando los fragmentos de las glicoproteínas gB, gC y gD del virus PRV, sobrevivieron al reto con el virus PRV.

Los resultados indican que 33% de los ratones inmunizados con las poliedras conteniendo a la EGFP, mientras que los ratones inmunizados con las poliedras conteniendo los antígenos del virus PRV (PH₍₁₋₁₁₀₎-gB, PH₍₁₋₁₁₀₎-gC y PH₍₁₋₁₁₀₎-gD) muestran una sobrevivencia mayor al reto con el virus de Aujeszky (66%). Casi todos los animales inoculados con PBS no sobreviven más allá del quinto día. Interesantemente, los animales inmunizados con poliedras control (poliedras conteniendo a la EGFP, PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP) sobreviven de manera similar a los inmunizados con PBS, lo que indica claramente que es la presencia de los antígenos de PRV y no la presencia de las partículas de poliedra lo que induce una respuesta protectora contra el virus de Aujeszky.

Discusión y conclusiones

El sistema de expresión en baculovirus ha llegado a ser una herramienta poderosa para la expresión de muchas proteínas recombinantes, principalmente de células eucariotes (Hitchmann RB, *et al.*, 2009). Los primeros baculovirus recombinantes que se desarrollaron estaban dirigidos bajo el promotor de poliedrina y las proteínas eran sintetizadas como proteínas solubles que necesitaban ser purificadas a través de laboriosos pasos.

Muchas variaciones han sido hechas en los últimos 10 años para mejorar significativamente el sistema, de manera que se puedan obtener mayor cantidad de proteína por cantidad de células o bien para que la proteína a obtener tenga modificaciones postraduccionales similares a lo que ocurre en mamíferos (Trowitzsch S, *et al.*, 2010).

Una nueva estrategia ha empezado a ser utilizada para facilitar la purificación de las proteínas recombinantes producidas en insecto, la cual consiste en incorporarlas dentro del cristal de la poliedra. Estas partículas son fácilmente purificadas mediante centrifugación de baja velocidad. Para lograr lo anterior, se han fusionado las proteínas de interés a la secuencia completa de la poliedrina (principal componente formador de la poliedra) tanto del virus que estudiamos en el presente trabajo de tesis (AcMNPV) como de otros virus de insecto (BmNPV y cipoivirus BmCPV).

En este trabajo, basados en la estructura recientemente descrita de la poliedrina de AcMNPV (Ji X, *et al.*, 2010) llevamos a cabo un análisis de los posibles dominios implicados en la autoagregación y en la incorporación a la poliedra con el fin de generar proteínas y poliedras recombinantes que puedan ser usadas como productos biotecnológicos, en particular en el presente trabajo nos interesó su uso en vacunas.

Identificamos por primera vez la estructura requerida para la autoagregación de la poliedrina, constituida por dos beta plegadas seguidas por una alfa hélice. Estas estructuras están duplicadas dentro de los primeros 110 aminoácidos de la poliedrina

de AcMNPV, pero también están conservadas en poliedrinas de otros virus de insecto que forman poliedras, si bien las secuencias de todas estas poliedrinas son completamente diferentes. Lo anterior indica que para la formación de la poliedra, lo que se ha favorecido evolutivamente es la estructura sobre la secuencia. En este sentido, la estructura identificada en el presente trabajo, formada por dos beta plegadas seguidas por una alfa hélice, es esencial para la autoagregación de la poliedrina y la formación del cristal de poliedra.

El fragmento amino terminal de 110 aminoácidos interactúa con otras dos moléculas de poliedrina para sostenerse o sujetarse y formar la primera unidad del cristal (el trímero), el cual está formado por dos dominios (1-57 y 58-110) similares cada uno de ellos conteniendo dos hélices β (βA , $\beta A'$, and $\beta A''$, βB), seguidos de una corta alfa hélice α ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), de acuerdo a los análisis de estructura de rayos X del cristal de poliedra (Ji X, *et al.*, 2010). La repetición de esta unidad mínima (trímero) o celda unitaria es lo que termina por formar el cristal de poliedra.

El uso del fragmento de poliedrina $PH_{(1-110)}$ produce nanopartículas de tamaños con una mayor variación (de alrededor de 100 nm hasta 4-5 μm) al producido por la coexpresión de este fragmento con una copia de la poliedrina silvestre (1-2 micras). Interesantemente, todos los fragmentos de la poliedrina que se autoagregan ($PH_{(1-58)}$, $PH_{(58-110)}$ y $PH_{(1-110)}$) se pueden incorporar a la poliedra canónica, cuando se coexpresan con la poliedrina silvestre. Lo anterior indica que la propiedad de autoagregación es un mecanismo esencial para la formación de la poliedra.

Finalmente, con el fin de determinar si antígenos incorporados en partículas producidas por el fragmento $PH_{(1-110)}$ podían funcionar como vacunas, realizamos bioensayos de protección contra el virus de Aujeszky, un virus muy agresivo y letal en ratones. Estos bioensayos nos enseñaron dos cosas fundamentales: La primera es que las nanopartículas son capaces de generar una respuesta inmunoprotectora, aun cuando los antígenos se encuentran insertados dentro de un cristal proteico. La segunda enseñanza fue que la inmunización con nanopartículas de $PH_{(1-110)}$ no

requirió el uso de adyuvantes. Si bien, en este estudio no se pudieron analizar las moléculas y/o células efectoras involucradas en este mecanismo de protección debido a la falta de los antígenos purificados (glicoproteínas gB, gC y gD o el virus completo), estudios paralelos realizados en nuestro laboratorio usando partículas de poliedrina conteniendo a la EGFP fusionada al fragmento 1-110, han mostrado una buena y sostenida respuesta por anticuerpos (datos no publicados). La respuesta protectora (33% vs PBS 0.56%) generada por las poliedras formadas por la coexpresión de la poliedrina WT y la fusión de PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP, podría ser generada por la presencia de baculovirus en estas poliedras, como se ha reportado en diversos estudios utilizando los baculovirus como presentadores de antígenos en el mecanismo conocido como “baculovirus display”, produciendo una respuesta innata inespecífica (Gronowski AM., *et al.* 1999, Abe T., *et al.* 2003, Facciabene A., Auricchio L., and La Monica N. 2004, Airene KJ., *et al.* 2013, Meneses-Ruiz DM., *et al.* 2015).

Todas las vacunas comerciales modernas llevan algún tipo de adyuvante, los inmunólogos consideran que no es factible montar una respuesta inmune robusta y selectiva sin el uso de algún adyuvante. El hecho de que las nanopartículas producidas por PH₍₁₋₁₁₀₎: (PH₍₁₋₁₁₀₎-gB, PH₍₁₋₁₁₀₎-gC y PH₍₁₋₁₁₀₎-gD) montaron una respuesta inmune protectora sin adyuvante sugiere fuertemente que estas nanopartículas tienen una capacidad de adyuvante.

El presente es el primer estudio utilizando estas nanopartículas como vacunas, mas estudios serán necesarios para validar su uso y para determinar si son efectivas con todos los antígenos o solo con algunos de ellos. En el presente trabajo solamente exploramos 3 antígenos del mismo agente infeccioso. Igualmente, estas nanopartículas podrían funcionar como un sistema de purificación robusto y económico, ya que los péptidos o proteínas fusionados pueden ser fácilmente purificados mediante centrifugación de baja velocidad. El acoplamiento de estas nanopartículas con el sistema de expresión de células de insecto podría ser un nuevo paradigma para la producción masiva y purificación eficiente de proteínas

recombinantes con uso industrial o médico. En este sentido, también será necesaria mucha más experimentación para validar métodos de purificación, eficiencia y estabilidad de las partículas *in vitro* e *in vivo*.

Las nanopartículas basadas en fragmentos de la poliedrina prometen un futuro interesante en el área de biomateriales con uso en veterinaria y medicina, así como de otras áreas del conocimiento, el futuro de la nanobiotecnología.

Bibliografía

1. Assenberg R; Wan PT; Geisse S; Mayr LM. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Current Opin Struct Biol* 2013, 23: 393–402.
2. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 2014, 5: 172. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.
3. Aydin H, Azimi FC, Cook JD, Lee JE. A Convenient and General Expression Platform for the Production of Secreted Proteins from Human Cells. *J Vis Exp* 2012, 31;(65). pii: 4041. doi: 10.3791/4041.
4. Wicks IP, Howell ML, Hancock T, Kohsaka H, Olee T, Carson DA. Bacterial lipopolysaccharide copurifies with plasmid DNA: implications for animal models and human gene therapy. *Hum Gene Ther* 1995, 6(3): 317-23.
5. Fernández FJ, Vega MC. Technologies to keep an eye on: alternative hosts for protein production in structural biology. *Curr Opin Struct Biol*. 2013, 23(3): 365-73. doi: 10.1016/j.sbi.2013.02.002.
6. van Oers MM. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. *J Invertebr Pathol* 2011, 107 Suppl: S3-15. doi: 10.1016/j.jip.2011.05.001.
7. Shi X, Jarvis DL. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system. *Curr Drug Targets* 2007, 8(10):1116-25.
8. van Oers MM, Pjilman GP, Vlak JM. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *J Gen Virol* 2015, 96 (Pt 1): 6-23.
9. Pennock GD, Shoemaker C, MillerLK. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol Cell Biol* 1984, 4(3): 399-406.
10. SmithGE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol* 1983, 3(12): 2156-65.
11. Buchs M, Kim E, Pouliquen Y, Sachs M, Geisse S, Mahnke M, Hunt I. High-throughput insect cell protein expression applications. *Methods Mol Biol* 2009, 498: 199-227. doi: 10.1007/978-1-59745-196-3_14.
12. Contreras-Gómez A, Sánchez-Mirón A, García-Camacho F, Molina-Grima E, Chisti Y. Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnol Prog* 2014, 30(1): 1-18.

13. Srinivasan A, Rastogi A, Ayyavoo V, Srivastava S. Nanotechnology-based approaches for the development of diagnostics, therapeutics, and vaccines. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 2014, 33(3): 186-91. doi: 10.1089/mab.2014.0045.
14. Tan M, Jiang X. Subviral particle as vaccine and vaccine platform. *Curr Opin Virol* 2014, 6: 24-33. doi: 10.1016/j.coviro.2014.02.009.
15. Chroboczek J, Szurgot I, Szolajska E. Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochim Pol* 2014, 61(3):531-9.
16. Jain NK, Sahni N, Kumru OS, Joshi SB, Volkin DB, Russell Middaugh C. Formulation and stabilization of recombinant protein based virus-like particle vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 2014, 24. pii: S0169-409X(14)00231-2. doi: 10.1016/j.addr.2014.10.023.
17. Blissard GW, Rohrmann GF. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu Rev Entomol* 1990, 35: 127-55.
18. Herniou EA, Jehle JA. Baculovirus phylogeny and evolution. *Curr Drug Targets* 2007, 8(10): 1043-50.
19. ictv.org/virus-taxonomy.asp
20. Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlcek JM. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch Virol* 2006, 151(7): 1257-66.
21. Herniou EA, Olszewski JA, Cory JS, O'Reilly DR. The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annu Rev Entomol* 2003, 48: 211-34.
22. Smith GE, Summers MD. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology* 1978, 89(2): 517-27.
23. van Oers MM, Vlcek JM. Baculovirus genomics. *Curr Drug Targets* 2007, 8(10): 1051-68.
24. Jarvis DL, Bohlmeier DA, Garcia A Jr. Requirements for nuclear localization and supramolecular assembly of a baculovirus polyhedron protein. *Virology* 1991; 185(2): 795-810.
25. Luz-Madrigal A, Asanov A, Camacho-Zarco AR, Sampieri A, Vaca L. A cholesterol recognition amino acid consensus domain in GP64 fusion protein facilitates anchoring of baculovirus to mammalian cells. *J Virol* 2013, 87(21): 11894-907. doi: 10.1128/JVI.01356-13.
26. Braunagel SC., Summers MD. Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. *Virol* 1994, 202; 315-328.

27. Braunagel SC, Russell WK, Rosas-Acosta G, Russell DH, Summers MD. Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100(17): 9797-802.
28. Whitt MA, Manning JS. A phosphorylated 34-kDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body. *Virology* 1988, 163(1): 33-42.
29. Gombart AF, Pearson MN, Rohrmann GF, Beaudreau GS. Abaculovirus polyhedral envelope-associated protein: genetic location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization. *Virology* 1989, 169(1): 182-93.
30. Chaabihi H, Cêtre C, Berne A. A new vector for efficient generation of ρ 10-single-late-promoter recombinant baculoviruses. *J Virol Methods* 1997, 63(1-2): 1-7.
31. Kelly BJ, King LA, Possee RD. Introduction to baculovirus molecular biology. *Methods Mol Biol* 2007, 388: 25-54.
32. Woo SD, Kim WJ, Kim HS, Jin BR, Lee YH, Kang SK. The morphology of the polyhedra of a host range-expanded recombinant baculovirus and its parents. *Arch Virol* 1998, 143(6): 1209-14.
33. Rohrmann GF. Polyhedrin structure. *J Gen Virol* 1986 Aug;67 (Pt 8):1499-513.
34. Coulibaly F, Chiu E, Ikeda K, Gutmann S, Haebel PW, Schulze-Briese C, Mori H, Metcalf P. The molecular organization of cypovirus polyhedra. *Nature* 2007, 446(7131): 97-101.
35. Coulibaly F, Chiu E, Gutmann S, Rajendran C, Haebel PW, Ikeda K, Mori H, Ward VK, Schulze-Briese C, Metcalf P. The atomic structure of baculovirus polyhedral reveals the independent emergence of infectious crystals in DNA and RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106(52): 22205-10. doi: 10.1073/pnas.0910686106.
36. Ji X, Sutton G, Evans G, Axford D, Owen R, Stuart DI. How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses. *EMBO J* 2010, 29: 505–14.
37. Ijiri H, Coulibaly F, Nishimura G, Nakai D, Chiu E, Takenaka C, *et al.* Structure-based targeting of bioactive proteins into cypovirus polyhedra and application to immobilized cytokines for mammalian cell culture. *Biomaterials* 2009, 30: 4297–308. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.04.046.
38. Chiu E, Coulibaly F, Metcalf P. Insect virus polyhedra, infectious protein crystals that contain virus particles. *Curr Opin Struct Biol* 2012, 22: 234–40. doi: 10.1016/j.sbi.2012.02.003.
39. Nishishita N, Ijiri H, Takenaka C, Kobayashi K, Goto K, Kotani E, *et al.* The use of leukemia inhibitory factor immobilized on virus-derived polyhedra to support the

proliferation of mouse embryonic and induced pluripotent stem cells. *Biomaterials* 2011, 32:3555–63. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.063.

40. Matsumoto G, Ueda T, Shimoyama J, Ijiri H, Omi Y, Yube H, Sugita Y, Kubo K, Maeda H, Kinoshita Y, Arias DG, Shimabukuro J, Kotani E, Kawamata S, Mori H. Bone regeneration by polyhedral microcrystals from silkworm virus. *Sci Rep* 2012, 2: 935. doi: 10.1038/srep00935.
41. Furuta T, Ogawa T, Katsuda T, Fujii I, Yamaji H. Efficient production of an antibody Fab fragment using the baculovirus-insect cell system. *J Biosci Bioeng* 2010, 110: 577–81. doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.06.001.
42. Lee KS, Sohn MR, Kim BY, Choo YM, Woo SD, Yoo SS, Je YH, Choi JY, Roh JY, Koo HN, Jin BR. Production of classical swine fever virus envelope glycoprotein E2 as recombinant polyhedra in baculovirus-infected silkworm larvae. *Mol Biotechnol* 2012, 50(3): 211-20. doi: 10.1007/s12033-011-9431-5.
43. Chen L, Xiang X, Yang R, Hu X, Cao C, Malik FA, Wu X. Immobilization of foreign protein in BmNPV polyhedra by fusion expression with partial polyhedron fragments. *J Virol Methods* 2013, 194(1-2): 185-9. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.08.020.
44. Babu RP, O'Connor K, Seeram R. Current progress on bio-based polymers and their future trends. *Progress in Biomaterials* 2013, 2: 8.
45. Boraschi D, Italiani P. From Antigen Delivery System to Adjuvanticy: The Board Application of Nanoparticles in Vaccinology. *Vaccines (Basel)*. 2015, 3(4): 930-9. doi: 10.3390/vaccines3040930.
46. Qasim M, Lim DJ, Park H, Na D. Nanomaterials for enhanced immunity as an innovative paradigm in nanomedicine. *J Nanosci Nanotechnol* 2014, 14(10): 7374-87
47. Seth A, Oh DB, Lim YT. Nanomaterials for enhanced immunity as an innovative paradigm in nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)*. 2015, 10(6):959-75. doi: 10.2217/nnm.14.200.
48. Hitchman RB, Possee RD, King LA. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. *Recent Pat Biotechnol* 2009, 3: 46–54.
49. Trowitzsch S, Bieniossek C, Nie Y, Garzoni F, Berger I. New baculovirus expression tools for recombinant protein complex production. *J Struct Biol* 2010, 172: 45–54.
50. Gronowski AM, Hilbert DM, Sheehan KC, Garotta G, Schreiber RD. Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *J Virol* 1999, 73(12): 9944-51.
51. Abe T, Takahashi H, Hamazaki H, Miyano-Kurosaki N, Matsuura Y, Takaku H. Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *J Immunol* 2003, ;171(3): 1133-9.
52. Facciabene A, Auricchio L, and La Monica N. Baculovirus Vectors Elicit Antigen-Specific Immune Responses in Mice. *J Virol* 2004, 78(16): 8663-72.

53. Airene KJ, Hu YC, Kost TA, Smith RH, Kotin RM, Ono C, Matsuura Y, Wang S, Ylä-Herttuala S. Baculovirus: an insect-derived vector for diverse gene transfer applications. *Mol Ther* 2013, 21(4): 739-49. doi: 10.1038/mt.2012.286.
54. Meneses-Ruiz DM, Aguilar-Diaz H, Bobes RJ, Sampieri A, Vaca L, Laclette JP, Carrero JC. Protection against Amoebic Liver Abscess in Hamster by Intramuscular Immunization with an *Autographa californica* Baculovirus Driving the Expression of the Gal-Lectin LC3 Fragment *Biomed Res Int* 2015, 2015: 760598. doi: 10.1155/2015/760598.

Anexos

Derechos para el uso de figuras:

Fig 1. van Oers MM, Vlak JM. Baculovirus genomics. *Curr Drug Targets* 2007, 8(10): 1051-68.

BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Nov 26, 2015

This is a License Agreement between Alicia Sampieri ("You") and Bentham Science Publishers ("Bentham Science Publishers") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Bentham Science Publishers, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3755361072225
License date	Nov 11, 2015
Licensed content publisher	Bentham Science Publishers
Licensed content publication	Current Drug Targets
Licensed content title	None
Licensed copyright line	Copyright © 2007, Eureka Science Ltd.
Licensed content author	Monique M. van Oers and Just M. Vlak
Licensed content date	October,2007
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	Student
Format	Print, Electronic
Portion	cartoon
Number of cartoons	1
Rights for	Main product
Duration of use	Life of current edition
Creation of copies for the disabled	no
With minor editing privileges	yes
In the following language(s)	Other translation needs (specify specific language(s))
Specific languages	Spanish
With incidental promotional use	no

The lifetime unit quantity of new product	0 to 499
The requesting person/organization is:	Alicia Sampieri García
Title of your thesis / dissertation	Desarrollo de una vacuna recombinante contra la enfermedad de Aujeszky en partículas paracrystalinas biológicas.
Expected completion date	Oct 2015
Expected size (number of pages)	64
Customer Tax ID	MXSAGA6109056R7
Billing Type	Invoice
Billing Address	Alicia Sampieri Instituto de Fisiología Celular, UNAM Circuito escolar, Ciudad Universitaria México, Mexico 04510 Attn: Alicia Sampieri
Total	0.00 USD

1. **Fig 4 y 5** Ji X, Sutton G, Evans G, Axford D, Owen R, Stuart DI. How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses. EMBO J 2010, 29: 505–14.

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Nov 26, 2015

This Agreement between Alicia Sampieri ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3718861217250
License date	Sep 30, 2015
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	The EMBO Journal
Licensed Content Title	How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses
Licensed Content Author	Xiaoyun Ji, Geoff Sutton, Gwyndaf Evans, Danny Axford, Robin Owen, David I Stuart
Licensed Content Date	Dec 3, 2009
Pages	10
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic

Portion	Figure/table
Number of figures/tables	2
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1 and 2
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	Spanish
Title of your thesis / dissertation	Desarrollo de una vacuna recombinante contra la enfermedad de Aujeszky en partículas paracrystalinas biológicas.
Expected completion date	Oct 2015
Expected size (number of pages)	64
Requestor Location	Alicia Sampieri Instituto de Fisiología Celular, UNAM Circuito escolar, Ciudad Universitaria México, Mexico 04510 Attn: Alicia Sampieri
Customer VAT ID	MXSAGA6109056R7
Billing Type	Invoice
Billing Address	Alicia Sampieri Instituto de Fisiología Celular, UNAM Circuito escolar, Ciudad Universitaria México, Mexico 04510 Attn: Alicia Sampieri
Total	0.00 USD

Fig. 6 Curso de infecciones porcinas: La enfermedad de Aujeszky, Arias M., Sierr MA., Sánchez-Vizcaíno JM., <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/2/etiologia.htm>

Buenos días, Alicia.

No hay ningún problema en la utilización de la figura si se menciona el autor y fuente.

Saludos.

Juan Manuel Crespo Fernández

Director Comercial Iberia
Móvil: 629 427 649

laboratorios **syva** s.a.u.

Sede central: Avda. Párroco Pablo Díez, 49-57 (24010) León - España
Planta inmunológicos: Avda. Portugal s/n Parc. M15-M16 (24009) León - España
Tfn: 987 800 800 Fax: 987 802 452



Antes de imprimir este e-mail piense bien si es necesario hacerlo.

AVISO LEGAL:

De acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos, le informamos de que su dirección de correo electrónico así como el resto de los datos de carácter personal que nos facilite podrán entrar a formar parte de un fichero cuya finalidad es el mantenimiento de una agenda profesional, así como la gestión del servicio de correo electrónico. En cualquier momento puede ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición mediante comunicación escrita, dirigida a LABORATORIOS SYVA, S.A. Avda. Párroco Pablo Díez, 49-57 (24010) Trobajo del Camino, León.

La información contenida en este e-mail, como en los documentos adjuntos es información confidencial y privilegiada para uso exclusivo de la persona o personas a las que va dirigido. No está permitido acceder a este mensaje a cualquier otra persona distinta de los indicados. Si no es uno de los destinatarios o ha recibido este mensaje por error, cualquier duplicación, reproducción, distribución, así como cualquier uso de la información contenida o cualquier otra acción tomada en relación con el mismo están prohibidos y pueden ser ilegales.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Identification of fragments from *Autographa Californica* polyhedrin protein essential for self-aggregation and exogenous protein incorporation

Alicia Sampieri¹, Agustín Luz-Madrigal^{2,3}, Jesus Zepeda¹ and Luis Vaca^{1*}

Abstract

Background: Baculoviruses are widely used for the production of recombinant proteins, biopesticides and as gene delivery systems. One of the viral forms called polyhedra has been recently exploited as a scaffold system to incorporate or encapsulate foreign proteins or peptide fragments. However, an efficient strategy for foreign protein incorporation has not been thoroughly studied.

Results: Based on the crystal structure of polyhedrin, we conducted an *in silico* analysis of the baculovirus *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) polyhedrin protein to select the minimum fragments of polyhedrin that could be incorporated into polyhedra. Using confocal and transmission electron microscopy we analyzed the expression and cellular localization of the different polyhedrin fragments fused to the green fluorescent protein (EGFP) used as reporter. The amino fragment 1–110 contains two repeats formed each of two β sheets followed by a α helix (amino acids 1–58 and 58–110) that are important for the formation and stability of polyhedra. These fragments 1–58, 58–110 and 1–110 could be incorporated into polyhedra. However, only fragments 1–110 and 58–110 can self-aggregate.

Conclusions: These results demonstrate that 58–110 is the minimum fragment that contributes to the assembly of the recombinant polyhedra via self-aggregation. This is the minimum sequence that can be used to efficiently incorporate foreign proteins into polyhedra.

Keywords: *Autographa Californica*, Polyhedrin, Polyhedra, Baculovirus

Background

The development of eukaryotic systems for the expression of recombinant proteins has been a major goal in biotechnology due to its widespread utility in medicine, veterinary medicine, and agriculture, among other related areas [1].

The use of insect viruses to produce and to obtain different recombinant proteins has grown in recent decades [2,3]. Three of these eukaryotic systems are expressed in insect cells and are currently in use. Two of them are based on the DNA baculoviruses *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), and *Bombyx mori*

nucleopolyhedrovirus (BmNPV). The third uses the RNA virus *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV) cypovirus. In nature, the viruses of these 2 families are protected from adverse environmental conditions as they are occluded into crystalline lattices called polyhedra or occlusion bodies, derived mainly from a single viral protein called polyhedrin [4]. The occlusion is an adaptation that allows baculoviruses to remain in a dormant but infective state in the environment for decades [5].

Polyhedrin is one of the most abundant proteins in a baculovirus-infected cell, since its expression is driven by a very strong promoter [6]. Because polyhedrin is not necessary for the propagation of the virus, the DNA sequence of the protein can be replaced with some other sequence of interest [7]. This in turn, has allowed the

* Correspondence: lvaca@ifc.unam.mx

¹Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, DF 04510, México

Full list of author information is available at the end of the article

polyhedrin promoter to be used as an expression strategy for obtaining high yields of recombinant proteins.

Since BmNPV and BmCPV polyhedra are particles of about 1 μM in diameter and can be easily purified by centrifugation, they represent good candidates to express recombinant proteins. Using this strategy, Je et al. incorporated the green fluorescent protein (GFP) into the AcMNPV polyhedra by fusing it to the carboxyl terminus from the polyhedrin gene [8]. However, the expression of the recombinant protein did not form polyhedra [8]. Only the combined expression of both the wild type (WT) and the recombinant polyhedrin (GFP-polyhedrin) proteins resulted in the formation of polyhedra [8]. This result shows that fusing proteins to polyhedrin prevent the formation of polyhedra, but WT polyhedrin can rescue this phenotype. Nevertheless, these results highlight the little we understand about how polyhedra particles are formed in the nucleus of baculovirus infected cells.

The polyhedrins of baculoviruses and cypoviruses do not share a similar amino acid sequence [9]. However, the crystal structures of both polyhedra are indistinguishable between the two families in terms of their size and symmetry [10,11]. Thus, these conserved properties suggest that the crystal structure of polyhedra has been retained in nature for the specific purpose of preserving the viruses, and that such crystalline structure can be obtained using proteins with different amino acids compositions.

It has already been shown that the crystal structure from both the AcMNPV and the BmCPV polyhedra is an arrangement of polyhedrin trimers, which are interconnected through their amino N-terminal helices [10]. These interactions provide significant stability to the polyhedra, since the trimer is the base of the crystal core [11]. The identification of the properties of the crystallography structure has allowed investigators to determine the interacting amino acids in the crystal formation and to identify which of them are necessary for configuring the polyhedra core structure [11,10].

Despite the similarities in crystal symmetries and identical unit cell dimensions, structures of baculovirus and cypovirus polyhedrins are different at the atomic level. Both structures have a β -sandwich core domain, with projecting C- and N-terminal helices, but the topologies are dissimilar and the helices interact differently [12].

Based on these findings, Ijiri et al. incorporated several foreign proteins into BmCPV polyhedra by fusing them to the first 30 amino acids of polyhedrin, which contains an α helix known as H1 [13]. Because this fragment projects towards the outside of the protein, it forms independently as the molecule folds; it interacts with other molecules of polyhedrin and it is incorporated into polyhedra crystal structure. Thus, the co-expression of H1 with the WT polyhedrin is now widely used as a tag

to incorporate foreign proteins into BmCPV polyhedra [13-15].

More recently, recombinant polyhedra in BmNPV have been obtained by co-expressing the foreign proteins fused to the first 110 amino acid N-terminal fragment in combination with the complete WT polyhedrin [16,17]. The foreign proteins were then purified from polyhedra [16,17].

Because AcMNPV is one of the most widely used systems to express recombinant proteins, and given the fact that less is known about what fragments in the polyhedrin protein are sufficient to incorporate foreign proteins into polyhedra, we aimed the present study at determining the minimal fragment that can be used to incorporate foreign proteins into AcMNPV polyhedra. We first analyzed the amino terminal of AcMNPV polyhedrin considering the known crystal structure of the protein (Figure 1B and [10]). Based on the structural features, we produced different fragments to explore which ones can be incorporated into the polyhedra crystal.

These findings unravel the role of the amino region 58–110 from polyhedrin in the assembly of AcMNPV polyhedra, while providing the bases for a system to incorporate efficiently high levels of recombinant proteins into the polyhedra crystal.

Methods

Insect cell line and baculoviruses

The *Spodoptera frugiperda* cell line, Sf9, was maintained at 27°C in Grace medium (Invitrogen, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (56°C, 30 min) (Wisent, Inc., Canada), 1X Yeastolate (Invitrogen, USA), 1X Lactalbumin (SIGMA, USA), and 1X Antibiotic-antimycotic (Invitrogen, USA) according to standard methods. For suspension cultures, pluronic acid F-68 at a final concentration of 0.1% was added and the cells were sub-cultured every 2 to 3 days. The BacN-blue system (Invitrogen, USA) was used for the construction of the recombinant baculovirus (see below). The WT and recombinant AcMNPVs used in the present study were propagated in Sf9 cells.

Generation of the recombinant baculovirus

The complete polyhedrin gene was obtained by PCR amplification using the Baculovirus forward and reverse PCR primers (Invitrogen, USA) and cloned into pEGFP-C2 (Clontech, USA). The recombinant baculoviruses with the different fragments of polyhedrin were constructed by digestion with restriction enzymes or by PCR amplification of the constructions. These PCR fragments were cloned to pEGFP-N1, -N2 or -N3 (Clontech, USA) as needed to obtain the fusion proteins with an open reading frame. The recombinant plasmid vectors were confirmed by restriction endonuclease analysis and sequencing. All

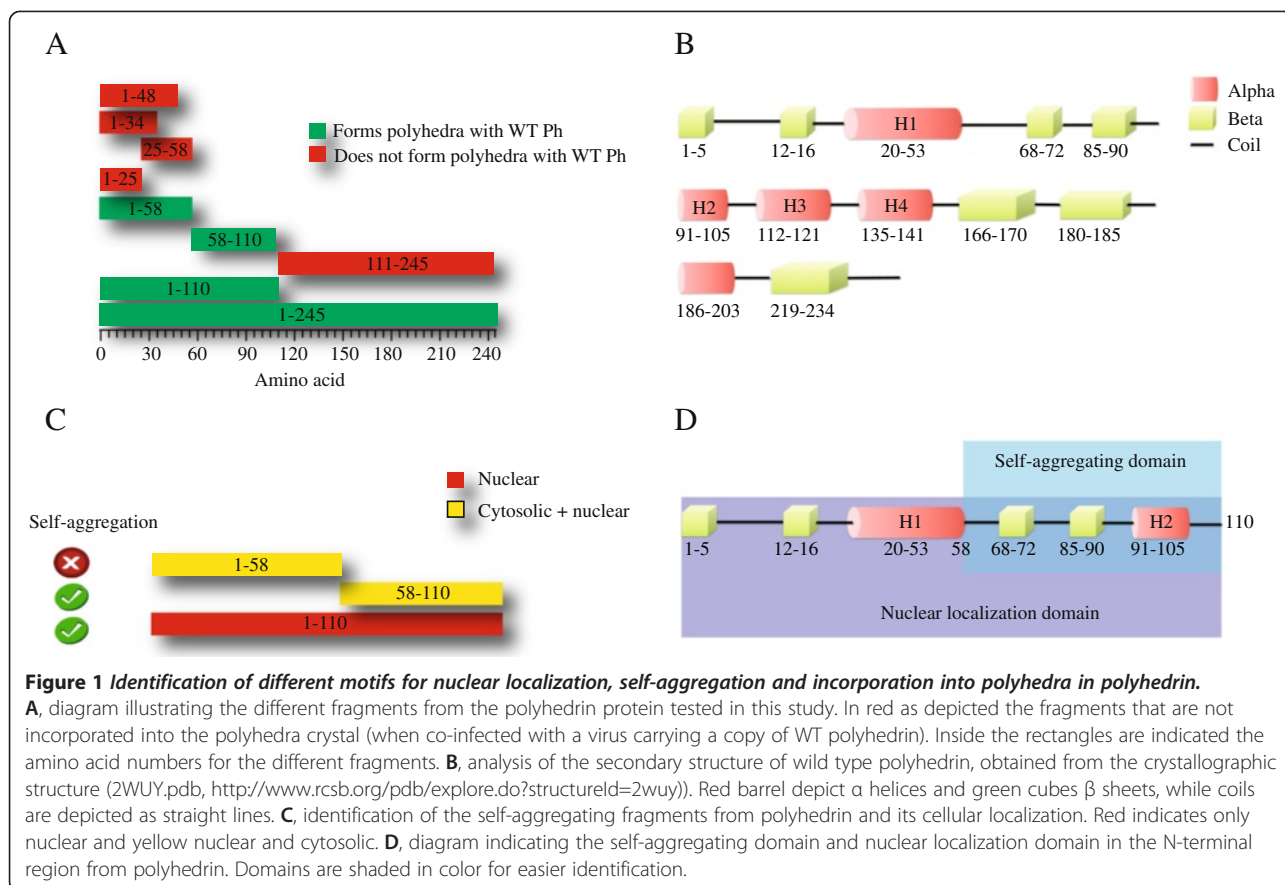


Figure 1 Identification of different motifs for nuclear localization, self-aggregation and incorporation into polyhedra in polyhedrin.

A, diagram illustrating the different fragments from the polyhedrin protein tested in this study. In red as depicted the fragments that are not incorporated into the polyhedra crystal (when co-infected with a virus carrying a copy of WT polyhedrin). Inside the rectangles are indicated the amino acid numbers for the different fragments. **B**, analysis of the secondary structure of wild type polyhedrin, obtained from the crystallographic structure (2WUY.pdb, <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2wuy>). Red barrel depict a helices and green cubes β sheets, while coils are depicted as straight lines. **C**, identification of the self-aggregating fragments from polyhedrin and its cellular localization. Red indicates only nuclear and yellow nuclear and cytosolic. **D**, diagram indicating the self-aggregating domain and nuclear localization domain in the N-terminal region from polyhedrin. Domains are shaded in color for easier identification.

the fusion genes of EGFP-polyhedrin were then sub-cloned into the pBlueBac4 plasmid (Invitrogen, USA), which was used with the Bac-N-blue transfection kit (Invitrogen, USA) to obtain the recombinant baculoviruses. The recombinant baculoviruses were purified and then amplified to obtain high titer virus stocks. The baculovirus titer was obtained and expressed as plaque forming units (pfu) per milliliter according to standard protocols provided by the manufacturer (Invitrogen, USA).

Production and purification of recombinant polyhedra

Sf9 cells co-infected with the recombinant and WT viruses were collected by centrifugation at 96 hrs post-infection, resuspended in phosphate buffered saline (PBS; 20 mmol/L NaH_2PO_4 , 20 nmol/L Na_2HPO_4 , 150 mmol/L NaCl, pH 7.2) (Sigma, USA), and fragmented ultrasonically three times for 30 s each (Braun Biotech International, Germany), followed by centrifugation at 12,000 g at 4°C for 10 min. The pellets were then washed 2X with PBS and then finally resuspended in PBS buffer.

Confocal microscopy 3D reconstructions and electron microscopy scanning

The recombinant purified polyhedra of infected insect cells were allowed to adhere to each of the wells of a

LabTek II Chamber Slide (NalgeNunc Int, USA). The polyhedra or cells were washed three times with PBS and fixed with mounting medium (DakoCytomation, USA). The infected insect cells were incubated with DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride), Molecular Probes, USA) at a dilution 1:1000 for 5 min before fixation with DAKO Cytomation fluorescence mounting media (DakoCytomation, Denmark). Images were collected with an Olympus FV1000 confocal microscope and analyzed using Fluoview 10-ASW-2.1 software (Olympus, Japan). Image acquisition using transmission electron microscopy (TEM) of infected cells was conducted according to established protocols. Briefly, the cells were washed with 0.08 M cacodylate buffer (Sigma St. Louis, MO) and fixed for 10 min with 0.6% glutaraldehyde (Sigma St. Louis, MO) and 0.4% paraformaldehyde in 0.08 M cacodylate buffer, pH 7.4. Post-fixation was made with 1% osmium tetroxide (Fluka, St. Louis, MO) in cacodylate buffer. Thin sections were counterstained with uranyl acetate for 10 minutes and with lead citrate for 2.5 minutes. Observations were made in a Jeol 1010 electron microscope (Jeol USA, Peabody, MA).

Flow cytometry studies

The polyhedra crystals containing the different fragments of polyhedrin fused to EGFP were purified as

indicated above. Purified crystals were subjected to confocal microscopy and TEM to validate its purity. In all cases basically no cellular debris was observed. Polyhedra crystals were introduced into the sorting chamber of a fluorescence-activated cell sorting (FACS) apparatus (FACSCalibur, BD Biosciences). Event counting was terminated at 10,000 events as previously described [18].

Fluorescence signal was collected at 525 nm (EGFP emission peak) and plotted in logarithmic scale in histograms illustrated in Figure 2A. Counts or events reflect single polyhedra particles. These measurements were utilized to calculate the percentage of GFP positive crystals, using wild type polyhedra (without EGFP) to identify the autofluorescence (background) level.

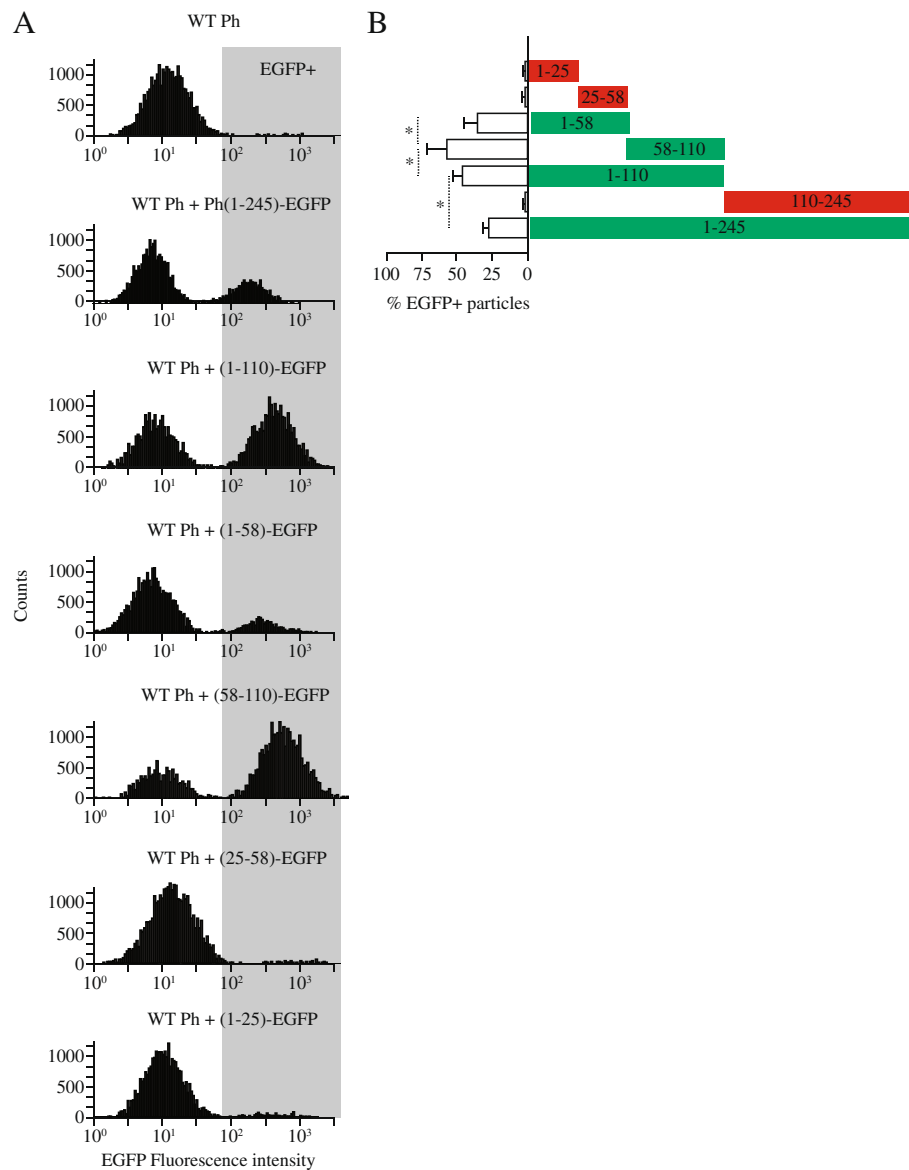


Figure 2 Different efficiencies of incorporation into the polyhedra crystals obtained with the different fragments studied. **A**, flow cytometry studies of purified polyhedra crystals obtained with the different fragments indicated in the figure. In all cases a MOI of 1 was used for each EGFP containing polyhedrin fragment and a MOI of 3 for wild type polyhedrin. Crystals purified from Sf9 cells subjected to sonication (Methods). Fluorescence intensity collected in the 525 nm emission channel (Methods). In all cases 10,000 events were collected for each polyhedra. Autofluorescence (fluorescence background) was determined using wild type polyhedra (without EGFP), as indicated in the first panel at the top. Using this background level we identified the EGFP positive fluorescence (EGFP+, indicated by the gray rectangle). **B**, percentage of EGFP+ events (individual polyhedra crystals) obtained from the histograms shown in A. Notice polyhedra crystals produced with fragment PH₍₅₈₋₁₁₀₎EGFP produced the highest EGFP intensity values, followed by PH₍₁₋₅₈₎EGFP and PH₍₁₋₁₁₀₎EGFP. Notice that PH₍₁₋₂₅₎EGFP, PH₍₂₅₋₅₈₎EGFP and PH₍₁₁₀₋₂₄₅₎EGFP did not produce fluorescent polyhedra. Flow cytometry data is in agreement with the results obtained with confocal microscopy (Figure 7).

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

NTA is becoming a standard method for submicron (nanoparticle) particle analysis [19]. This technique combines laser light scattering microscopy with a charge-coupled device (CCD) camera, enabling the visualization and tracking of nanoparticles in solution. Nanoparticle sizing is derived from the Stokes-Einstein equation by studying the Brownian motion of the nanoparticles and the way light is scattered during motion [20]. Thus, this method is particularly useful for studying nanoparticles in suspension and can identify nanoparticle aggregates [20]. For these experiments we have utilized the NanoSight NTA system from Malvern (Amesbury, United Kingdom). Purified nanoparticles from PH₍₁₋₁₁₀₎EGFP and PH₍₅₈₋₁₁₀₎EGFP were introduced in the system at two different concentrations. Particle sizes and particle concentration was obtained from direct measurements with NanoSight. Data represents the analysis from millions of events and is given by particle sizes per milliliter (Figure 3D).

Polyhedrin modeling

The crystal structure of the wild type AcMNPV polyhedrin (2WUY.pdb, <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do>)

was utilized in the identification of the polyhedrin secondary structure, which directed the generation of the different polyhedrin fragments reported in this study.

Results

Recombinant baculoviruses expressing polyhedrin fused to EGFP

In order to visualize the expression and localization of polyhedrin and polyhedra in the infected cells, we developed several recombinant baculoviruses containing different fragments from the polyhedrin gene fused to the enhanced green fluorescent protein (EGFP). The baculovirus were designated according to the amino acid fragment of polyhedrin: WT polyhedrin (PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP), and the different fragments of polyhedrin: amino acids 1-25 (PH₍₁₋₂₅₎EGFP), 1-34 (PH₍₁₋₃₄₎EGFP), 1-48 (PH₍₁₋₄₈₎EGFP), 1-58 (PH₍₁₋₅₈₎EGFP), 17-58 (PH₍₁₇₋₅₈₎EGFP), 58-110 (PH₍₅₈₋₁₁₀₎EGFP), 1-110 (PH₍₁₋₁₁₀₎EGFP), and 111-245 (PH₍₁₁₁₋₂₄₅₎EGFP). All recombinant genes were under the control of the polyhedrin promoter in the recombinant baculoviruses. All polyhedrin fragments were cloned at the N-terminal of the EGFP except for PH₍₁₋₂₄₅₎EGFP which was cloned at both the N- and C-

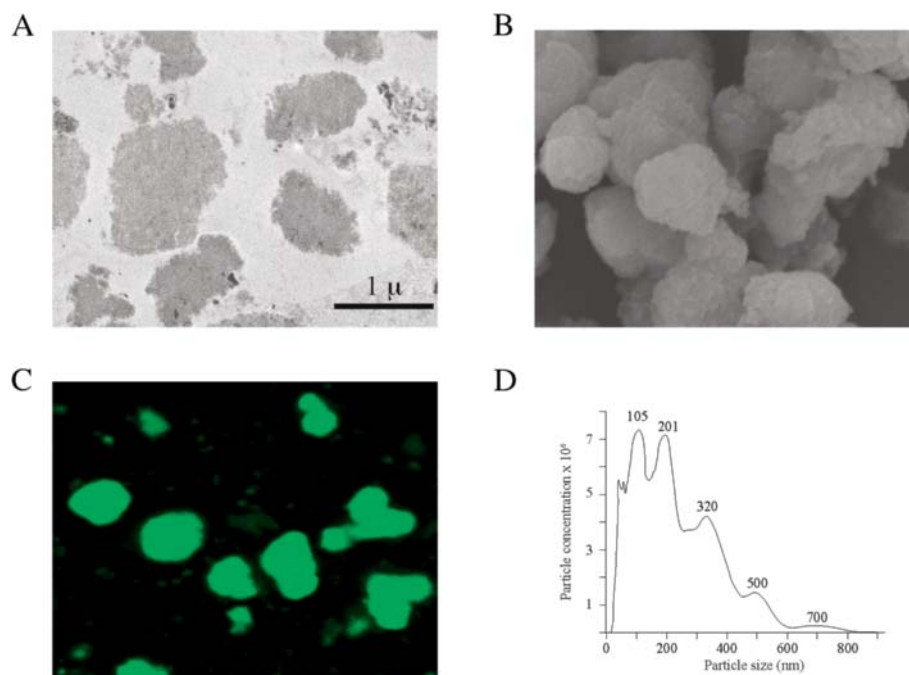


Figure 3 Polyhedrin 58-110 and 1-110 produce electron dense nanoparticles. **A**, Representative transmission electron microscopy (TEM) of the segment of the cell nucleus from a Sf9 cell infected with a recombinant baculovirus expressing PH₍₁₋₁₁₀₎EGFP. The bar scale indicates 1 micron and applies to all panels in the figure. **B**, representative scanning electron microscopy of purified nanoparticles produced by the expression of PH₍₁₋₁₁₀₎EGFP. **C**, confocal microscopy of purified nanoparticles produced by the expression of PH₍₁₋₁₁₀₎EGFP. **D**, identification of main nanoparticle sizes in solution using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Notice that all nanoparticles identified are multiples of the smallest size identified with NTA of approximately 100 nm. Numbers next to each peak identify the mean peak nanoparticle size value in nanometers (nm). All nanoparticles were purified from Sf9 lysates and isolated by low speed centrifugation, as indicated in material and methods. Identical nanoparticles were observed when using PH₍₅₈₋₁₁₀₎EGFP (data not shown).

terminal of the EGFP. Because we obtained indistinguishable results with both constructs, we will describe here only PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP. In order to obtain polyhedra, a second recombinant baculovirus carrying the wild type copy of polyhedrin was utilized in co-infections with all baculoviruses carrying fragments from the polyhedrin gene (listed above).

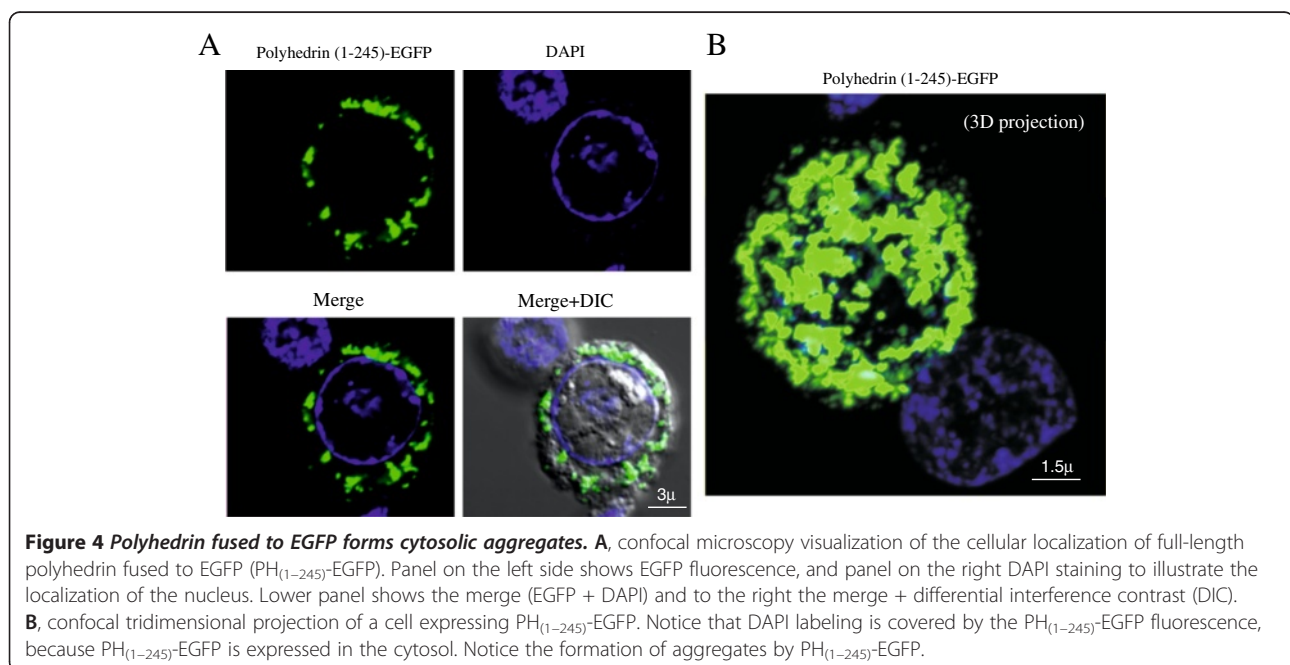
Recombinant PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP was expressed in the cytoplasm of Sf9 infected cells but it retains the ability to form aggregates

The distribution of PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP was analyzed by confocal microscopy in Sf9 infected cells. Figure 4 shows that the recombinant PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP did not form polyhedra. Similar results were observed in cells infected with the same polyhedrin fragment cloned in the N-terminus of EGFP (data not shown). In both cases EGFP was observed as aggregates (see 3-D confocal projection) localized at the cytoplasm of the cells. EGFP never colocalize with DAPI counterstained nuclei, demonstrating the cytosolic localization of PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP (Figure 4). These findings suggested that the EGFP disrupts the transit of the full-length polyhedrin to the nucleus, preventing the assembly of polyhedra. Nevertheless, this construct can form aggregates on its own (without wild type polyhedrin).

WT polyhedrin is required for the formation of polyhedra

In order to obtain recombinant polyhedra with EGFP incorporated into the crystals, we performed a series of co-infections using both WT and recombinant baculoviruses carrying PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP. In all these experiments two

viruses were used, one carrying a WT copy of full-length polyhedrin, and a second virus carrying the corresponding polyhedrin fragment fused to EGFP. After performing a WT baculovirus- PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP baculovirus co-infection titration, we concluded that the ratio of WT polyhedrin to recombinant PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP was critical for the formation of polyhedra (Figure 5). Figure 5A shows tridimensional confocal reconstructions of Sf9 cells co-expressing PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP and the WT polyhedrin, obtained by maintaining the multiplicity of infection (MOI) of the baculovirus PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP at 1 and by increasing the MOI of baculovirus carrying the WT copy of polyhedrin from 0.5, 1, 2, 3 and 5 MOI. In Figure 5B, a pixel colocalization analysis of EGFP/DAPI shows that polyhedra formation in the cell nucleus occurred when a ratio of 3 or more MOI of WT polyhedrin to 1 MOI of PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP was used. This result revealed that WT polyhedrin had to be co-expressed in order for recombinant polyhedrin fragments carrying EGFP to locate and assemble into polyhedra in the nuclei of the cells. The requirement of WT polyhedrin for the formation of recombinant polyhedra has been previously demonstrated for other baculoviruses [17,21,22]. Interestingly, the ratio of WT and recombinant polyhedrin copy has not been determined until now. Our study highlights the need to use an adequate ratio (3:1) of WT versus recombinant polyhedrin in order to secure the incorporation of all recombinant copies into polyhedra. Altering this ratio results in an excess of soluble recombinant polyhedrin copies suspended in the cell cytosol. The 3:1 ratio is an interesting number, given the fact that the core of the polyhedra crystal is a trimer. These results suggest that every wild type trimer may



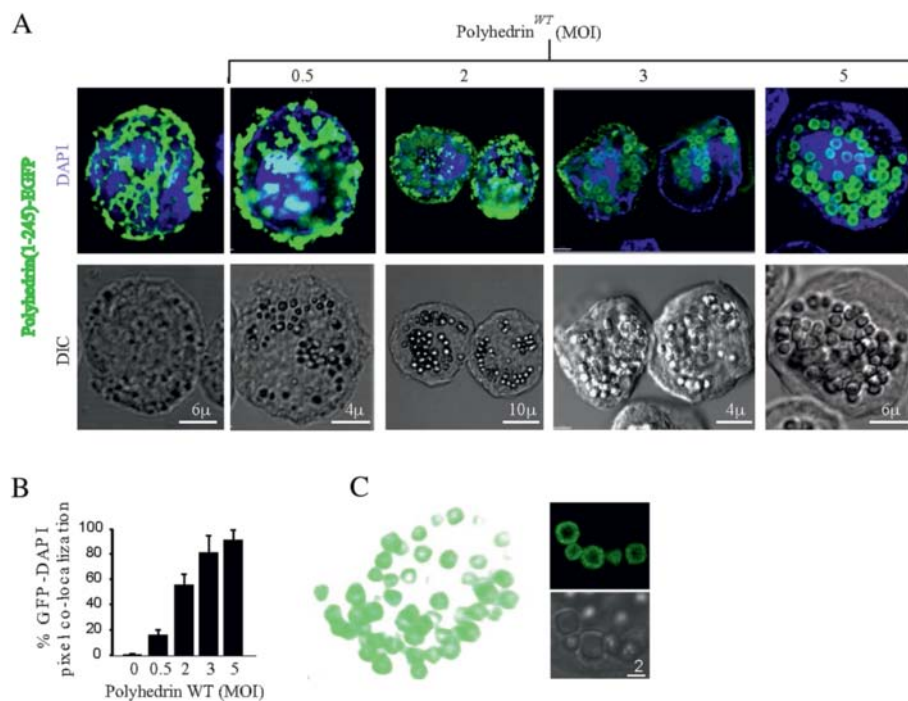


Figure 5 Titration of the amount of WT polyhedrin required to integrate PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP into the polyhedra crystal. **A**, upper panels show the fluorescence of PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP and DAPI, while lower panels show differential interference contrast (DIC) in cells co-infected with baculoviruses carrying PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP (multiplicity of infection, MOI = 1) and a second baculovirus carrying a wild type copy of polyhedrin. The second baculovirus was utilized at increasing MOIs of 0.5, 1, 2, 3, 4 and 5 (only 4 MOIs shown for illustration purposes). Notice that at a MOI of 3 (and above), all PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP was contained inside the polyhedra crystals. **B**, percentage of pixel co-localization between EGFP and DAPI, to determine the amount of PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP present inside the nucleus. Notice that with a MOI of 3, all PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP localizes in the nucleus (no differences were observed between MOIs of 3 and 5). **C**, polyhedra containing PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP were purified by centrifugation from Sf9 insect cells subjected to sonication. Notice that all polyhedra were fluorescent, indicating that PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP was present.

contain a copy of the PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP. Increasing the ratio of PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP results in soluble protein, suggesting that all possible sites have been occupied in the polyhedra and the excess PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP is discarded from the crystal structure.

Polyhedra-like formation in Sf9 cells infected with PH₍₁₋₁₁₀₎EGFP baculovirus

To evaluate the expression and localization of the recombinant baculoviruses containing the fused EGFP protein to different fragments of polyhedrin, we infected Sf9 cells with baculoviruses carrying the different fragments generated for this study (Figure 1A) and performed confocal and transmission electron microscopy (TEM) analysis with the cells expressing these fragments (Figure 6). The fragment PH₍₁₋₁₁₀₎EGFP aggregated in the nuclei (demonstrated by the co-localization with DAPI), indicating that the self-aggregation property of polyhedrin is retained in this fragment (Figure 6B). These self-aggregating structures have been previously described and named as polyhedra-like structures [4]. Similar results were obtained with the full length polyhedrin fused to EGFP (PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP, Figure 4). This observation

indicates that the nuclear retention signal is contained within the first 110 amino acids from polyhedrin, and that the traffic of polyhedrin to the nucleus is not affected by the fusion to EGFP. The fact that PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP and PH₍₁₋₁₁₀₎EGFP retained the property of self-aggregation but the carboxyl terminus of polyhedrin (PH₍₁₁₀₋₂₄₅₎EGFP) is soluble, strengthens the hypothesis that in the fragment PH₍₁₋₁₁₀₎EGFP is located the sequence/structure responsible for self-aggregation.

TEM images from cells expressing PH₍₁₋₁₁₀₎EGFP showed electron dense intranuclear protein aggregates, corresponding to the polyhedra-like structures observed in confocal microscopy (Figure 6C). Notice that these aggregates did not contain baculoviruses; rather viruses appeared to be discarded from the aggregates (insets C' and C''). Similar results were obtained with the full length PH₍₁₋₂₄₅₎-EGFP recombinant polyhedrin (data not shown).

Co-expression of PH₍₁₋₁₁₀₎EGFP with WT polyhedrin resulted in the formation of canonical polyhedra with EGFP contained within the crystal (Figure 6D). Interestingly, in confocal images of Sf9 cells infected with the PH₍₁₁₁₋₂₄₅₎EGFP baculovirus, the EGFP was observed

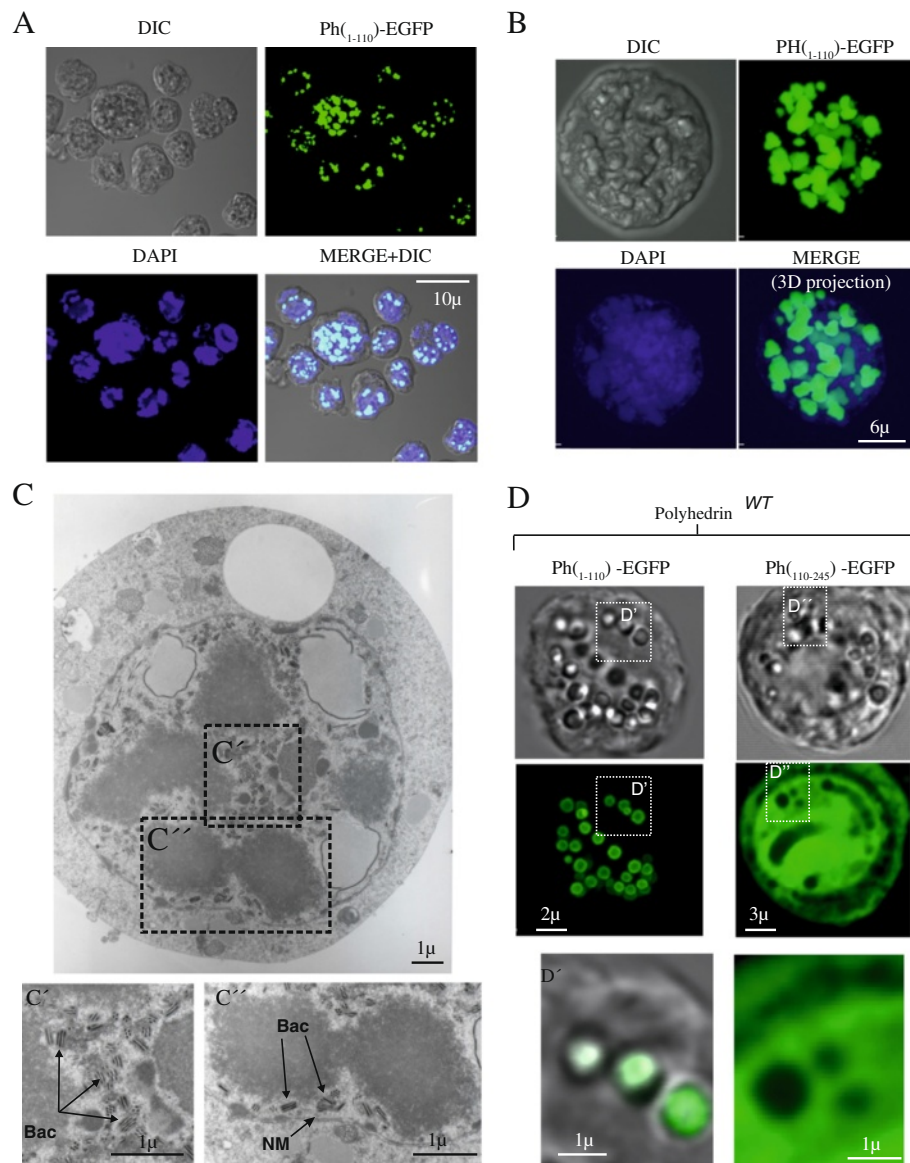


Figure 6 A wild type copy of polyhedrin is required to incorporate polyhedrin fragments into the crystal. **A**, confocal microscopy images illustrating that the polyhedrin fragment PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP forms aggregates inside the nuclei of infected cells (when expressed in the absence of WT polyhedrin). **B**, Tridimensional confocal reconstruction of a cell expressing PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP. Notice the formation of aggregates inside the nucleus. **C**, The PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP aggregates are visible in TEM as dense amorphous particles, and they do not contain baculoviruses inside. Notice that in fact viruses are excluded from the aggregates (C' and C'', indicates as Bac and arrows, NM = nuclear membrane). **D**, Only the amino terminal fragment from polyhedrin can be incorporated into polyhedra crystals (when co-expressed with wild type polyhedrin). Notice that only the fragment PH₍₁₋₁₁₀₎-EGFP form polyhedra (D'). The carboxyl terminus fragment PH₍₁₁₀₋₂₄₅₎-EGFP is not incorporated into the polyhedra crystals, in fact it is excluded from the crystal and observed as a soluble protein in the cell cytosol (D'').

scattered throughout the cell as a soluble protein (Figure 6D). This observation further confirms that the nuclear localization signal of polyhedrin is contained within the first 110 amino acids, as previously suggested [23], and that the self-aggregating sequence from polyhedra is present within the first 110 amino acids. All these results strongly suggest that only the amino

terminus from polyhedrin can be incorporated into polyhedra crystals (when co-expressed with WT polyhedrin).

To further investigate what fragments from the amino terminus of polyhedrin can be incorporated into the polyhedra, we prepared new recombinant baculoviruses containing several fragments from polyhedrin fused to EGFP.

Most interestingly, the baculoviruses expressing shorter fragment $\text{PH}_{(1-58)}\text{EGFP}$ was observed as a soluble protein in the cytosol and nucleus of infected cells, but the fragment $\text{PH}_{(58-110)}\text{EGFP}$ was observed as condensed, amorphous material in the nuclei and cytosol of the infected cells (Figure 7A). Co-expression with WT polyhedrin with both polyhedrin fragments resulted in canonical polyhedra formation with EGFP in the interior of the crystal (Figure 7B). These results indicate that the sequence/structure responsible for self-aggregation is in found within the 58–110 amino acids from polyhedrin, since the fragment $\text{PH}_{(1-58)}\text{EGFP}$ is soluble and does not aggregate on its own. Nevertheless both fragments can be incorporated into canonical polyhedra when co-expressed with WT polyhedrin. The fragment $\text{PH}_{(1-110)}\text{EGFP}$ can self-aggregate, but the aggregates are contained within the nuclei, strongly suggesting that the nuclear retention signal is found in the combination of fragments $\text{PH}_{(1-58)}\text{EGFP}$ and $\text{PH}_{(58-110)}\text{EGFP}$, since separately both fragments are distributed in the nuclei and cytosol, but when combined (in the fragment $\text{PH}_{(1-110)}\text{EGFP}$) are exclusively present in the nuclei.

These results suggest the presence of a putative nuclear retention signal shared by fragments 1–58 and 58–110. A previous study identified a nuclear retention signal present within the sequence 1–110 [23]. However, in the aforementioned study they did not test as many polyhedrin fragments as we did in the present study.

To delimit more precisely the minimum amino acid sequence capable of forming canonical polyhedra when co-expressed with WT polyhedrin, we produced several recombinant baculoviruses carrying different fragments from the amino terminus of polyhedrin. We concentrated in the first 58 amino acids, to further delimit the minimal sequence capable of being incorporated into polyhedra.

The fragments $\text{PH}_{(1-25)}\text{EGFP}$ and $\text{PH}_{(25-58)}\text{EGFP}$ did not form aggregates, neither they could be incorporated into the polyhedra when co-expressed with WT polyhedrin. Similar results were obtained with the fragment $\text{PH}_{(1-34)}\text{EGFP}$, $\text{PH}_{(1-48)}\text{EGFP}$, $\text{PH}_{(17-58)}\text{EGFP}$ or $\text{PH}_{(25-49)}\text{EGFP}$. These results indicate that the minimum fragment that can be incorporated into the polyhedra crystal is $\text{PH}_{(1-58)}\text{EGFP}$. Similarly, the fragment $\text{PH}_{(58-110)}\text{EGFP}$

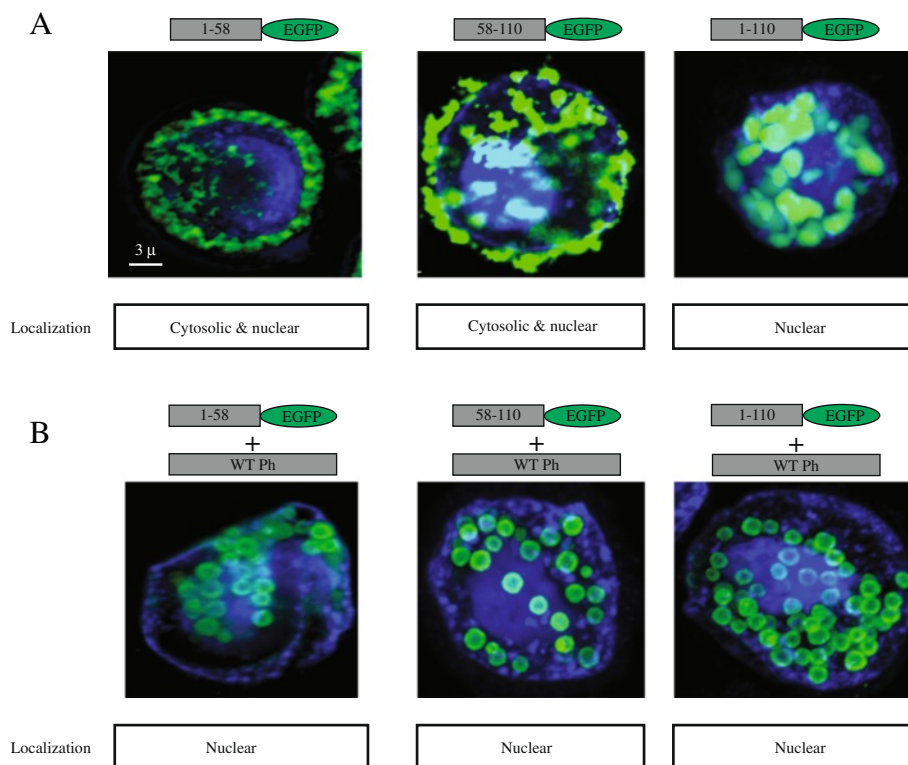


Figure 7 Identification of the minimum fragment from polyhedrin that retains the self-aggregation property. **A**, confocal microscopy studies using the fragments $\text{PH}_{(1-58)}\text{EGFP}$, $\text{PH}_{(58-110)}\text{EGFP}$ and $\text{PH}_{(1-110)}\text{EGFP}$ alone, or in co-expression with WT polyhedrin (**B**). Boxes below each panel indicate cellular localization based on the degree of co-localization with the nuclear marker DAPI. Notice that fragment $\text{PH}_{(1-58)}\text{EGFP}$ is soluble and found in both the nucleus and the cytosol. Fragments $\text{PH}_{(58-110)}\text{EGFP}$ and $\text{PH}_{(1-110)}\text{EGFP}$ can form self-aggregates when expressed alone or be incorporated into polyhedra, when co-expressed with WT polyhedrin. Thus the minimum self-aggregating fragment identified in this study was $\text{PH}_{(58-110)}\text{EGFP}$.

was also incorporated into the polyhedra crystal, but we did not explore other sequences within this later fragment in the present study.

All the results presented in this study show that: a) fragments from the n-terminus of polyhedrin, namely 1–58 and 58–110 can also be incorporated into the canonical polyhedra (when co-expressed with WT polyhedrin), regardless of the cellular localization or the fact that they can self-aggregate (58–110) or not (1–58); b) fragments from the c-terminus of polyhedrin are soluble, found scattered throughout the cell cytosol and nuclei, and are not incorporated into the polyhedra (when co-expressed with WT polyhedrin). In fact, they were completely excluded from the polyhedra crystal, as illustrated in Figure 6D (see also insets D' and D'').

To obtain quantitative data about the effectiveness of the different fragments to be incorporated into the polyhedra crystal, we conducted flow cytometry studies with polyhedra formed by the combination of the different fragments from polyhedrin fused to EGFP and WT polyhedrin. Polyhedra were purified for these studies prior to conducting the flow cytometry studies (Methods).

Figure 2 shows the results of measuring EGFP fluorescence as reporter of the amount of fragments incorporated into the polyhedra crystals. Figure 2A illustrates typical histograms of single particle fluorescence and Figure 2B summarizes the results (mean \pm SD) from at least 3 independent measurements. As illustrated in the figure only fragments PH_(1–58)EGFP, PH_(58–110)EGFP, PH_(1–110)EGFP and the full length PH_(1–245)-EGFP were incorporated into polyhedra crystals. Most interestingly, the most fluorescent polyhedra was obtained with the fragment PH_(58–110)EGFP, followed by PH_(1–110)EGFP and the full length PH_(1–245)-EGFP. These results strongly suggest that using the fragment PH_(58–110)EGFP results in higher yields of recombinant protein incorporated into the polyhedra crystals.

As we have previously shown, both PH_(1–110)EGFP and PH_(58–110)EGFP produced electron dense particles identifiable by TEM. Interestingly, both nanoparticles can be isolated from Sf9 cell lysates and retain its structural features. Nanoparticles produced by fragment PH_(1–110)EGFP inside Sf9 infected cells are illustrated in Figure 3A. These nanoparticles produced by the self-aggregating PH_(1–110)-EGFP can be isolated from Sf9 lysates, as illustrated in the electron scanning images from Figure 3B. The nanoparticles have integrated EGFP and the fluorescence is observed by confocal microscopy (Figure 3C). Using an alternative method for nanoparticle size analysis based on Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) we identified that both PH_(1–110)EGFP and PH_(58–110)EGFP produced nanoparticles of about 100 nm in diameter (6D). Notice that the main nanoparticles identified are multiples of

100 nm, which was the most abundant and smallest size identified (6D).

Figure 1A summarizes the fragments that can be incorporated into polyhedra, when co-expressed with WT polyhedrin. Figure 1B illustrates the secondary structure of polyhedrin, obtained from the crystal [10]. As indicated in this figure, polyhedrin is formed of several consecutive β sheets and α helices. The crystallographic study of polyhedrin has identified the first helix (H1) as relevant for the formation of the polyhedrin trimer, which in turn forms the basic cell of the crystal [10,11].

Our studies have identified the fragment PH_(58–110)-EGFP as containing the sequence/structure essential for the self-aggregation properties of polyhedra (Figure 1C). Using this fragment results in self-aggregated particles scattered in the nuclei and cytosol of infected cells (Figures 1C and 7).

In spite of the fact that both minimal fragments that can be incorporated into polyhedra (PH_(1–58)EGFP and PH_(58–110)EGFP) when co-expressed with WT polyhedrin have similar structural features: both are formed by two consecutive β sheets followed by a α helix (Figure 1B), only the fragment PH_(58–110)EGFP retains the self-aggregation property of polyhedra.

All the results gathered in this study indicate that the sequence/structure required for a fragment to be incorporated into the polyhedra crystal are present in both fragments PH_(1–58)EGFP and PH_(58–110)EGFP. For this reason the fragment PH_(1–110)EGFP is also incorporated into polyhedra when co-expressed with WT polyhedrin. The fragment PH_(111–245)EGFP from the C-terminal region of polyhedrin was excluded from the polyhedra crystals (Figure 6D). Noteworthy, not all fragments were incorporated into polyhedra with the same efficiency, the most effective appeared to be PH_(58–110)EGFP (Figure 2B). This strongly suggest that the property that facilitates association to WT polyhedrin to form the crystal is in both fragments (PH_(1–58)EGFP and PH_(58–110)-EGFP), but the self-aggregation property is present exclusively in fragment PH_(58–110)EGFP. The sequence/structure required for nuclear localization appear to be a combination of fragments PH_(1–58)EGFP and PH_(58–110)-EGFP, since only the fragment PH_(1–110)EGFP showed exclusive nuclear localization.

Discussion

The baculovirus expression system has become a powerful tool for recombinant eukaryotic gene expression [24]. The initial production of recombinant proteins, directed under the strong promoter of polyhedrin, was carried out in cultured cells as soluble proteins. Several modifications have been made over the last ten years to improve the system in order to obtain larger protein yields or adequate the recombinant protein for mammalian

usage [25]. Some of these improvements include enhanced trafficking, folding and glycosylation, as well as preventing intracellular degradation. Another recently developed strategy has been the expression of foreign proteins incorporated into the polyhedra crystal [26]. Several proteins have been now incorporated into polyhedra, by fusing them to the full length polyhedrin in three different insect viruses [27].

Jarvis et al. fused different fragments of AcMNPV polyhedrin to two nonnuclear reporter proteins, β -galactosidase and β -glucuronidase to define its possible nuclear localization signal, and study the distribution and assembly of polyhedra by indirect immunofluorescence and by biochemical fractionation and SDS-PAGE of infected Sf9 [23]. The recombinant proteins produced diffuse or occlusion-like (self-aggregates) proteins, but none of them assembled into the polyhedra.

More recently, Je et al. using GFP fused to AcMNPV polyhedrin, observed the GFP in a soluble form in the nucleus and cytoplasm of infected cells [8]. Only when co-expressed with WT polyhedrin resulted in the formation of polyhedra. Using the elucidated crystal structure of AcMNPV polyhedra we constructed several baculovirus expressing the fluorescent protein EGFP fused to AcMNPV polyhedrin or to its different fragments in order to follow the formation of recombinant polyhedra by confocal microscopy or TEM in Sf9 infected cells.

The N-terminal from 1–110 amino acids of AcMNPV polyhedrin can be divided into two similar fragments (1–57 and 58–110) each of them consisting of two β helices (β_A , $\beta_{A'}$ and $\beta_{A''}$, β_B), followed by a short α helix (α_1 and α_2) Figure 1B and [10].

Because the 110 amino acids N-terminal region contributes to the clamping of the 3 molecules of polyhedrin in the trimer (the core of the crystal, [10]), we considered that as the fragment 1–110 of AcMNPV, these two smaller fragments (1–58 and 58–110) could associate and direct the incorporation of foreign proteins into polyhedra. Analyzing EGFP expression through confocal microscopy and TEM, allowed us to determine the localization and formation of polyhedra in infected Sf9 cells with different polyhedrin fragments.

We observed that the fragments $PH_{(1-58)}$, $PH_{(58-110)}$ and $PH_{(1-110)}$ of AcMNPV can be incorporated into polyhedra, only when co-expressed with the WT polyhedrin. The fact that polyhedra located in the nucleus is observed only when co-expressing WT and recombinant fragments of polyhedrin, suggest that the WT and the different N-terminal fragments identified in this study associate in the cytosol and travel, assembled with WT polyhedrin, to the nucleus of the infected cell. In agreement with this hypothesis, a previous study demonstrated that the nuclear localization of polyhedrin becomes more evident during the phase of occlusion due to the high rate

of polyhedrin localization signal and a higher rate of protein biosynthesis [28].

An important finding in the formation of polyhedra was the ratio of the recombinant fused polyhedrin fragments to the WT polyhedrin. Because the minimal unit of polyhedra crystals is a trimer, the association of the recombinant protein could be carried out in a stoichiometric ratio of 3 WT versus 1 recombinant polyhedrin (Figure 5A), and this parameter could be very important for the formation and quantity of foreign protein that could be incorporated into the crystal.

Noteworthy, not all fragments that incorporate into polyhedra result in equal amounts of fluorescence emitted by the EGFP incorporated into the particles. Most notably the fragment $PH_{(58-110)}$ EGFP produced the brightest particles in our study, as assayed by flow cytometry, followed by fragments $PH_{(1-110)}$ EGFP and $PH_{(1-58)}$ EGFP, in that order. Most surprisingly, the less efficient was the full length polyhedrin ($PH_{(1-245)}$ -EGFP, Figure 2B). Because the brightness of EGFP may reflect also geometric properties of the crystals formed by the different polyhedrin fragments, we conducted western blot analysis of the purified polyhedra formed by the combination of WT polyhedrin and the fragments presented in this study. In general agreement with the flow cytometry results, western blot analysis indicated different ratios of recombinant and WT polyhedrin present in the polyhedra particles (data not shown). These results strongly suggest a different incorporation efficiency for the different fragments studied here, pointing to $PH_{(58-110)}$ EGFP as the most efficient of all. The reasons behind the increased incorporation of $PH_{(58-110)}$ EGFP remains unsolved but are a target of a current study. Most interestingly, this was the minimum fragment that could form self-aggregates, thus a hint about the greater efficiency of incorporation into polyhedra may reside here.

The identification of the amino acids 58–110 as the smallest fragment capable of self-aggregation and efficient incorporation into polyhedra crystals from the N-terminal of AcMNPV is important in the development of new technologies to produce nanoparticles of interest in science and biotechnology, carrying foreign proteins of interest. Most interestingly, the self-aggregates produced by fragments $PH_{(1-110)}$ and $PH_{(58-110)}$ are electron dense particles, as identified in our TEM studies (Figures 3A and 6C), and they could be purified by low speed centrifugation as nanoparticles (Figure 3B-C). These later findings point to the use of fragment $PH_{(58-110)}$ as a powerful tool to produce high yields of recombinant protein that can be easily isolated by slow speed centrifugation from Sf9 cell lysates.

Conclusions

Using a deletion strategy based on the crystallographic structure of AcMNPV polyhedrin protein, we have

identified a minimum sequence (PH_(58–110)) consisting of two beta domains followed by an alpha helix, which contains a self aggregating domain essential for polyhedra-like particle formation. This deletion strategy allowed also the identification of a nuclear retention signal in polyhedrin, contained within the first 110 amino acids. Even though the fragment PH_(1–58) contains also two beta domains followed by an alpha helix, is not sufficient for self-aggregation, since the expression of this fragment results a soluble form contained in the cytosol of infected cells.

These findings open new avenues to explore how polyhedra crystals are formed, and to understand what structural features may be required for *in vivo* protein crystallization.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AS conducted experiments and wrote the manuscript first draft, AL-M and JZ conducted experiments and produced some of the figures, LV conducted experiments, supervised and designed all experiments and wrote the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) to LV. We would like to thank to Dr. Angelica Zepeda for critical reading of our manuscript and suggestions.

Author details

¹Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, DF 04510, México. ²Department of Biology and Center for Tissue Regeneration and Engineering, University of Dayton (TREND), Dayton, OH, USA. ³Department of Biology, Miami University, Oxford, OH, USA.

Received: 16 July 2014 Accepted: 15 January 2015

Published online: 04 February 2015

References

- Elias CB, Jardin B, Kamen A. Recombinant protein production in large-scale agitated bioreactors using the baculovirus expression vector system. *Methods Mol Biol.* 2007;388:225–46.
- Trowitzsch S, Bieniossek C, Nie Y, Garzoni F, Berger I. New baculovirus expression tools for recombinant protein complex production. *J Struct Biol.* 2010;172:45–54.
- Patterson RM, Sellkirk JK, Merrick BA. Baculovirus and insect cell gene expression: review of baculovirus biotechnology. *Env Heal Perspect.* 1995;103:756–9.
- Carstens EB, Krebs A, Gallerneault CE. Identification of an amino acid essential to the normal assembly of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra. *J Virol.* 1986;58:684–8.
- Ramoska WA, Stairs GR, Hink WF. Ultraviolet light activation of insect nuclear polyhedrosis virus. *Nature.* 1975;253:628–9.
- Matsuura Y, Possee RD, Overton HA, Bishop DH. Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J Gen Virol.* 1987;68(Pt 5):1233–50.
- Ooi BG, Miller LK. Transcription of the baculovirus polyhedrin gene reduces the levels of an antisense transcript initiated downstream. *J Virol.* 1990;64:3126–9.
- Je YH, Jin BR, Park HW, Roh JY, Chang JH, Seo SJ, et al. Baculovirus expression vectors that incorporate the foreign protein into viral occlusion bodies. *Biotechniques.* 2003;34:81–7.
- Rohrmann GF. Polyhedrin structure. *J Gen Virol.* 1986;67(Pt 8):1499–513.
- Ji X, Sutton G, Evans G, Axford D, Owen R, Stuart DL. How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses. *EMBO J.* 2010;29:505–14.
- Coulibaly F, Chiu E, Ikeda K, Gutmann S, Haebel PW, Schulze-Briese C, et al. The molecular organization of cypovirus polyhedra. *Nature.* 2007;446:97–101.
- Chiu E, Coulibaly F, Metcalf P. Insect virus polyhedra, infectious protein crystals that contain virus particles. *Curr Opin Struct Biol.* 2012;22:234–40.
- Ijiri H, Coulibaly F, Nishimura G, Nakai D, Chiu E, Takenaka C, et al. Structure-based targeting of bioactive proteins into cypovirus polyhedra and application to immobilized cytokines for mammalian cell culture. *Biomaterials.* 2009;30:4297–308.
- Nishishita N, Ijiri H, Takenaka C, Kobayashi K, Goto K, Kotani E, et al. The use of leukemia inhibitory factor immobilized on virus-derived polyhedra to support the proliferation of mouse embryonic and induced pluripotent stem cells. *Biomaterials.* 2011;32:3555–63.
- Matsumoto G, Ueda T, Shimoyama J, Ijiri H, Omi Y, Yube H, et al. Bone regeneration by polyhedral microcrystals from silkworm virus. *Sci Rep.* 2012;2:935.
- Furuta T, Ogawa T, Katsuda T, Fujii I, Yamaji H. Efficient production of an antibody Fab fragment using the baculovirus-insect cell system. *J Biosci Bioeng.* 2010;110:577–81.
- Lee KS, Sohn MR, Kim BY, Choo YM, Woo SD, Yoo SS, et al. Production of classical swine fever virus envelope glycoprotein E2 as recombinant polyhedra in baculovirus-infected silkworm larvae. *Mol Biotechnol.* 2012;50:211–20.
- Luz-Madrugal A, Asanov A, Camacho-Zarco AR, Sampieri A, Vaca L. A cholesterol recognition amino acid consensus domain in GP64 fusion protein facilitates anchoring of baculovirus to mammalian cells. *J Virol.* 2013;87:11894–907.
- Wright M. Nanoparticle tracking analysis for the multiparameter characterization and counting of nanoparticle suspensions. *Methods Mol Biol.* 2012;906:511–24.
- Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res.* 2010;27:796–810.
- Xiang X, Yang R, Chen L, Hu X, Yu S, Cao C, et al. Immobilization of foreign protein into polyhedra of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV). *J Zhejiang Univ Sci B.* 2012;13:111–7.
- Chen L, Xiang X, Yang R, Hu X, Cao C, Malik FA, et al. Immobilization of foreign protein in BmNPV polyhedra by fusion expression with partial polyhedrin fragments. *J Virol Methods.* 2013;194:185–9.
- Jarvis DL, Bohlmeier DA, Garcia A. Requirements for nuclear localization and supramolecular assembly of a baculovirus polyhedrin protein. *Virology.* 1991;185:795–810.
- Wang KC, Wu JC, Chung YC, Ho YC, Chang MD, Hu YC. Baculovirus as a highly efficient gene delivery vector for the expression of hepatitis delta virus antigens in mammalian cells. *Biotechnol Bioeng.* 2005;89:464–73.
- Hitchman RB, Possee RD, King LA. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. *Recent Pat Biotechnol.* 2009;3:46–54.
- Ikeda K, Nakazawa H, Shimo-Oka A, Ishio K, Miyata S, Hosokawa Y, et al. Immobilization of diverse foreign proteins in viral polyhedra and potential application for protein microarrays. *Proteomics.* 2006;6:54–66.
- Coulibaly F, Chiu E, Gutmann S, Rajendran C, Haebel PW, Ikeda K, et al. The atomic structure of baculovirus polyhedra reveals the independent emergence of infectious crystals in DNA and RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:22205–10.
- Jarvis DL, Bohlmeier DA, Garcia A. Enhancement of polyhedrin nuclear localization during baculovirus infection. *J Virol.* 1992;66:6903–11.