



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

***Diseño y generación de inmunógenos basados en
baculovirus para la prevención de la fiebre
hemorrágica argentina***

Tesista: Paula Nazarena Arrías

Director: Víctor Romanowski

Año: 2022

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (Área Ciencias Biológicas) ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM, UNLP-CONICET), del Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Prof. Dr. Víctor Romanowski.

Mi reconocimiento,

A la Universidad Nacional de La Plata, por la formación de grado y posgrado.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM), por brindarme la infraestructura necesaria para desarrollar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca otorgada.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por la financiación necesaria para el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros del IBBM (becarios, CPA, e investigadores), por cada mano y reactivo prestado sin pedir nada a cambio.

A los jurados que leerán esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio de Virología Molecular, por la compañía de todos los días, los momentos lindos vividos dentro y fuera del laboratorio durante estos 7 años.

A Victor, mi director, por sus enseñanzas (las científicas y las no tanto).

A mis amigos y a mi familia, por el amor y el apoyo incondicional.

(Y un poquito a mi, que aunque muchas veces dudé si podía, al final... pude!).

Índice

Índice	1
Abreviaturas y neologismos	6
Resumen	9
Abstract	11
Introducción general	13
Baculovirus	14
Biología de baculovirus	14
Regulación de la expresión génica	18
Genes tempranos	18
Replicación	18
Genes tardíos y muy tardíos	19
Sistema de expresión baculovirus-célula de insecto	21
Baculovirus como inmunógenos	24
Arenavirus	27
Biología de los arenavirus	27
Ciclo replicativo de los arenavirus	29
Fiebre hemorrágica argentina	32
Epidemiología	32
Curso clínico	34
Diagnóstico clínico y de laboratorio	35
Tratamiento	35
Profilaxis: vacuna Candid#1	36
Objetivos	39
Objetivo general	39
Objetivos específicos	39
Capítulo I - Baculovirus surface-display de GPC arenavirales	41
Introducción	42
GP64: Estructura y estrategias de exposición superficial	43
Fusión a GP64 completa	43
Fusión solo al péptido señal de GP64	43
Fusión al péptido señal, dominio transmembrana y cola citoplasmática de GP64	44
Estructura de la proteína GPC: desde la traducción a la formación de la espícula viral	45
Péptido señal estable (SSP)	45
Glicosilación del complejo G1/G2	46
Clivaje de G1/G2	46

Objetivo general	47
Objetivos específicos	47
Resultados	48
Diseño y generación de baculovirus recombinantes que expresan GPC del virus Junín y del virus Lassa con el tag V5	48
Diseño y generación de un baculovirus recombinante que expresa GPC de JUNV en fusión al CTD de GP64	50
Caracterización de los virus generados	51
Localización celular de GPC en células de insecto	52
Localización superficial de GPC en la membrana de los viriones brotantes	53
Conclusiones y discusión	55
Capítulo II - Procesamiento de GPC en células de insecto	57
Introducción	58
SKI-1/S1P: Subtilisin kexin isozyme-1	58
Antecedentes del procesamiento de la proteína GPC en células de insecto	60
Objetivo general	61
Objetivos específicos	61
Resultados	62
Clonado del cDNA de SKI-1/S1P	62
Alineamiento múltiple de los ortólogos de Homo sapiens, Mus musculus y Trichoplusia ni	62
Clonado del cDNA de SKI-1/S1P de Mus musculus en el vector de expresión pIP	64
Generación de un baculovirus recombinante que expresa SKI-1/S1P	64
Expresión de SKI-1/S1P murina en células High Five	66
Línea HighFive:mSKI1/S1P establemente transformada	67
Generación de la línea	67
Caracterización de la línea transgénica	67
Expresión del transgén	67
Susceptibilidad a infección por AcMNPV	68
Diseño y generación de un sensor de actividad	69
Procesamiento de GPC del virus Junín en línea celular wild type infectada con AcMNPV:MBTPS1	71
Procesamiento de GPC de JUNV y LASV en la línea HighFive:mSKI1/S1P	71
Conclusiones y discusión	73
Capítulo III - Virus-like particles derivadas del virus Junín	75
Introducción	76
Clasificación estructural de las VLP	76
Uso de las VLP como inmunógenos	77
VLP de arenavirus	78
Brotación viral y la proteína de matriz Z	78
Antecedentes de producción en células de mamífero	79
Objetivo general	81

Objetivos específicos	81
Resultados	82
Clonado de la proteína Z en fusión a la proteína EGFP	82
Clonado del ORF de Z wild-type de dos cepas distintas de JUNV	82
Mutagénesis sitio-dirigida del late-domain de Z	83
Mutagénesis del residuo L79 de Z	84
Expresión transitoria de las fusiones construidas en células de mamífero	85
Clonado de las distintas variantes de Z en el vector de transferencia pBacPAK9	86
Clonado de Z wild-type y la variante mutante del L-domain en el vector de expresión de insecto pIP	86
Generación de baculovirus recombinantes Zx::EGFP	87
Generación de líneas transgénicas High Five Zx::EGFP	88
Caracterización de la línea HighFive Z::EGFP	90
Tiempo de duplicación	90
Susceptibilidad a la infección por AcMNPV	90
Estabilidad de la línea	91
Evaluación de la producción de VLP de JUNV en el sistema BEVS	91
Ensayo de protección a proteinasa K	92
Generación de un baculovirus recombinante que expresa N de JUNV	93
Evaluación de la producción de multi-protein VLP de JUNV	94
Conclusiones y discusión	95
Resumen y perspectivas	98
Materiales y métodos	105
Materiales	106
Productos químicos y enzimáticos	106
Productos descartables de cultivo celular	106
Equipamiento	106
Soluciones	106
Soluciones para la extracción de plásmidos	107
Soluciones de antibióticos	107
Soluciones para electroforesis de ácidos nucleicos	107
Soluciones para el análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS / western blot	107
Soluciones utilizadas en reacciones con enzimas de restricción	108
Soluciones utilizadas para ultracentrifugación diferencial	108
Anticuerpos	108
Cepas bacterianas	109
Medios de cultivo	109
Métodos	110
Técnicas que involucran DNA	110
Preparación de DNA plasmídico	110
Extracción de bácmido	111

Precipitación de ácidos nucleicos	111
Electroforesis en geles de agarosa	112
Purificación de fragmentos de DNA por adsorción de DNA a polvo de sílice	112
Métodos de transformación y screening	113
Preparación de bacterias E. coli electrocompetentes	113
Transformación de E. coli por electroporación	113
Colony PCR	113
Reacciones de amplificación por PCR	114
Métodos que involucran cultivo celular	114
Mantenimiento de células	114
Congelamiento	114
Transfecciones	115
Generación de líneas celulares transgénicas	115
Ensayo de proliferación celular y determinación del tiempo de duplicación	116
Métodos que involucran manipulación de baculovirus en cultivo celular	116
Generación de baculovirus recombinantes	117
Purificación parcial y concentración de viriones brotantes de AcMNPV	117
Métodos que involucran VLP	118
Concentración y purificación de VLP	118
Ensayo de protección a proteinasa K	118
Lista de primers utilizados	119
Inmunofluorescencia	120
Bibliografía	122

Abreviaturas y neologismos

°C: grados celsius

aa: aminoácidos

AcMNPV: *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*

APC: células presentadoras de antígenos, del inglés *antigen presenting cells*

attachment: unión del virión al receptor

BEVS: sistema de expresión baculovirus-células de insecto, del inglés *baculovirus expression vector system*

bGOZA: bácido bApGOZA

BmMNPV: *Bombyx mori multiple nucleopolyhedrovirus*

BV: Viriones brotantes, del inglés *budded virus*

cDNA: ADN complementario

CTD: dominio citoplasmático, del inglés *cytoplasmic tail domain*

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DNA: ácido desoxirribonucleico (ADN)

Downstream: "río abajo", referido a la posición relativa desde el inicio de transcripción (hacia el lado 3')

DsRed: proteína roja fluorescente de *Discosoma sp.*

EGFP: proteína fluorescente verde, del inglés *enhanced green fluorescent protein*

ESCRT: complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte, del inglés *endosomal sorting complex required for transport*

eVLP: VLP envuelta, del inglés *enveloped VLP*

FHA: fiebre hemorrágica argentina

gDNA: ADN genómico

GMP: Buenas prácticas de manufactura, del inglés *good manufacturing practices*

GV: Granulovirus

h.p.i: horas post infección

h.p.t: horas post transfección

HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana, del inglés *Human immunodeficiency virus*

HPV: virus del papiloma humano, del inglés *Human papillomavirus*

IGR: región intergénica, del inglés *intergenic region*

IL-12: interleuquina 12

IL-6: interleuquina 6

JUNV: virus Junín

kDa: kiloDalton

kg: kilogramo

km: kilómetros

kpb: kilo pares de bases

L-domain: *late domain*

LASV: virus Lassa

LB: medio Luria-Bertani

LCMV: virus de la coriomeningitis linfocitaria, del inglés *Lymphocytic choriomeningitis virus*

mm: milímetro

MNPV: Multiple nucleopolyhedrovirus (nucleopoliedrovirus múltiple)

MOI: multiplicidad de infección, del inglés *multiplicity of infection*

mRNA: ácido ribonucleico mensajero (ARNm)

MW: patrón de peso molecular, del inglés *molecular weight*

NC: nucleocápside

NK: células natural killer

nm: nanómetro

NPV: Nucleopoliedrovirus

NW: *new world*

OB: Cuerpos de oclusión, del inglés *occlusion bodies*

ODV: Virión derivado de cuerpo de oclusión, del inglés *occlusion derived virus*

ON: un ciclo nocturno, del inglés *overnight*

ORF: marco de lectura abierto, del inglés *open reading frame*

ori: Origen de replicación

OW: *old world*

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *polymerase chain reaction*

polh: poliedrina

P_{polh}: promotor de poliedrina

QP: péptido de *quenching*

rBV: Baculovirus recombinante

RdRp: del inglés *RNA-dependent RNA polymerase* (RNA-polimerasa dependiente de RNA)

RE: retículo endoplasmático

RNA: ácido ribonucleico (ARN)

RNP: complejos ribonucleoproteicos, del inglés *ribonucleoprotein complexes*

RT-PCR: transcripción reversa – PCR, del inglés *reverse transcription polymerase chain reaction*

SFB: suero fetal bovino

SLiM: motivos lineales cortos, del inglés *short linear motifs*

SNPV: Simple nucleopolyhedrovirus (nucleopoliedrovirus simple)

SP: péptido señal, del inglés *signal peptide*

Spasa: peptidasa señal, del inglés *signal peptidase*

SSP: péptido señal estable, del inglés *stable signal peptide*

stem-loop: estructura de horquilla

STN: síndrome tardío neurológico

surface display: display superficial de un antígeno

Td: tiempo de duplicación

TfR1: receptor de transferrina 1

TLR9: receptor tipo-toll 9

TM: transmembrana

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

UV: ultravioleta

VLP: partícula/s pseudo-viral/es, del inglés *virus-like particles*

wild type: genotipo salvaje

WT: *wild type*

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

α -DG: alfa-distroglicano

μ m: micrómetro

Resumen

La fiebre hemorrágica argentina (FHA) es una enfermedad endemo-epidémica de la República Argentina cuyo agente etiológico es el virus Junín. La población en riesgo de contraer esta enfermedad es de aproximadamente 5 millones de personas que habitan el área endémica. Desde la década de los '90 se cuenta con una vacuna para la prevención de la FHA producida de manera local, denominada Candid#1, basada en una cepa atenuada del virus. Sin embargo, dada la naturaleza de la formulación, los elevados costos productivos y los posibles efectos adversos asociados a su administración, es de interés nacional la investigación y el desarrollo de alternativas a esta vacuna.

Los baculovirus son virus que infectan insectos, que han sido ampliamente utilizados y estudiados como herramientas de biología molecular por más de 40 años. En la actualidad, existe un sistema de expresión de proteínas heterólogas basado exclusivamente en los baculovirus y células de insectos (denominado BEVS), que constituye una plataforma biotecnológica eucariota, de costos de empleo reducidos y de bajo riesgo biológico.

En la presente tesis se exploró la generación de inmunógenos para la prevención de la fiebre hemorrágica argentina mediante el uso de la plataforma BEVS.

En el capítulo I se exploró el *display* superficial de las glicoproteínas de los arenavirus (GPC) en la envoltura de los viriones brotantes de baculovirus recombinantes. En el capítulo II, se buscó generar una línea celular de insecto transgénica, que exprese una enzima esencial para el correcto plegamiento de GPC en el sistema BEVS. Esto se debe a que los anticuerpos neutralizantes responsables de la protección otorgada por Candid#1 reconocen epítopes estructurales de la espícula viral.

Luego, en el capítulo III, se evaluó la generación de *virus-like particles* del virus Junín. Estas partículas son inmunógenos atractivos pues son capaces de exponer los antígenos virales de la misma manera que lo hacen los viriones de los cuales derivan, pero no poseen genoma, por lo cual no son replicativas, y resultan más seguras.

Por último se provee de una discusión general de los resultados y la proyección de perspectivas futuras.

Abstract

Argentine hemorrhagic fever (AHF) is an endemo-epidemic disease of Argentina produced by the arenavirus Junín (JUNV). It is estimated that the population at risk of contracting AHF is around 5 million people that inhabit the endemic area. Since the 1990s, there is a vaccine available for the prevention of AHF called Candid#1, which is produced locally and it is based on an attenuated strain of JUNV. However, given the nature of its formulation, the high costs associated with its production, and the possible adverse effects of its administration, the research and development of alternative vaccine candidates for AHF is of national interest.

Baculoviruses are arthropod-specific viruses that have been employed and studied profusely as molecular biology tools for over 40 years. Nowadays, there is an expression system for the production of heterologous proteins based exclusively in baculovirus and insect cells called BEVS, which comprises an eukaryotic biotechnological platform with lower production costs and lower biosafety level requirements.

In this thesis we explored the generation of immunogens in BEVS for the prevention of AHF. In chapter I, we evaluated the surface display of arenaviral glycoproteins (GPCs) in the envelope of recombinant budded viruses. In chapter II, we generated a transgenic insect cell line that expresses a key protease for the proteolytic processing and assembly of the arenaviral spike, due to the importance that the native conformation of GPC has in the production of neutralizing antibodies.

In chapter III, we evaluated the production of virus-like particles (VLP) of JUNV in BEVS. These particles constitute an attractive alternative to attenuated vaccines since they are able to present viral antigens in a similar way virions do, but they do not carry genetic material, which renders them non-replicative and hence, more safe.

Lastly, we provide a general discussion of the results and perspectives for the future.

Introducción general

Baculovirus

Biología de baculovirus

La familia baculoviridae está conformada por virus específicos de artrópodos. Los mismos han sido aislados de insectos pertenecientes a los órdenes Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Orthoptera, Coleoptera, Neuroptera, Thysanura y Trichoptera (R. L. Harrison et al., 2018). Actualmente no existen en la actualidad reportes de la infección de baculovirus en vertebrados, por lo cual su uso y manipulación son considerados seguros para el humano, requiriendo niveles de bioseguridad bajos (1 o 2, dependiendo de las normativas de las instituciones). El genoma de estos virus, que varía entre los 80 y 180 kpb, se encuentra en forma de DNA circular doble cadena y empaquetado en una nucleocápside proteica con forma de bastón, cuyo tamaño oscila entre los 40 y 50 nm de diámetro y los 200 y 400 nm de longitud. La nucleocápside se encuentra envuelta en una membrana lipoproteica derivada del hospedador.

Los baculovirus son capaces de ocluir sus viriones en matrices proteicas de gran tamaño, denominadas cuerpos de oclusión (OB: *occlusion bodies*). Esta adaptación evolutiva les permite la permanencia en estado de latencia en el ambiente, conservando su viabilidad durante tiempos prolongados; resistiendo condiciones adversas como la desecación, radiación ultravioleta, entre otras.

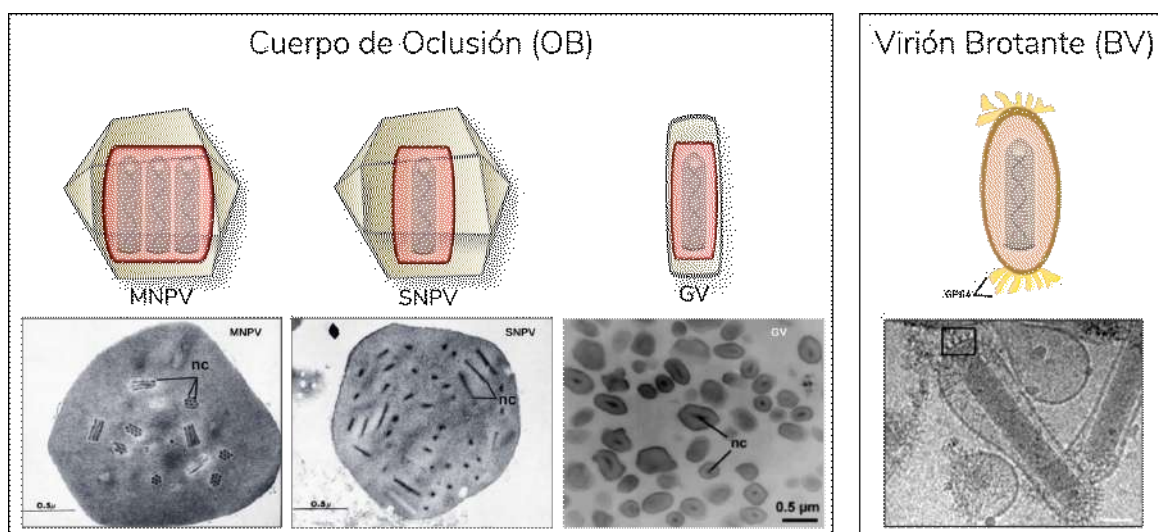


Figura 1. Diagramas y micrografías electrónicas de los morfotipos de los baculovirus. Cuerpos de oclusión (panel izquierdo), virión brotante (panel derecho). Adaptado de Rohrmann (2019).

Al principio, la familia baculoviridae fue clasificada en base a la morfología de los OB en dos géneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) y *Granulovirus* (GV). Los cuerpos de oclusión son característicos y visibles al microscopio óptico. Mientras que los OB de los NPV resultan fácilmente distinguibles, ya que presentan una estructura poliédrica más grande y refringente (0.8 - 2 μm), los OB de los GV aparecen como gránulos ovoides oscuros de menor tamaño ($\sim 0.5 \mu\text{m}$). En base a su apariencia, los OB de los NPV se conocen vulgarmente como poliedros, mientras que los de GV, como gránulos. Siguiendo esta denominación, la proteína mayoritaria que compone los OB se llamó poliedrina para los NPV y granulina para los GV. En cada OB de un NPV se ocluyen múltiples viriones, mientras que en el OB de un GV se ocluye un único virión. A su vez, en los NPV, cada virión puede contener una o varias nucleocápsides, distinguiéndose de esta manera los NPV múltiples (MNPV) y simples (SNPV) (Haase et al., 2013).

En la actualidad, la clasificación taxonómica de los baculovirus difiere de la anteriormente descrita. En base a la información genómica y los estudios evolutivos, la familia baculoviridae fue reformulada para comprender cuatro géneros: *Alphabaculovirus* (NPV específicos de lepidópteros), *Betabaculovirus* (GV específicos de lepidópteros), *Gammabaculovirus* (NPV específicos de himenópteros) y *Deltabaculovirus* (NPV específicos de dípteros).

Dentro del género de los *Alphabaculovirus*, *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) es el más estudiado y utilizado como herramienta biotecnológica.

El ciclo de infección de los baculovirus comienza cuando una larva susceptible ingiere material foliar contaminado con OB. Los cuerpos de oclusión se desintegran cuando alcanzan el intestino medio de la larva debido al pH alcalino del medio, liberando el primer morfotipo viral: los viriones derivados de cuerpos de oclusión (ODV: *Occlusion derived virus*). Los ODV son los responsables de la infección primaria de las células epiteliales del intestino de la larva.

La primera progenie que se produce en consecuencia de la infección primaria consiste en un morfotipo viral diferente al ODV, los viriones brotantes (BV: *Budded virus*), que son los responsables de la infección sistémica del insecto. La eficiencia de infección de estos morfotipos virales difiere entre sí en distintos tipos celulares, los ODV poseen una capacidad infectiva en las células del intestino medio diez mil veces mayor a la de los BV, mientras que éstos últimos infectan cultivos celulares con una eficiencia mil veces mayor que los ODV.

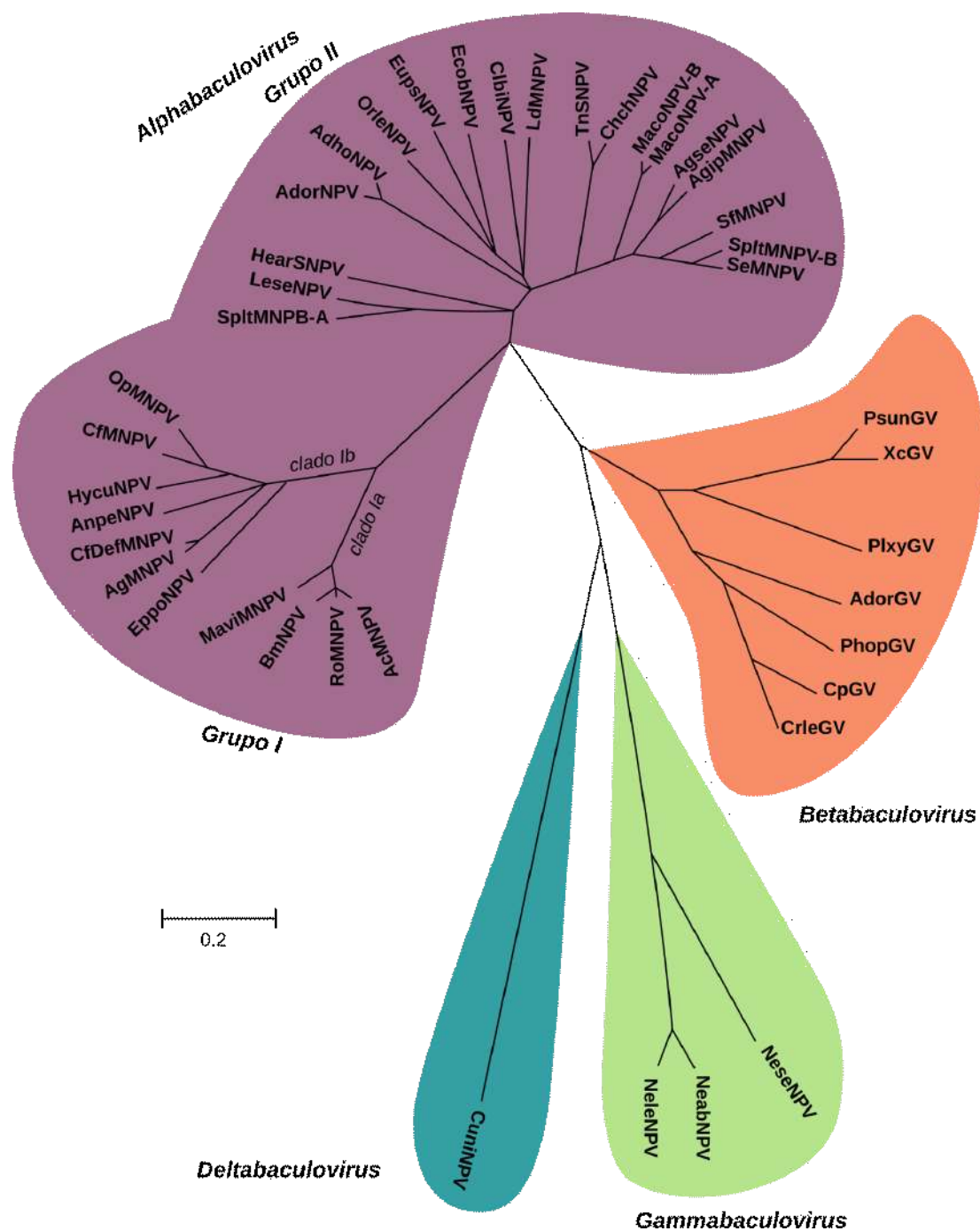


Figura 2. Árbol filogenético de la familia Baculoviridae. Construido a partir del alineamiento de secuencia aminoacídica de 29 genes core de baculovirus actualmente reconocidos como especie según el International Committee for the Taxonomy of Viruses (ICTV). Los 4 géneros se distinguen por colores, las subdivisiones dentro del género *Alphabaculovirus* se encuentran resaltadas. Adaptado de R. L. Harrison et al., 2018.

El ingreso de los BV de AcMNPV a la célula hospedadora es mediado por una glicoproteína viral de superficie de clase III, denominada GP64. GP64 interacciona con un receptor celular poco caracterizado que desencadena la vía de internalización endosomal dependiente de

clatrina y la subsiguiente acidificación de la vesícula internalizada. La baja de pH provoca un cambio conformacional en GP64 que acerca las membranas viral y endosomal, dando como resultado la fusión entre ambas. De este modo, la nucleocápside es liberada al citoplasma y migra hacia el núcleo celular.

El genoma de AcMNPV codifica para más de 150 genes que son transcritos de manera coordinada. En primer lugar, la RNA polimerasa II del hospedador transcribe los genes inmediatos tempranos que codifican generalmente para factores de transcripción - como IE1 - y controlan de forma subsiguiente la transcripción de otros genes e incrementan la propia. A continuación, el DNA es replicado y el ciclo progresa a un periodo donde el DNA se encuentra relajado, lo que expone a los promotores tardíos al acceso de la maquinaria transcripcional.

Los baculovirus codifican en su genoma una RNA polimerasa propia que transcribe los genes tardíos y muy tardíos, reconociendo una secuencia promotora viral consenso que incluye los nucleótidos DTAAG (donde D representa A, T o G).

Durante la infección sistémica de AcMNPV, luego de la replicación, las nucleocápsides se movilizan hacia la membrana plasmática en un proceso en el cual está involucrada la polimerización de actina. Algunos autores sugieren que en la salida de la nucleocápside del núcleo, la misma adquiere una envoltura derivada de la membrana nuclear que se pierde durante su tránsito por el citoplasma. A medida que la infección progresa, las proteínas virales que forman parte de la envoltura - principalmente GP64 y la proteína F - se acumulan en la membrana plasmática de la célula hospedadora y eventualmente los BV brotan hacia el exterior. En este proceso están involucradas también proteínas del hospedador como SNAREs y miembros de ESCRT-III (Rohrmann, 2013).

Así, en primer lugar son producidos los BV y con ellos se desarrolla la infección sistémica de la larva. Finalmente, en tiempos tardíos, se producen los ODV en el núcleo, que se carga de OB, y finalmente, estos se liberan al ambiente al desintegrarse las células, observándose frecuentemente la licuefacción del insecto.

Los baculovirus han sido ampliamente utilizados como herramientas biotecnológicas en el campo de la agricultura y la salud humana y veterinaria. Una de sus aplicaciones más difundida es su utilización como agentes para el control biológico de plagas. Si bien se ha

invertido mucho trabajo y dinero en el desarrollo de pesticidas basados en baculovirus, su uso comercial es limitado, debido a la baja velocidad con la cual matan al insecto y su rango limitado de hospedador. Sin embargo, muchos grupos de investigación se encuentran trabajando para superar estas limitaciones.

Regulación de la expresión génica

La expresión génica en AcMNPV ocurre en forma de cascada, en la cual la expresión de los genes de una etapa determinada requiere la presencia de los productos génicos de etapas anteriores, y puede ser dividida en cuatro fases temporales: temprana inmediata, temprana retrasada, tardía y muy tardía.

Genes tempranos

Los genes tempranos se dividen, como se mencionó anteriormente, en dos categorías: tempranos inmediatos y tempranos retrasados (α y β). La transcripción de ambos tipos es llevada a cabo por la RNA polimerasa II del hospedador. Los genes alfa y beta difieren entre sí en sus promotores y secuencias denominadas *enhancers*. Los genes tempranos inmediatos son expresados dentro de los 30 minutos post-infección, una vez que las nucleocápsides han alcanzado el interior del núcleo (Chisholm & Henner, 1988).

Los genes tempranos retrasados requieren de la unión de transactivadores virales (sintetizados previamente) a los *enhancers* para alcanzar niveles de expresión máximos. Los promotores de estos transactivadores se asemejan a los promotores del hospedador; presentan un motivo TATA *box* típico y un sitio de inicio a la transcripción caracterizado por la secuencia CAGT (ubicada a 25-31 bp *downstream* de la TATA *box*). Esta secuencia está involucrada en el inicio de la transcripción (Pullen & Friesen, 1995a, 1995b).

Replicación

La replicación del DNA tiene lugar en el núcleo de la célula, una vez que se han acumulado los productos génicos virales expresados durante la etapa temprana. Los elementos que

actúan en *cis* requeridos para la replicación (origen de replicación u *ori*) han sido identificados por análisis de genomas defectivos (Kool et al., 1994; H. Lee & Krell, 1994) y por ensayos de replicación transitorios (Leisy & Rohrmann, 1993; Pearson & Rohrmann, 1995).

Los elementos que actúan en *trans* requeridos para la replicación del DNA viral incluyen a la DNA polimerasa viral (*dnapol*), *p143* (helicasa), *lef-1* (DNA primasa) y *lef-2*, entre otros. Todos estos genes han sido encontrados en la totalidad de los baculovirus secuenciados hasta el momento. Se han identificado en AcMNPV cinco genes esenciales (*p143*, *ie-1*, *lef-1*, *lef-2* y *lef-3*) y cinco genes estimulantes de la replicación (*dnapol*, *p35*, *ie-2*, *lef-7* y *pe38*) (Crouch & Passarelli, 2002).

Genes tardíos y muy tardíos

Entre las 8 y las 24 horas post infección, tienen lugar la transcripción y expresión de los genes tardíos, la producción de proteínas estructurales y el ensamblado de los BV. Tanto estos genes como los muy tardíos tienen un sitio de inicio a la transcripción invariante (A/G/T)TAAG y son transcritos por la RNA polimerasa del virus. Además, se conocen 18 genes de AcMNPV que resultan esenciales para lograr niveles de expresión óptimos (*vp39*, *p6.9*, *polh* y *p10*, entre otros) (Lu & Miller, 1995). En la fase tardía se expresan los genes que codifican las proteínas estructurales, dando comienzo a la etapa de ensamblaje de las nucleocápsides (NC) en el núcleo (Kool et al., 1995). La expresión muy tardía tiene inicio entre las 18-24 h.p.i y se caracteriza por un gran aumento en la transcripción y expresión de genes muy tardíos y la reducción de la transcripción de los genes tardíos. En los promotores muy tardíos, a diferencia de los tardíos, el nivel de expresión no depende del contexto inmediato en el que se encuentra la secuencia TAAG sino de una secuencia denominada *burst sequence*, que se localiza entre el sitio de inicio de la transcripción y el codón de inicio de la traducción. En los promotores muy tardíos esta secuencia es rica en AT e influye en la actividad del promotor. Esta región interactúa con proteínas celulares que son imprescindibles para asegurar altos niveles de transcripción de genes tales como poliedrina (*polh*), *p10* y otros que codifican proteínas necesarias para la formación de los OB (Braunagel et al., 1999).

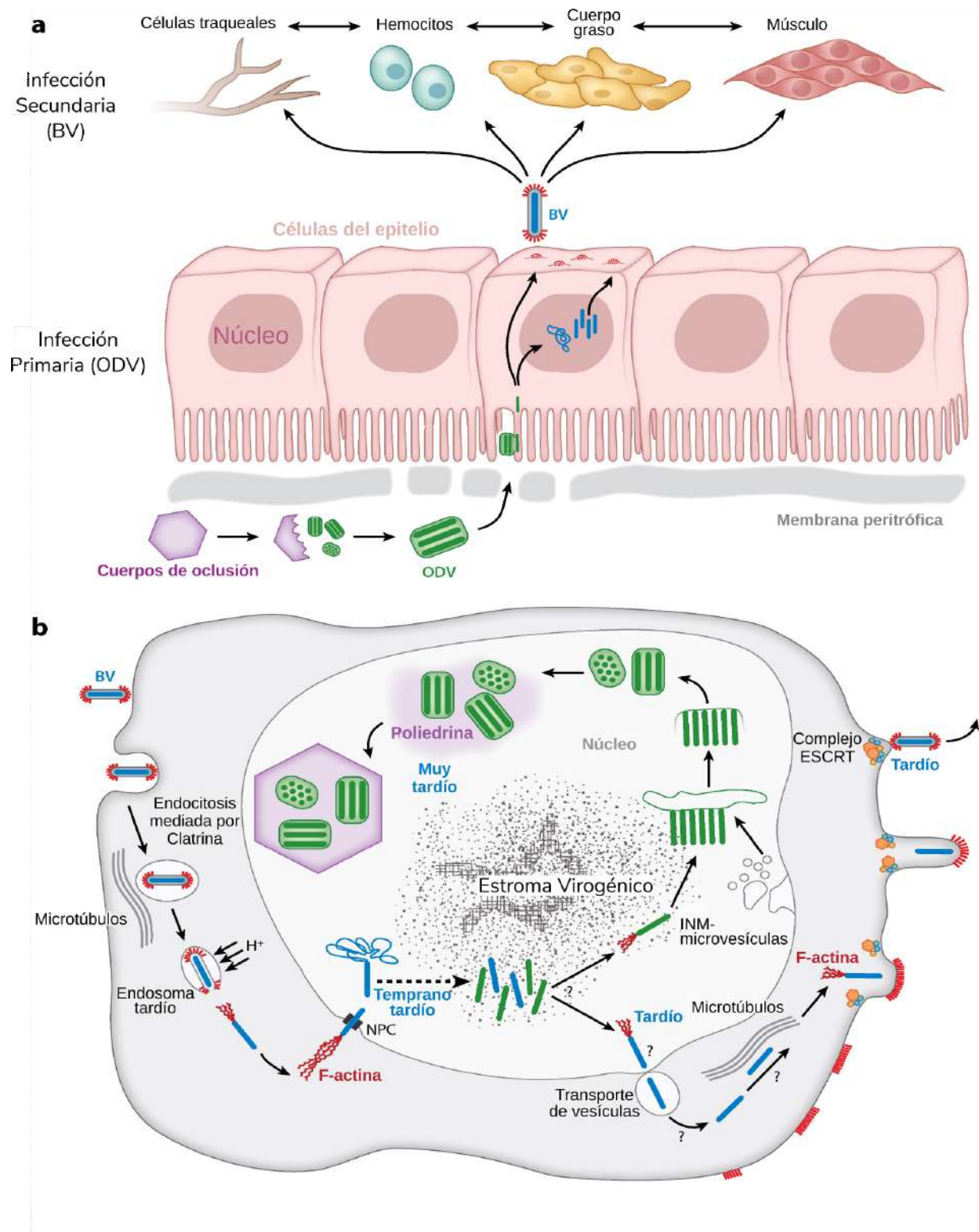


Figura 3. (a) Representación de la infección de los baculovirus en los tejidos del huésped. En el esquema se ilustra la etapa primaria y secundaria de la infección. **(b)** Representación del ciclo de vida de un baculovirus del género Alphabaculovirus en células huésped no intestinales. (Adaptada de: Blissard & Theilmann, 2018)

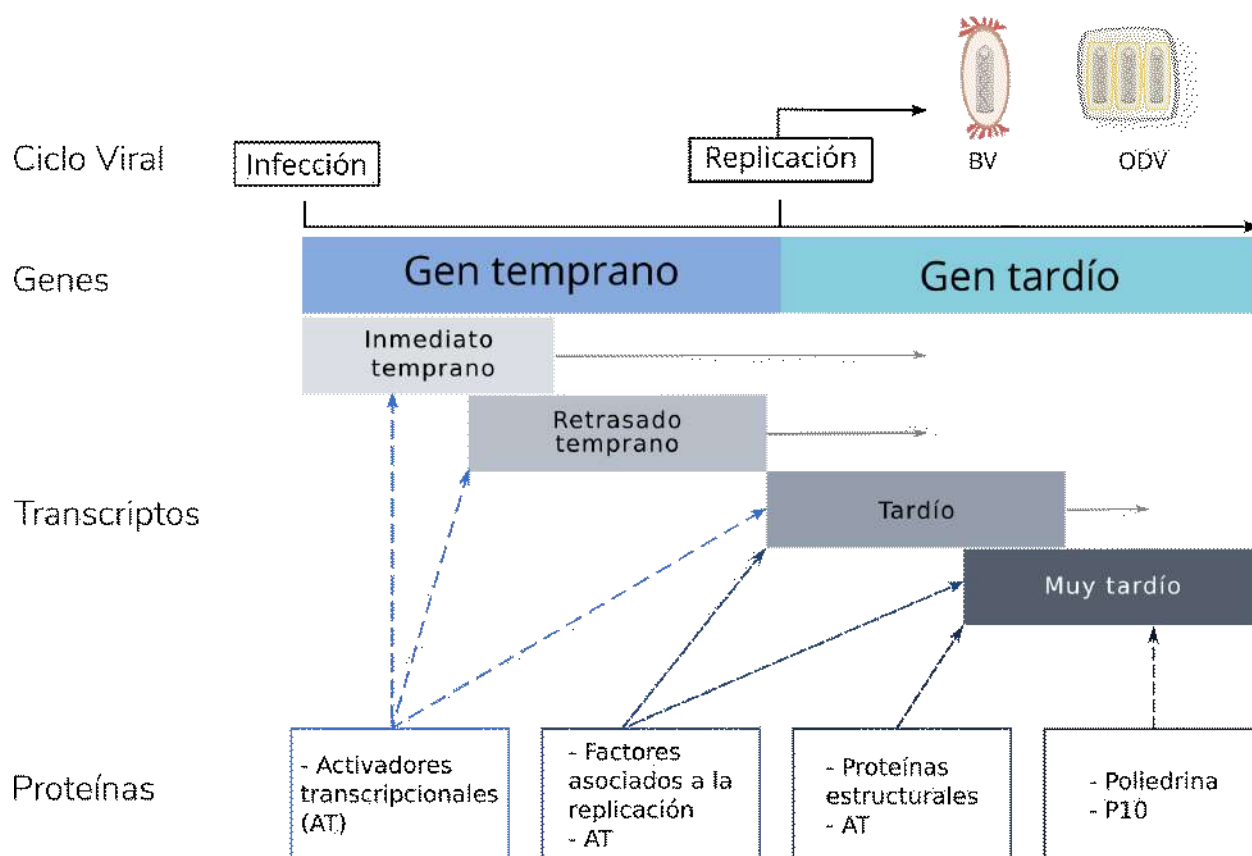


Figura 4. Etapas en la infección con NPV. La expresión de los genes de los baculovirus ocurre en forma de cascada (factores codificados en una etapa son necesarios para el desarrollo en las etapas posteriores). La transcripción de genes tempranos depende de la RNA polimerasa celular aunque, con la excepción de los genes inmediatos, requiere de factores adicionales codificados por el virus. La replicación del DNA es un requisito para la expresión de genes tardíos y muy tardíos, los cuales se transcriben utilizando la RNA polimerasa viral. (Adaptado de: Romanowski & Ghiringhelli, 2001).

Sistema de expresión baculovirus-célula de insecto

La posibilidad de propagar estos virus en cultivo los ha convertido en una herramienta invaluable para la ingeniería genética, tanto para el estudio de su biología como para el desarrollo de un sistema de expresión de proteínas heterólogas.

El uso del sistema de expresión baculovirus-células de insecto (BEVS: *baculovirus expression vector system*) puede dividirse en dos etapas: la primera es la generación y el aislamiento de un baculovirus recombinante (rBV) que lleva el gen de interés y la segunda es la infección de

un hospedador susceptible (tanto células en cultivo como larvas) con el rBV obtenido (O'Reilly & Miller, 1991).

La primera proteína recombinante que se produjo utilizando BEVS fue el interferón β (IFN- β) (Smith et al., 1983), pero hoy en día existen reportes de cientos de proteínas expresadas en el sistema, muchas de ellas disponibles comercialmente.

Si bien AcMNPV es el baculovirus modelo y uno de los más utilizados dentro del sistema BEVS, el uso de BmMNPV (*Bombyx mori multiple nucleopolyhedrovirus*) también es popular, dado que con él se obtienen altos rendimientos de proteína recombinante utilizando larvas y pupas del gusano de la seda (Motohashi et al., 2005).

Los promotores virales más utilizados para la expresión de proteínas heterólogas en este sistema son los promotores tardíos de poliedrina (p_{polh}) y de P10 (p_{p10}), ya que tienen una elevada capacidad de expresión. Sin embargo, promotores más tempranos (como el promotor de GP64) también pueden ser utilizados.

En cuanto a las líneas celulares, aquellas derivadas de ovario de *Spodoptera frugiperda* (Sf9, Sf21 y ExpressSF+) y *Trichoplusia ni* (HighFive, BTI-TN-5B1-4, InvitrogenTM, Carlsbad, CA, USA) son las más frecuentemente elegidas por los usuarios de BEVS. Todas estas líneas son capaces de crecer en adherencia o suspensión (si se las adapta), en medio libre de suero, y sin requerimiento de CO₂ (Drugmand et al., 2012; Grace, 1962; Ikononou et al., 2003; Lynn, 2001; Vaughn & Fan, 1997; P. Wang et al., 1994). Ha sido reportado que las células HighFive son con las cuales se obtienen los máximos rendimientos de proteína heteróloga (Zhou et al., 2011).

Una alternativa al uso de cultivos celulares es el empleo de larvas de insectos pertenecientes al orden Lepidoptera, con las cuales se obtienen rendimientos proteicos similares a los de las células en cultivo, pero con un menor costo asociado. Sin embargo las normas de buenas prácticas de manufactura (GMP: *good manufacturing practices*) y control de calidad son más difíciles de cumplir cuando se elige utilizar insectos.

A pesar de que el empleo de líneas celulares derivadas de insectos es considerado más seguro que el de células de mamífero, es, de todos modos, necesario evaluarlas para descartar la presencia de agentes adventicios que puedan constituir un riesgo para la salud

humana y veterinaria. Existen reportes de aislamiento de Alphanodavirus y Rhabdovirus desde líneas celulares derivadas de *Helicoverpa armigera* y *Spodoptera frugiperda* (Bai et al., 2011; Ma et al., 2014). Dada la naturaleza del ciclo de infección de los baculovirus, tanto las células como las larvas mueren tras una única ronda de infección, por lo cual la expresión continua de la proteína recombinante no puede realizarse utilizando la estrategia de infección con rBV. Sin embargo, existen estrategias para la producción de proteínas heterólogas de manera continua utilizando promotores virales constitutivos y líneas de insecto transgénicas establemente transformadas.

Hay muchas ventajas asociadas al BEVS cuando se lo compara con otros sistemas de expresión. BEVS provee de una plataforma eucariota para el plegado, la formación de puentes disulfuro, oligomerización y otras modificaciones post-traduccionales requeridas para la actividad biológica de las proteínas. Además, dada la capacidad del genoma baculoviral de aceptar insertos de hasta 34 kpb (O'Reilly et al., 1994) es posible expresar múltiples genes a la vez.

Es importante destacar que a pesar de que BEVS permite patrones de glicosilación simples, la N-glicosilación de las proteínas en las células de insecto no es exactamente igual a la que ocurre en el cultivo de células de mamíferos. Mientras que los N-glicanos de los insectos poseen residuos terminales de manosa, los N-glicanos de los mamíferos poseen en general residuos terminales de ácido siálico. Esta diferencia podría resultar en una disminución, o incluso en la pérdida total, de la actividad biológica de la proteína de interés (Aumiller et al., 2006; Geisler & Jarvis, 2010). De todos modos, existen líneas de insecto humanizadas que expresan las enzimas requeridas para obtener patrones de glicosilación de mamífero (Mabashi-Asazuma et al., 2014; Okada et al., 2010).

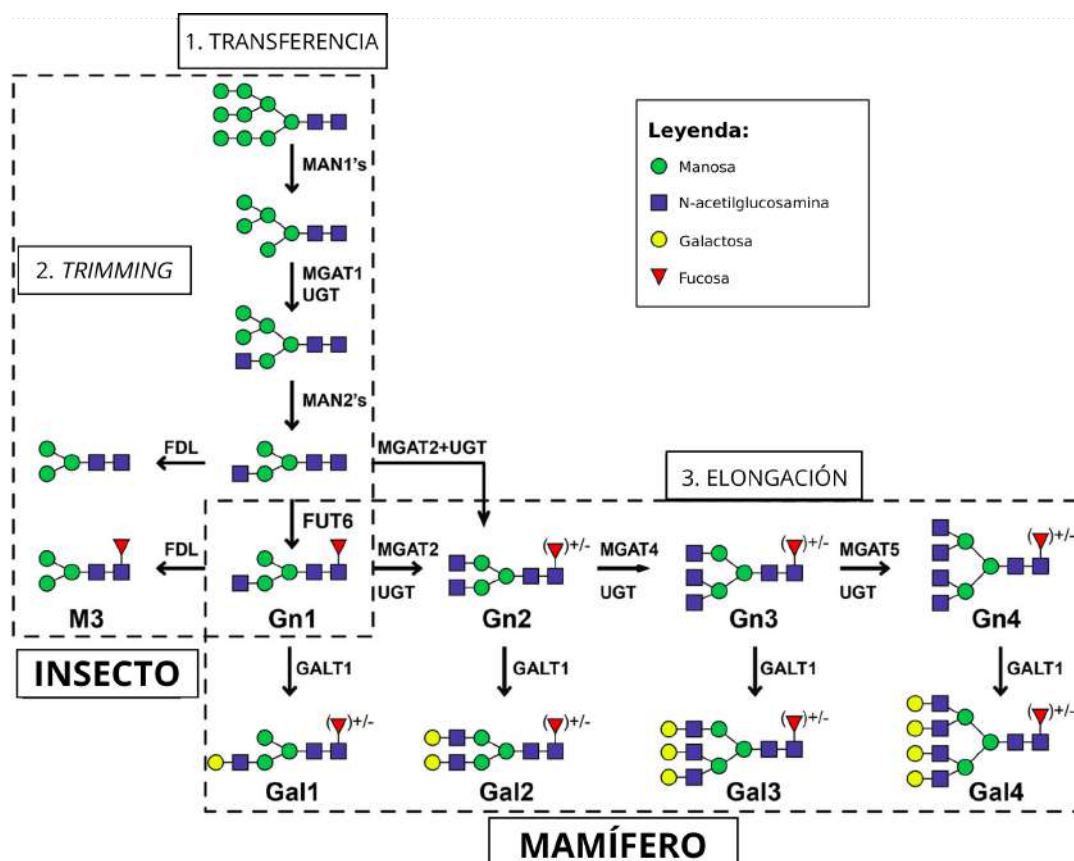


Figura 5. Rutas de N-glicosilación de mamíferos e insectos. Ambas rutas comienzan con la transferencia de un oligosacárido precursor pre-ensamblado a un polipéptido naciente (no mostrado en el esquema). Las enzimas que llevan a cabo el *trimming* remueven los residuos terminales de glucosa y la mayoría de los residuos terminales de manosa de este precursor. Luego, MGAT1 agrega una N-acetilglucosamina terminal para producir N-glicanos intermedios. Las células de insecto codifican una N-acetilglucosaminidasa (FDL), que remueve el glicano terminal para producir M3 (el producto mayoritario de esta vía). Las células de mamífero no poseen esta enzima, pero si codifican para una gran variedad de glucosiltransferasas, que median la elongación y convierten de manera progresiva al N-glicano intermedio en estructuras mucho más complejas. (Adaptado de Maghodia et al., 2021)

Baculovirus como inmunógenos

La inmunidad innata es la primera línea de defensa de un organismo ante la infección por patógenos. Una de las funciones fundamentales de la misma reside en montar una respuesta fuerte y específica, expresando factores co-estimuladores necesarios para la activación de los tipos celulares que intervienen en la respuesta inmune adaptativa. Por esta razón, un buen

inmunógeno será aquel capaz de generar una respuesta innata fuerte que conduzca a la activación adecuada de la inmunidad adaptativa con la consecuente generación de células de memoria (Pidre et al., 2013).

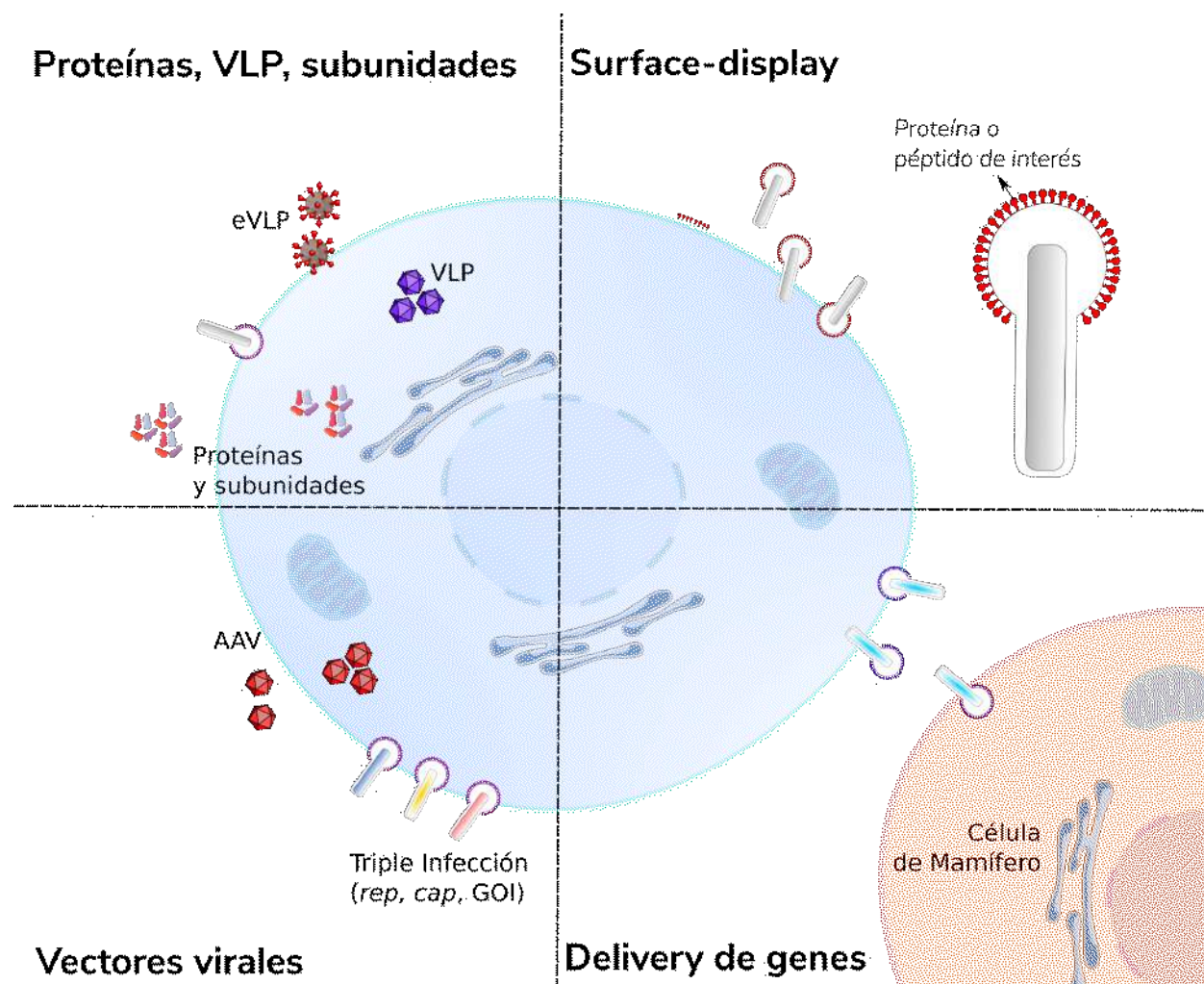


Figura 6. Distintos inmunógenos producidos en BEVS. En el esquema se representan brevemente los distintos tipos de inmunógenos que pueden producirse con el sistema de expresión baculovirus-células de insecto. En esta tesis se exploraron 2 de ellos; el baculovirus surface display y eVLP.

Diferentes autores han demostrado que los baculovirus son capaces de transducir líneas celulares de macrófagos e inducir la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleuquina 6 (IL-6) y 12 (IL-12), entre otras (Abe et al., 2005; Chimeno Zoth et al., 2012; Han et al., 2010; Hervas-Stubbs et al., 2007). AcMNPV es capaz de activar ciertas poblaciones de células de la inmunidad innata y de inducir secreción de citoquinas pro-inflamatorias cuando es inoculado en mamíferos a través de la vía de señalización dependiente de TLR9. TLR9 pertenece a la familia de los receptores

transmembrana tipo *toll* que reconocen y se unen a diferentes ligandos de naturaleza tanto endógena como exógena. La vía de señalización de este tipo de receptores culmina en la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la subsiguiente modulación de la respuesta inmune innata (Abe et al., 2005; Chimeno Zoth et al., 2012; Han et al., 2010).

TLR9 es capaz de estimular *in vivo* el sistema inmune a través del reconocimiento de oligodesoxinucleótidos que contienen motivos no metilados CpG. Al igual que el DNA bacteriano, el genoma de AcMNPV contiene un número significativo de este tipo de motivos. De hecho, varios estudios demostraron que AcMNPV es capaz de estimular células presentadoras de antígenos profesionales (APC: *Antigen Presenting Cells*) a través de esta vía de señalización y que además es necesaria la fusión de membranas mediada por GP64 y la liberación del genoma viral dentro de vesículas que contienen TLR9 para que dicha vía sea activada (Abe et al., 2003, 2009; Abe & Matsuura, 2010).

A pesar de no ser replicativos en las células de mamífero, los baculovirus son poderosos adyuvantes en ratón, promoviendo la generación tanto de una respuesta humoral potente como de una respuesta adaptativa celular del tipo T CD8+. Por otra parte, también se ha verificado que en animales inoculados con baculovirus, se produce la maduración *in vivo* de células dendríticas y la subsecuente producción de citoquinas pro-inflamatorias (Abe et al., 2003; Gronowski et al., 1999).

Se ha observado que la respuesta inducida por la inoculación de BV es muy limitada. Esto es en sí mismo un beneficio interesante, pues los baculovirus son capaces de estimular fuertemente el sistema inmune innato pero por un corto periodo de tiempo, eliminando así potenciales daños producidos por una respuesta inflamatoria sostenida (Chimeno Zoth et al., 2012).

La inoculación de ratones con AcMNPV es, además, capaz de inducir la activación de células *natural killer* (NK); siendo posible observar un incremento de cuatro veces en su número en bazo, hígado, médula ósea y timo de ratones comparado con el grupo control (Kitajima et al., 2008).

Es interesante destacar que, a diferencia de otros virus utilizados como vehículos vacunales - como los adenovirus humanos que se utilizaron para la formulación de las vacunas aprobadas para su uso de emergencia en la pandemia de COVID-19 (Sputnik-V, Janssen) -, no

existe en humanos inmunidad pre-existente para los baculovirus. Este factor, en conjunto con lo anteriormente mencionado, los convierte en un candidato prometedor para su utilización como vehículo vacunal.

Arenavirus

Biología de los arenavirus

La familia Arenaviridae comprende 4 géneros de virus que infectan distintos tipos de vertebrados: *Antennavirus* (peces), *Mammarenavirus* (roedores, humanos y murciélagos), *Hartmanivirus* y *Reptarenavirus* (serpientes). El nombre “arenavirus” proviene de la apariencia que se observa en micrografías electrónicas de los viriones, que parecen llenos de arena, producto de la incorporación de ribosomas celulares (Radoshitzky et al., 2019).

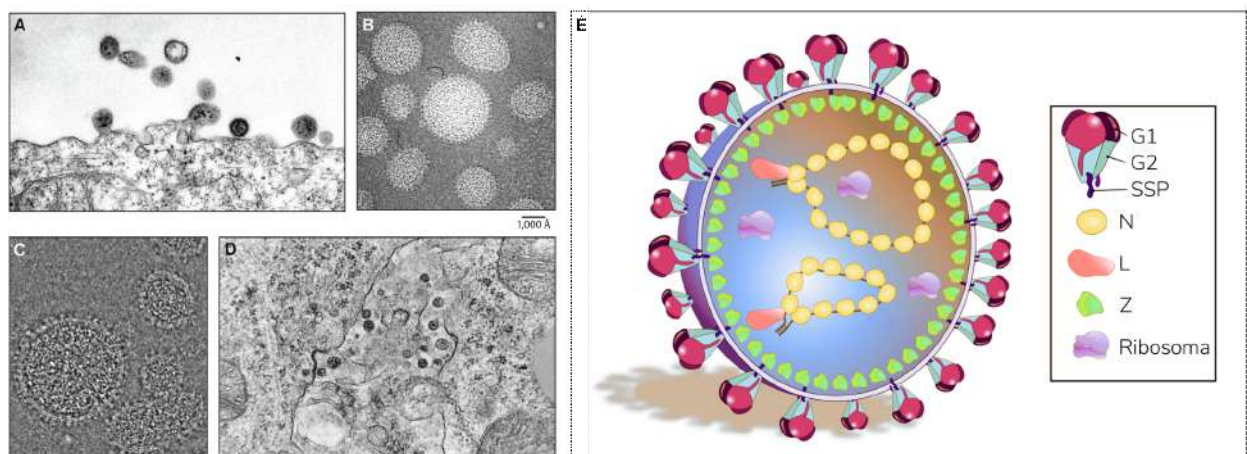


Figura 7. Mammarenavirus. En el panel izquierdo se observan **(a y b)** micrografías electrónicas del mammarenavirus modelo, virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMV). **(c)** Micrografías electrónicas (Cryo-EM) de viriones del virus Tacaribe (TCRV), donde es posible observar el pleomorfismo. **(d)** LCMV brotando hacia espacios intracelulares de la corteza adrenal de un cobayo 8 días post-infección. En el panel derecho **(e)**, un esquema de un virión prototípico de mammarenavirus. (Adaptada de Radoshitzky et al., 2019. Esquema cortesía de Ure, AE, sin publicar)

Los viriones de los arenavirus son envueltos, pleomórficos y con un tamaño que oscila entre los 50 y 300 nm de diámetro (Radoshitzky et al., 2019). Su genoma es de RNA simple cadena, segmentado en 2 o 3 moléculas denominadas S (*small*), M (*medium*) y L (*large*), cuya polaridad es *ambisense*. A excepción de los *Hartmanivirus*, que han sido descritos recientemente, el genoma de los arenavirus codifica 4 ORF (ORF: *open reading frame*); N, la

proteína de nucleocápside, el precursor de las glicoproteínas GPC, que es proteolíticamente procesado en G1, G2 y un péptido señal estable (SSP: *stable signal peptide*), la RNA-dependiente RNA polimerasa (RdRp) L y la proteína de matriz, Z. La superficie de los viriones se encuentra decorada por espículas triméricas en las cuales se distingue claramente un tallo y una cabeza, formadas por las glicoproteínas virales. El genoma se encuentra complejado con la nucleoproteína y la RdRp viral, formando los complejos RNP (RNP: *ribonucleoprotein complexes*). El RNA viral no posee *cap* y contiene una G en cada uno de los extremos 5', mientras que los extremos 3' no poseen motivos poliadenilados. Los extremos de cada molécula de RNA tienen secuencias invertidas complementarias que codifican para señales de inicio de transcripción y replicación. Los segmentos con polaridad *ambisense* codifican dos ORF no solapados (en orientación opuesta), separados por regiones intergénicas no codificantes (IGR: *intergenic region*). Las IGR adoptan estructura secundaria de al menos un *stem-loop*, que cumplen un rol en la terminación de la transcripción, en el ensamblado y en la brotación de los viriones.

El género *Mammarenavirus* incluye múltiples patógenos humanos, desde el arnavirus prototípico de bajo riesgo LCMV (virus de la coriomeningitis linfocitaria) a los altamente virulentos, conocidos por producir enfermedades hemorrágicas severas, como el virus Lassa (LASV) en África occidental y el virus Junín (JUNV) en nuestro país.

De acuerdo a la distribución geográfica y propiedades serológicas y filogenéticas, los *mammarenavirus* son divididos en dos complejos, aquellos pertenecientes al grupo de virus del viejo mundo (OW: *old world*) y a los del nuevo mundo (NW: *new world*) (Charrel et al., 2008). En el caso del complejo NW, los virus pueden ser, además, ordenados en tres clados (A, B y C), dependiendo de las relaciones filogenéticas entre ellos (Charrel et al., 2003; Charrel & de Lamballerie, 2003).

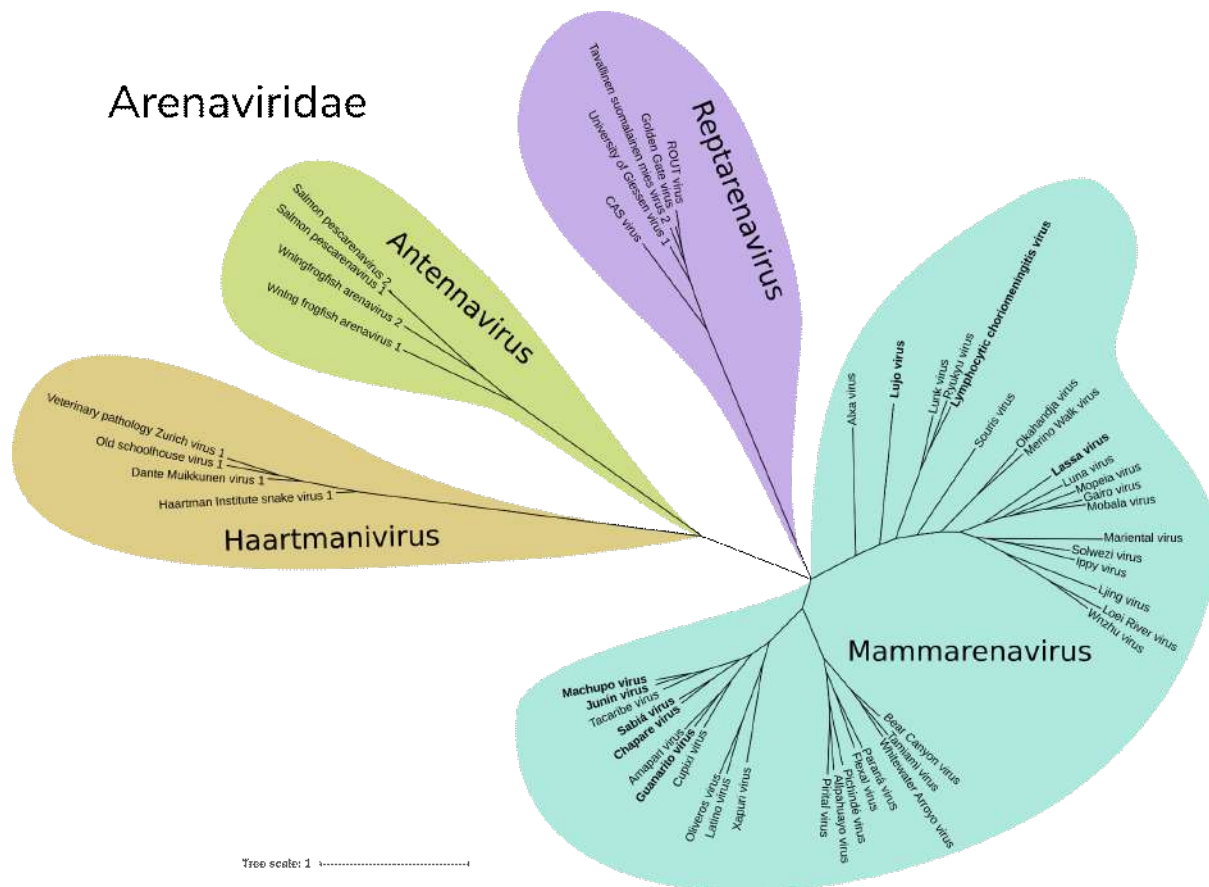


Figura 8. Árbol filogenético de la familia Arenaviridae. Las relaciones filogenéticas fueron establecidas utilizando la secuencia de aminoácidos completa de la proteína L. Se destacan en negrita los arenavirus que generan enfermedad en humanos (Alineamiento de Radoshitzky et al., 2019, graficado con iTOL de EMBL).

Ciclo replicativo de los arenavirus

La infección por parte de los arenavirus comienza con la interacción y el *attachment* del virión, mediada por las glicoproteínas, a receptores celulares. Consistente con su amplio rango de hospedador y tropismo celular, el α -dístroglicano (α -DG) - que se encuentra altamente conservado y expresado en la superficie celular - ha sido identificado como el receptor principal para LCMV, LASV y los virus Latino y Oliveros, ambos pertenecientes al clado C de los virus del NW (Cao et al., 1998; Spiropoulou et al., 2002). Otras proteínas celulares han sido reportadas como receptores alternativos para LASV; como miembros de la familia TAM (Axl y Tyro3) y los miembros de la familia de lectinas tipo C, DC-SIGN y L-SIGN (Shimajima et al., 2012). Todos los NW patogénicos pertenecen al clado B y se unen a la

región del dominio apical del receptor de transferrina 1 (TfR1) (Radoshitzky et al., 2007). TfR1 es una proteína transmembrana abundante en las células inmunes activadas y en las células del endotelio vascular, ambos tipos celulares involucrados en la patogénesis de los arnavirus (Geisbert & Jahrling, 2004).

Luego de la unión al receptor celular, los viriones son internalizados mediante la vía endocítica independiente o dependiente de clatrina, para los OW o NW, respectivamente (Kunz et al., 2002, 2003). La liberación de los RNP al citoplasma ocurre tras la fusión de las membranas virales y endosomales, un proceso que es dependiente del pH, y es mediado por las glicoproteínas virales (Rojek, Sanchez, et al., 2008). La interacción entre los ectodominios de SSP y G2 cumplen un rol en el mantenimiento de la forma de pre-fusión de las glicoproteínas a pH neutro y en la activación del cambio conformacional que lleva a la fusión de membranas a pH ácido (York & Nunberg, 2006). Las glicoproteínas en la superficie viral son lábiles, y están preparadas para sufrir una serie de cambios conformacionales para formar una estructura post-fusión termodinámicamente favorable (Abraham et al., 2010; White et al., 2008). La activación de este proceso está controlada por receptores celulares o por el acceso a ciertos compartimientos intracelulares. El estado pre-fusión, que es establecido mediante la maduración proteolítica de GPC, se mantiene en parte por la inserción del complejo en la membrana. En la ausencia del clivado proteolítico, GPC es aún más estable, pero tiende a formar oligómeros heterogéneos y estructuras similares a las de post-fusión (Hastie et al., 2016).

Luego de la liberación de los RNP al citoplasma, el RNA viral es transcrito y replicado por acción de la RdRp L. El inicio de la transcripción ocurre mediante un mecanismo compartido por algunos de los virus de RNA de polaridad negativa, llamado *cap-snatching*, en el cual la proteína L le quita un pequeño fragmento del extremo 5' a los mRNA celulares que contienen *cap* para poder comenzar la síntesis de los mRNA virales (Ferron et al., 2017; Morin et al., 2010).

Inicialmente, cuando solo hay segmentos de RNA genómico, únicamente son transcritos y traducidos los mRNA que codifican N y L. Los mRNA de los genes arnavirales no son poliadenilados, y las regiones intergénicas de los genomas contienen las señales de terminación (Pinschewer et al., 2005). Gracias a su actividad de anti-terminador, la acumulación de N permite la síntesis del antígenoma completo (Tortorici et al., 2001). Una vez presente el antígenoma, ocurre la transcripción y traducción de los mRNA de GPC y Z, y la

replicación génica. Z actúa como inhibidor de la transcripción y replicación (Kranzusch & Whelan, 2011), y es su acumulación la que dirige el paso de brotación del ciclo viral.

El ensamblado y la brotación de los viriones producidos tras el ciclo infeccioso es un proceso altamente complejo, del cual no se conocen todos los pasos y mecanismos involucrados.

Como otros virus envueltos, los arenavirus reclutan y utilizan el complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte ESCRT (del inglés: *Endosomal sorting complex required for transport*) para facilitar su liberación (Chen & Lamb, 2008; Eastman et al., 2005; Young et al., 1991). La proteína de matriz Z provee la fuerza impulsora para la brotación de las partículas virales y, gracias a esto, es capaz de producir partículas pseudo-virales (VLP: *virus like particles*) cuando es expresada de manera individual (Hoenen et al., 2006). Durante la brotación, Z forma una capa interna debajo de la envoltura viral e interactúa de manera directa con N y GPC para su incorporación a las partículas virales. La interacción entre N y Z es crítica para la incorporación de los RNP a los viriones. Al igual que para otras proteínas de matriz virales, los pequeños dominios tardíos (L-domains: *late domains*) presentes en Z son los responsables de la interacción con la maquinaria ESCRT y la subsecuente brotación (Casabona et al., 2009; Perez et al., 2003; Urata et al., 2007, 2009). Además de los L-domains, la modificación postraducciona del residuo de glicina 2 (G2) de Z mediante la adición de un miristoilo, también es esencial para la brotación viral. Esta modificación se encuentra altamente conservada en todos los mammarenavirus, y su alteración, ya sea por mutación o por inhibición de la miristoilación, resulta en una drástica reducción en la brotación viral (Casabona et al., 2009; Perez et al., 2004; Shtanko et al., 2011; Urata et al., 2009).

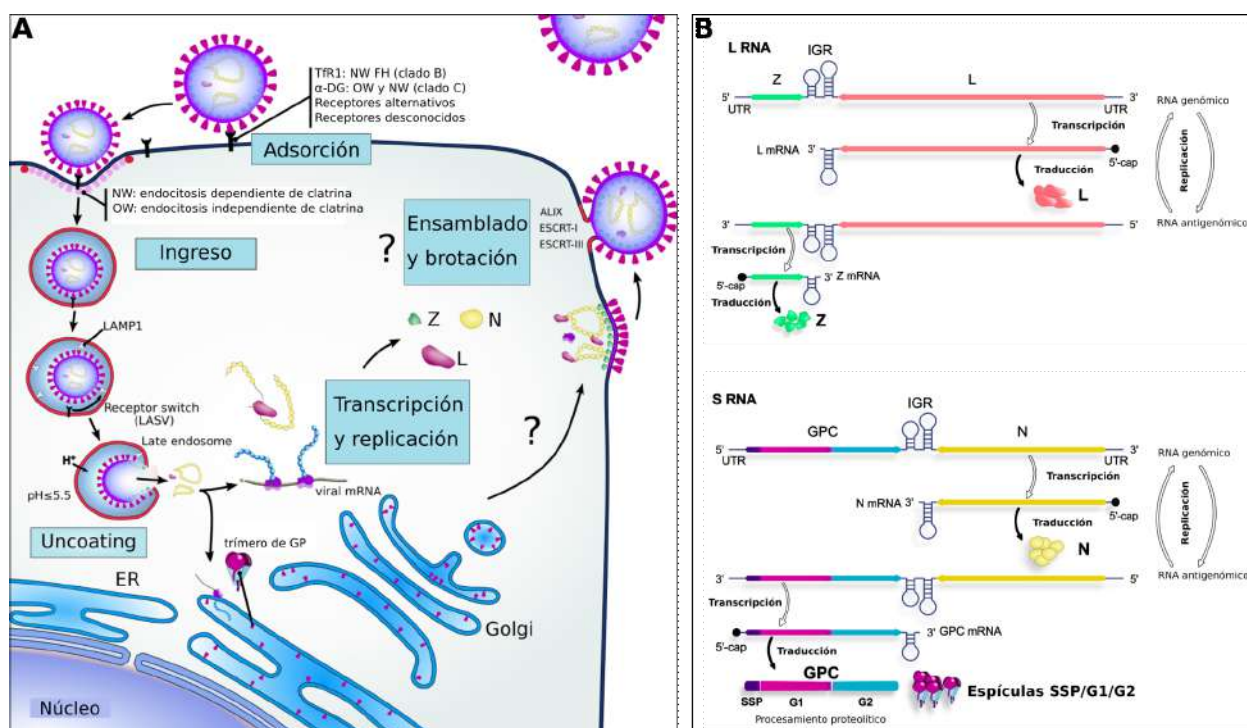


Figura 9. Ciclo infeccioso y replicación de arnavirus. (A) Esquema del ciclo infeccioso, resaltando las diferencias que se conocen para los arnavirus OW y NW. **(B)** Replicación, transcripción y traducción del genoma de un arnavirus típico. (Figura cortesía de Ure, AE. Sin publicar)

Fiebre hemorrágica argentina

La fiebre hemorrágica argentina (FHA), cuyo agente etiológico es el virus Junín (JUNV), es una enfermedad endemo-epidémica de nuestro país, caracterizada por alteraciones a nivel cardiovascular, hematológico, renal, inmunológico y neurológico. En la actualidad, posee una mortalidad de entre un 15 y 30%, pero en sus orígenes, el “mal de los rastrojos” - como se la conocía vulgarmente - alcanzaba una mortalidad del 50%.

Epidemiología

La infección en humanos se produce a través de las mucosas (conjuntival, inhalatoria u orofaríngea) o de lesiones en la piel. Las fuentes y vehículos del virus son aerosoles, polvo u otros materiales contaminados con orina, saliva o sangre de roedores infectados. Las

semillas, tallos de malezas y rastrojos contaminados con deyecciones y sangre fueron identificados de manera temprana como las fuentes de infección. El contagio interhumano se demostró en un número muy pequeño de casos.

Los roedores de la especie *Calomys musculinus* (*Sigmodontinae*, *Muridae*) son los reservorios naturales de JUNV, aunque el virus también ha sido aislado de *Calomys laucha*, *Akodon azarae* y *Oryzomys flavescens*, todos animales de hábitos rurales (García et al., 2000). De manera muy ocasional, se ha encontrado infección en otros roedores urbanos como *Mus musculus*. En los animales, la infección se presenta como crónica inaparente, con eliminación persistente de virus al medio ambiente (Rawls et al., 1981; Staneck et al., 1972).

A pesar de que se reportan casos en cualquier época del año, la FHA tiene una distribución estacional que presenta un pico máximo en su número de casos durante los meses de abril y junio (Weissenbacher et al., 1983).

Los primeros casos registrados datan de mediados de la década del '50 y, desde entonces, se ha informado una gran variación en el número de casos anuales, de entre 300 y 3000, aunque en los últimos años este número se ha reducido a entre 15 y 50.

Aunque la FHA es una enfermedad de reporte obligatorio en la Argentina, alrededor de un 78% de los casos sospechosos no posee una clasificación final registrada, siendo estos categorizados como no-conclusivos (Ministerio de Salud, Gobierno de la Provincia de Buenos Aires, 2020). Si bien no hay análisis epidemiológicos exhaustivos, estudios sobre trabajadores en situación de riesgo muestran que se puede cursar la enfermedad de manera sub-clínica (Boxaca et al., 1982; Damonte et al., 1978), pero se estima que el 80% de las infecciones sigue un curso clínico (Enria et al., 2008).

El área endémica de la FHA ocupaba una superficie de 16.000 km² en el norte de la provincia de Buenos Aires, entre 1958 y 1962, habiéndose extendido rápidamente. Actualmente se estima en 150.000 km² e incluye, además, ciertas regiones de las provincias de Córdoba, Santa Fe y La Pampa. Se estima que la población en riesgo de contraer la enfermedad es de 5 millones de personas (Enria et al., 2008; García et al., 2000; Mills et al., 1994). A pesar de que la incidencia de la enfermedad es reducida, el área endémica corresponde a la zona agrícola-ganadera más importante de la Argentina, y la población más expuesta es la de los trabajadores rurales. Por esta razón, ha tenido y puede tener un gran impacto en la salud y en

la economía de nuestro país y, como consecuencia, es de suma importancia la investigación y vigilancia de dicha enfermedad.

Curso clínico

La mayoría de los casos clínicos de FHA se presentan de manera similar. La infección es 4 veces más frecuente en hombres que en mujeres, pero esto se atribuye simplemente a que la mayoría de los trabajadores agrícolas son hombres.

Luego del periodo de incubación, que está estimado entre 6 y 14 días, ocurre una fase prodrómica que dura entre 1 y 5 días, y que típicamente incluye fiebre, malestar, mialgia, anorexia y dolor de cabeza. Estos síntomas son comunes a otras enfermedades lo que puede dificultar el diagnóstico. Al final de la misma, los pacientes en general desarrollan náusea, emesis, dolor abdominal, conjuntivitis, sangrado gingival y mareos. Durante la segunda semana de la enfermedad, son comunes también la deshidratación, hipotensión y confusión. Es durante esta segunda semana que un tercio de los pacientes desarrollan la enfermedad grave con manifestaciones neurológicas, que incluyen temblores, delirio, ataxia, hipo/areflexia, disminución en el tono muscular, convulsiones y coma; y también manifestaciones hemorrágicas que incluyen petequias, equimosis, gingivorragia, hematemesis y melena, hematuria y metrorragia (en las pacientes femeninas). Esta fase puede llevar a la falla multiorgánica y la muerte. La mayoría de los pacientes sintomáticos presentan leucopenia, trombocitopenia y proteinuria. Algunos de estos pacientes - a los cuales les es administrado plasma inmune a modo de tratamiento - desarrollan síndrome tardío neurológico (STN); luego de la recuperación de la enfermedad, reportan mareos, dolor de cabeza y náuseas. Posterior a un periodo de tiempo sin síntomas, los pacientes que presentan STN desarrollan fiebre, parálisis de los nervios craneales y déficits neurológicos como nistagmus. Al menos dos tercios de los pacientes de STN manifiestan tinnitus, visión borrosa, y ataxia dentro de los 7 días, y el 40% reporta diplopía.

La fase de convalecencia puede durar hasta 12 semanas, y es caracterizada por fatiga, irritabilidad, problemas de memoria, mareos y pérdida del cabello.

Diagnóstico clínico y de laboratorio

El diagnóstico de la FHA es establecido primariamente por exámen clínico, análisis bioquímicos generales y anamnesis del paciente (preguntas sobre la historia clínica, en este caso es relevante la permanencia en zona endémica en las últimas tres semanas) (L. H. Harrison et al., 1999). Los síntomas y signos iniciales de la FHA son similares a muchas otras enfermedades infecciosas. La definición de caso probable tiene lugar cuando el paciente presenta una enfermedad aguda acompañada de fiebre, y existe posible exposición a JUNV en las últimas tres semanas. La confirmación del caso clínico ocurre cuando, además de los síntomas y signos coincidentes, hay confirmación de laboratorio de infección por JUNV; ya sea por aislamiento del virus o seroconversión (aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos neutralizantes para JUNV entre la fase aguda y convaleciente). Ha sido propuesto que otras pruebas de laboratorio sean utilizadas para apoyar la definición de caso, en especial para tomar decisiones sobre el uso de plasma de convalecientes, mientras se espera a la confirmación. En las áreas endémicas, la combinación de trombocitopenia (recuento de plaquetas menor a 100.000/mm³) y leucopenia (recuento menor a 4000/mm³) tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 71% para FHA (L. H. Harrison et al., 1999).

Tratamiento

El tratamiento principal de la fiebre hemorrágica argentina, como para otras fiebres hemorrágicas virales, es de soporte intensivo, e incluye la reposición de fluidos y manejo de la fiebre, entre otros.

La respuesta inmune generada contra JUNV puede ser muy efectiva en la eliminación del virus durante la enfermedad aguda y además puede ser suficiente para prevenir reinfecciones. Los anticuerpos detectados en pacientes que comienzan a recuperarse son principalmente del tipo neutralizantes (de Bracco et al., 1978). Por esta razón, se utiliza de manera terapéutica la administración de plasma inmune de convalecientes a los pacientes de FHA como tratamiento, que reduce la mortalidad del 30% al 1% cuando se administra en la ventana adecuada de tiempo. Se recomienda una dosis de al menos 3000 unidades

terapéuticas por kg de peso corporal (Enria et al., 1984). Si bien este tratamiento se encuentra aprobado a nivel local por el ANMAT y es el único efectivo contra la FHA, el número de donantes convalecientes se ha reducido de gran manera con la disminución de la incidencia de la enfermedad (Enria et al., 2008), lo cual dificulta la disponibilidad de plasma. Por otro lado, como ya se ha mencionado, el 10% de las personas que son tratadas de esta manera desarrollan SNT.

Hay estudios que evalúan la administración de ribavirina, una droga antiviral de amplio espectro. Otro antiviral evaluado como potencial tratamiento es el favipiravir, que es un inhibidor selectivo de las RNA polimerasas virales. Sin embargo, ninguno de estos compuestos ha sido aprobado como tratamiento para la FHA.

Profilaxis: vacuna Candid#1

La vacuna a virus atenuado Candid#1 fue introducida en 1991 en nuestro país para la prevención de la FHA e incorporada al Calendario Nacional de Vacunación en 2007.

Esta vacuna fue desarrollada en el marco de un proyecto de colaboración entre el gobierno de la República Argentina, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y el United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID) en Maryland, Estados Unidos.

Candid#1 consiste en una cepa atenuada de JUNV que es derivada de la misma cepa a partir de la cual se obtuvo con anterioridad otra cepa no patogénica llamada XJ-C13 (Weissenbacher et al., 1987). La atenuación de Candid#1 se hizo de manera convencional; mediante el pasaje seriado en animales (cobayos, cerebros de ratón) y cultivo celular (línea FRhL-2, derivada de células epiteliales de mono Rhesus) (Enria & Barrera Oro, 2002). Durante estos múltiples pasajes, el virus adquirió diferentes mutaciones a lo largo de su genoma (Albariño et al., 1997; Goñi et al., 2010). Los estudios recientes de genética reversa (Albariño et al., 2011; Seregin et al., 2015) han identificado la sustitución de una fenilalanina a isoleucina en la posición 427 (F427I) de G2 como el único determinante de atenuación. No se conoce el mecanismo por el cual esta mutación atenúa la virulencia. Sin embargo, el hecho que la no-patogenicidad de Candid#1 dependa exclusivamente de una sola mutación es un punto que genera preocupación debido al potencial de reversión a la virulencia que existe, sobre

todo considerando tanto la alta frecuencia de mutación de los virus a RNA (Holland et al., 1982) como también la alta tasa de recombinación y reasociación que presentan los virus con genoma segmentado (Veza et al., 1980).

Candid#1 demostró no poseer efectos adversos en primates no humanos sin evidencia de persistencia viral en etapas pre-clínicas (McKee et al., 1992). Los ensayos de Fase I y II realizados con voluntarios humanos sanos tanto en Estados Unidos como en Argentina demostraron la seguridad e inmunogenicidad de esta vacuna, no habiéndose reportado anormalidades clínicas, hematológicas o bioquímicas significativas. La respuesta inmune humoral medida por pruebas de neutralización demostró seroconversión en más del 90% de los individuos estudiados, y además se detectó respuesta del tipo celular en un 99% de los mismos (Maiztegui et al., 1998). La Fase III de evaluación, consistente en un ensayo clínico a doble-ciego, aleatorio y controlado con placebo, fue realizada en Argentina con 6500 voluntarios sanos, todos residentes de la zona endémica, entre 1988 y 1990 (Maiztegui et al., 1998). El mismo estimó la eficacia de Candid#1 en un 95.5%. Entre 1991 y 2003 se vacunaron en Argentina más de 250.000 adultos con alto riesgo de adquirir FHA y se confirmaron los hallazgos de las fases clínicas de seguridad, inmunogenicidad y eficacia.

Tanto los estudios previamente mencionados, como la administración de la vacuna entre 1991 y 2003 se llevaron a cabo con una vacuna producida en el Instituto Salk (Pensilvania, Estados Unidos). Sin embargo, entre 2005 y 2006, el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) de Pergamino desarrolló el proyecto de producción nacional de Candid#1, en el cual se demostró que la vacuna producida de manera local era equivalente a la producida en Estados Unidos (Enria et al., 2010). En consecuencia, obtuvo el registro y aprobación en la ANMAT para su uso en seres humanos, y en la actualidad el 100% de las dosis de Candid#1 que se administran en nuestro país corresponden a las producidas localmente.

A pesar de que Argentina produce una vacuna eficaz para la fiebre hemorrágica argentina, la tecnología en la que se basa Candid#1 es costosa y requiere de controles de seguridad que a veces pueden resultar difíciles de alcanzar. Así mismo, al tratarse de una vacuna virus atenuado, siempre existe el riesgo de reversión a fenotipos patogénicos y, además, su administración no está aprobada para menores de 15 años, mujeres embarazadas y personas inmunodeprimidas que al residir en la zona endémica se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad. Por esta razón, la generación de nuevos candidatos vacunales basados en

tecnologías que reduzcan el costo de producción y el riesgo/efectos adversos es de gran interés para nuestro país.

En esta tesis se propusieron y exploraron dos alternativas para la producción de inmunógenos para la FHA, ambas basadas en el sistema de expresión baculovirus-células de insectos.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollo de inmunógenos basados en el sistema de expresión en células de insecto mediada por baculovirus como potencial alternativa a la vacuna a virus atenuado contra la fiebre hemorrágica argentina (Virus Junín: JUNV).

Objetivos específicos

- ♦ Generación y caracterización de baculovirus recombinantes que expresen las diferentes proteínas estructurales de JUNV en células de insecto.
- ♦ Caracterización de la expresión de GPC en la envoltura de los baculovirus.
- ♦ Diseño y obtención de una línea celular de insecto establemente transformada que exprese la proteasa SKI-1/S1P para el correcto procesamiento de las glicoproteínas de los arenavirus.
- ♦ Producción de VLP (*virus-like particles*) de JUNV en el sistema de expresión baculovirus-células de insecto.

Capítulo I - *Baculovirus surface-display* de GPC arenavirales

Introducción

El *display* de proteínas o péptidos heterólogos en la superficie de una célula o virus constituye una herramienta invaluable para la ingeniería de proteínas. Esta técnica ha sido utilizada con múltiples fines; desde investigación básica para la caracterización de las proteínas y sus interacciones, o para investigaciones más aplicadas como el desarrollo de técnicas de diagnóstico o la generación de inmunógenos (Mäkelä et al., 2010; Premanand et al., 2018).

La variante de *surface-display* más utilizada es el *phage-display* (Aghebati-Maleki et al., 2016) pero como se limita a hospedadores bacterianos, las proteínas eucariotas no pueden ser expresadas con todas las modificaciones post-traduccionales que suelen ser necesarias para su función y correcto plegamiento.

Como se mencionó anteriormente en la introducción de la presente tesis, el sistema de expresión baculovirus-células de insecto, es una plataforma eucariota para la expresión de proteínas heterólogas, y constituye una buena alternativa al *phage-display* cuando se requieren modificaciones post-traduccionales más complejas (Grabherr et al., 2001; Mäkelä & Oker-Blom, 2006).

Es el morfotipo viral propagable en cultivo; el virión brotante, el que ha sido ampliamente utilizado para el display superficial mediante diferentes estrategias. La idea general involucra la fusión de la proteína o péptido de interés a alguna proteína viral para lograr que la misma se incorpore al virión brotante. Esto puede ser llevado a cabo de diversas maneras; por fusión a la proteína mayoritaria de cápside VP39 (caso en el cual la proteína de interés estará dentro de la envoltura del BV pero no realmente superficialmente expuesta) (Kukkonen et al., 2003; Molinari et al., 2011; Oker-Blom et al., 2003), por fusión a la glicoproteína GP64, o a partes de ella (Mottershead et al., 1997; Pidre et al., 2013), o incluso por incorporación directa de la proteína a la membrana del BV, como ocurre con la HA de influenza (Borg et al., 2004) y G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Chapple & Jones, 2002; Ojala et al., 2004).

GP64: Estructura y estrategias de exposición superficial

GP64 es una proteína transmembrana de clase I, altamente glicosilada y es la proteína mayoritaria de la envoltura de los viriones brotantes de AcMNPV (Whitford et al., 1989). Posee una longitud de 512 aminoácidos y un peso molecular de entre 64 y 67 kDa, y pertenece a la clase III de proteínas de fusión virales, aunque su estructura difiere de las descritas para otros virus. Se encuentra de forma nativa formando trímeros, y en cada protómero es posible distinguir 5 dominios diferentes.

Las estrategias de exposición superficial mediante fusión de la proteína heteróloga a GP64 son diversas, y la que otorgue mejores resultados dependerá del tipo de proteína que se quiere exponer. Es importante mencionar que los baculovirus recombinantes construidos para el display superficial aún conservan una copia de GP64 *wild type* en su genoma que mantiene su capacidad infectiva en los cultivos de células de insecto.

Fusión a GP64 completa

Esta estrategia requiere la generación de un baculovirus recombinante que expresa la proteína quimérica conteniendo en su extremo N-terminal el péptido señal de GP64, y en su extremo C-terminal el ectodominio completo de GP64. Mediante este método ha sido posible exponer superficialmente proteínas de gran tamaño como GP120 de HIV. Posee como ventaja que la proteína quimérica contiene todas las señales necesarias para el transporte de la misma a la membrana, la maduración e inclusión en los viriones brotantes, pero como desventaja que el proceso de clonado es complejo, y además los vectores de transferencia obtenidos tienen un gran tamaño.

Fusión solo al péptido señal de GP64

Es posible para algunas glicoproteínas o proteínas transmembrana como HA de Influenza anclarse en la membrana de las células de insecto y subsecuentemente en la envoltura del virión brotante sin adicionarles la secuencia transmembrana de GP64. Sin embargo, la incorporación del péptido señal de GP64 facilita el direccionamiento hacia la membrana. De

esta manera lo que se construye es un baculovirus recombinante que posee el ectodominio de la proteína de interés, precedido del péptido señal de GP64.

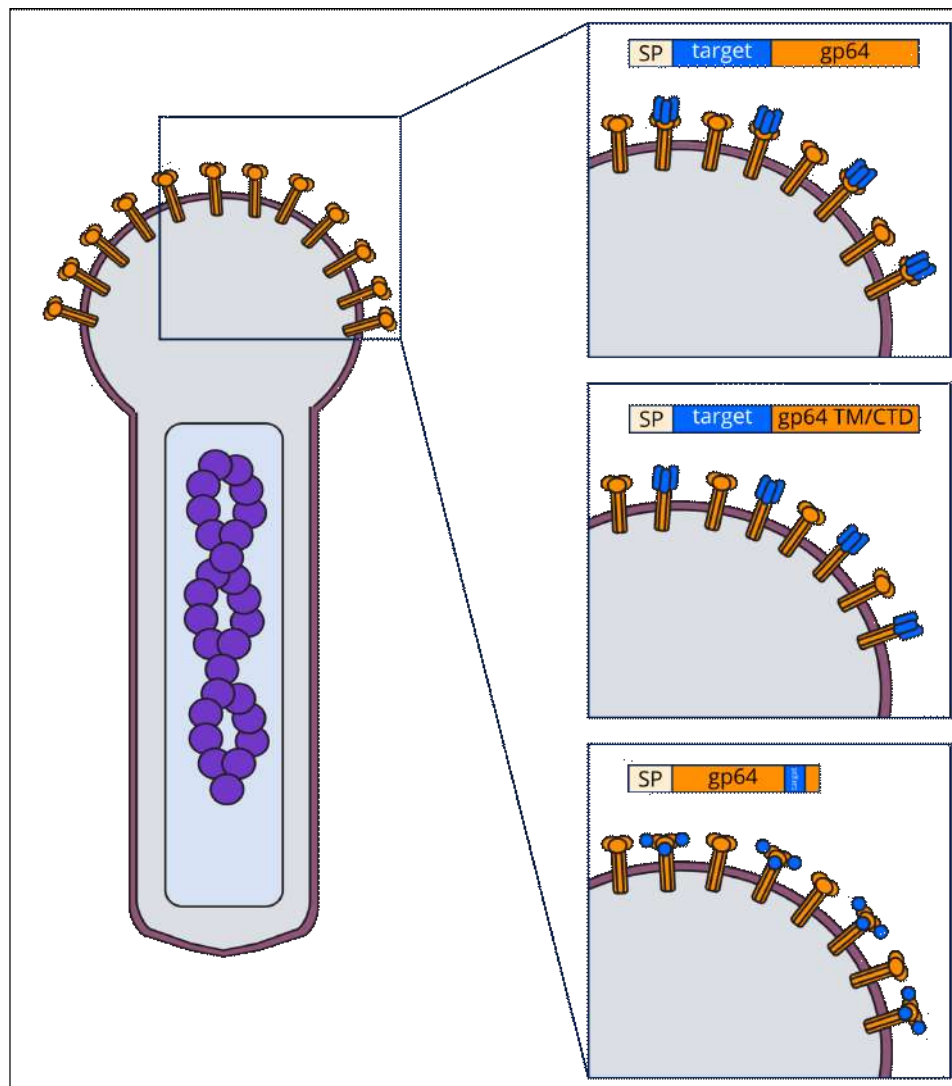


Figura 10. Fusiones a GP64 para la exposición superficial de antígenos. (a) Fusión a GP64 completa **(b)** Fusión solo a los dominios transmembrana (TM) o *cytoplasmic tail domain* (CTD). **(c)** Fusión de un péptido a una copia recombinante de GP64. Figura adaptada de (Pidre et al., 2013)

Fusión al péptido señal, dominio transmembrana y cola citoplasmática de GP64

Esta estrategia y diferentes combinaciones de la misma (SP+CTD, SP+TM, TM+CTD), es la más utilizada actualmente. Permite la exposición de diversos tipos de proteínas, incluyendo aquellas que normalmente no se dirigen ni se anclan a la membrana. Conservar la cola citoplasmática de GP64 (denominado CTD: *cytoplasmic tail domain*) favorece la interacción de la proteína recombinante con la nucleocápside y por ende la incorporación de la misma a los viriones brotantes durante el proceso de brotación.

El display superficial de antígenos utilizando BEVS no es solo una alternativa más económica y segura para el desarrollo de inmunógenos, si no que, además aprovecha la capacidad intrínseca de adyuvante de los baculovirus, generando de esta manera respuestas inmunes fuertes, tanto del tipo humoral como celular.

Estructura de la proteína GPC: desde la traducción a la formación de la espícula viral

El precursor de las glicoproteínas de los arenavirus GPC se sintetiza como un único polipéptido que luego será procesado en tres unidades (SSP, G1 y G2) que interactúan entre sí por uniones no covalentes y forman la espícula viral madura.

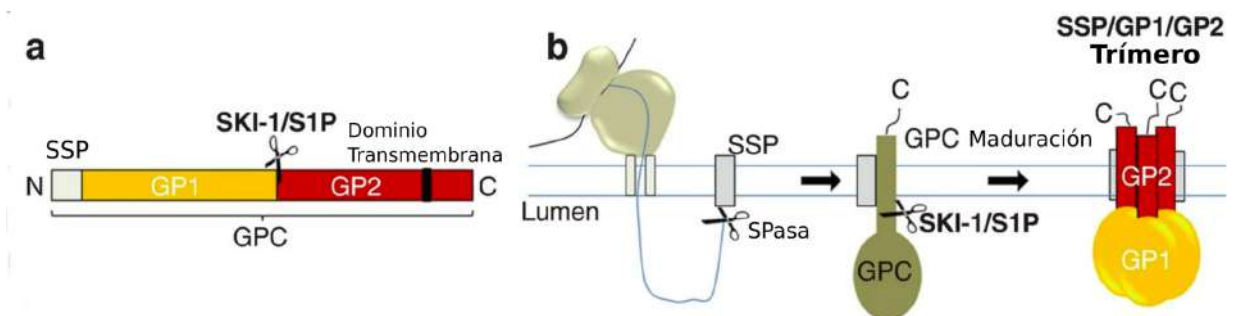


Figura 11. Estructura y procesamiento de GPC. (a) Representación esquemática del precursor de las glicoproteínas arenavirales. En blanco el peptido señal estable (SSP), en amarillo G1, en rojo G2. Resaltado el dominio transmembrana en negro, y el sitio de reconocimiento de SKI-1/S1P. (b) Esquema de traducción, procesamiento y maduración de GPC en el retículo endoplasmático. Adaptada de Burri et al., 2012.

Péptido señal estable (SSP)

El péptido señal estable de los arenavirus tiene como particularidad que, en comparación con sus análogos en otros virus, es inusualmente largo (58 aa) y no es reciclado una vez que se ha separado de G1-G2, si no que forma parte de la estructura final de la espícula mediante interacción directa con G2. Además de su rol como péptido señal para dirigir al polipéptido nascente hacia el interior del retículo endoplasmático, su asociación a G2 es requerida para el tráfico de las glicoproteínas hacia la membrana celular y el correcto ensamblado de la espícula (Bederka et al., 2014; Froeschke et al., 2003; York et al., 2004).

El SSP es clivado por una peptidasa señal (SPasa: *signal peptidase*) del hospedador, y es sujeto a modificaciones post-traduccionales como miristoilación, que son necesarias para la salida del RE.

Glicosilación del complejo G1/G2

La N-glicosilación de G1/G2 es compleja y sus sitios varían dependiendo de la especie del arenavirus, pero se encuentran presentes tanto en G1 como en G2. Algunos de estos sitios son esenciales para el correcto procesamiento de G1/G2, pero otros son dispensables (Bonhomme et al., 2011).

Clivaje de G1/G2

Una vez que el complejo SSP-G1/G2 ha salido del RE e ingresa dentro del Golgi, G1/G2 es procesado en las proteínas individuales por acción de una convertasa denominada SKI-1/S1P (Lenz et al., 2001; Rojek, Lee, et al., 2008). El sitio de reconocimiento de esta proteasa está ampliamente conservado en todos los arenavirus hasta el día de la fecha y se asemeja a los sitios de auto-procesamiento de la propia SKI-1/S1P, con secuencia del tipo RX(hidrofóbico)X↓, donde X es cualquier aminoácido y el hidrofóbico es generalmente una Leucina (Pasquato et al., 2011).

Objetivo general

Ha sido demostrado por otros autores que una respuesta humoral neutralizante otorga protección frente a la FHA (Golden et al., 2016) y se ha propuesto como correlato de protección para la vacuna Candid#1. Debido a que las glicoproteínas constituyen el principal inmunógeno tanto para JUNV como para LASV, y que el *baculovirus surface-display* ha sido utilizado con éxito para la generación de candidatos vacunales para enfermedades virales, nos propusimos ensayar si es posible exponer superficialmente GPC del JUNV y del LASV en los viriones brotantes de AcMNPV.

Objetivos específicos

- ♦ Diseño y generación de baculovirus recombinantes que expresen GPC del virus Junín y del virus Lassa con el tag V5
- ♦ Diseño y generación de un baculovirus recombinante que expresa GPC del virus Junín en fusión al CTD de GP64
- ♦ Caracterización de los virus generados
- ♦ Evaluación de la localización celular de GPC en las células de insecto
- ♦ Evaluación de la exposición superficial de GPC en la membrana de los baculovirus recombinantes

Resultados

Diseño y generación de baculovirus recombinantes que expresan GPC del virus Junín y del virus Lassa con el tag V5

Nuestra estrategia busca reproducir en la membrana del virión brotante del baculovirus la conformación nativa de la espícula arenaviral, por lo cual se decidió conservar el péptido señal estable de GPC, que es esencial para el ensamblado de la misma, y no reemplazarlo con el péptido señal de GP64.

A partir de una construcción previamente sintetizada por la empresa Genscript, solicitamos a dicha empresa el subclonado del ORF de GPC de la cepa Candid#1 de Junín en fusión al tag V5 en el vector de transferencia pBacPAK9. La construcción obtenida se denominó pBacPAK9-GPC:V5 (Figura 12).

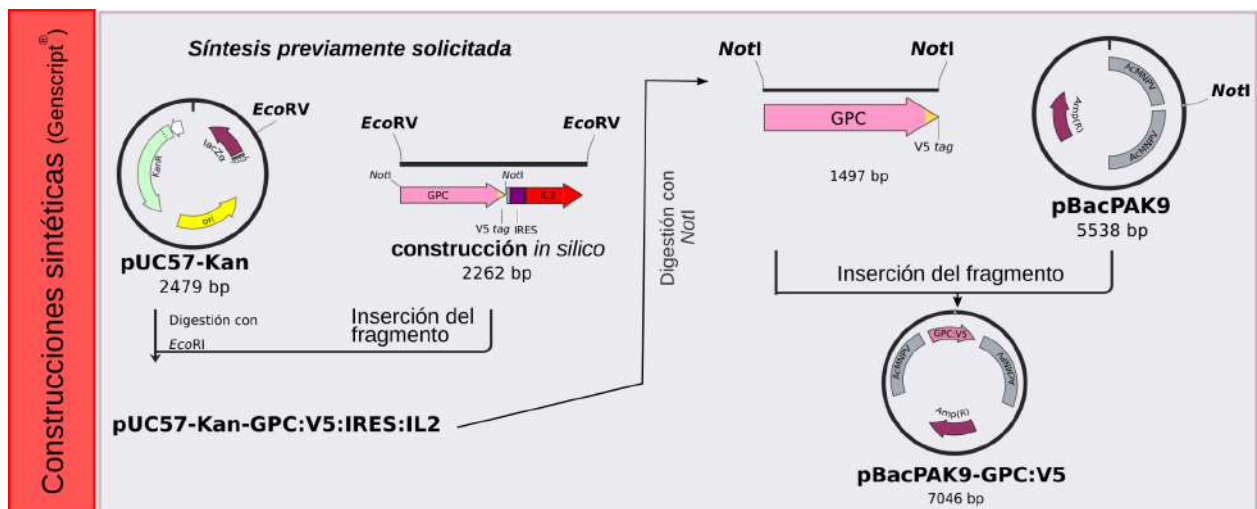


Figura 12. Esquema de síntesis de la construcción del vector pBacPAK9-GPC::V5. Se solicitó a la empresa Genscript el subclonado del ORF GPC::V5 de JUNV a partir de la construcción sintética pUC57-Kan-GPC::V5:IRES:IL2 diseñada previamente en el laboratorio.

Para la proteína GPC de LASV, se utilizó la construcción gentilmente cedida por el Dr. Jack Nunberg denominada pHCMV-LASV:Sig, que contiene el ORF completo de GPC de la cepa Josiah. Este ORF fue amplificado por PCR utilizando *primers* específicos, purificado, y clonado en el vector pGEM[®]-T Easy (Promega, Madison, EE.UU.) La secuencia de las inserciones de los clones fue confirmada experimentalmente (Macrogen, Corea del Sur) y, luego, el inserto se

subclonó en el vector de destino pBacPAK9 previamente digerido con las enzimas de restricción *SacI*/*NotI*. El plásmido obtenido se denominó pBacPAK9-GPC:LASV. Para poder detectar la proteína GPC de LASV, fue necesario incorporar a este vector la secuencia para el tag V5. Con tal fin, la secuencia correspondiente al tag fue amplificada por PCR a partir del vector pB-V5/His con *primers* específicos y clonado en el vector pGEM-T EASY (Figura 13A). Este vector se denominó pGEM-T:V5, que fue secuenciado para confirmar la correcta inserción del tag. A continuación, se digirió el vector pBacPAK9-GPC:LASV y pGEM-T:V5 con las enzimas de restricción *NotI* y *PacI*, se purificaron los insertos y se ligaron para incorporar el tag V5 al vector de transferencia generando el pBacPAK9-GPC:LASV::V5 (Figura 13B).

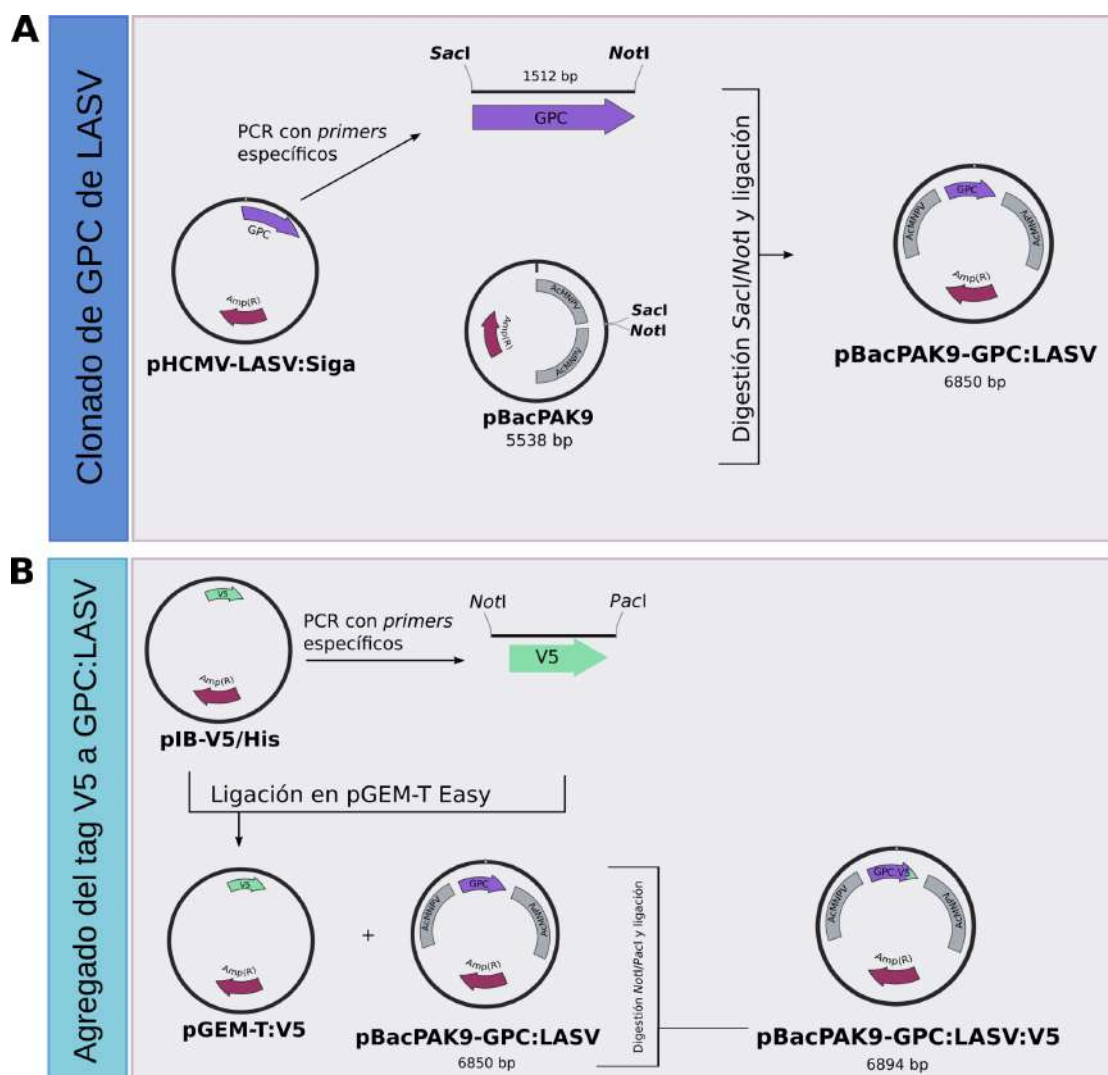


Figura 13. Esquema de clonado de las construcciones (A) pBacPAK9-GPC:LASV. (B) pGEMT-V5 y pBacPAK9-GPC:LASV::V5.

Para la generación de los virus recombinantes AcMNPV-GPC::V5 y AcMNPV-GPC:LASV::V5, se co-transfectaron células High Five (ver sección materiales y métodos) con el báculo

bApGOZA y el plásmido de transferencia correspondiente, en experimentos independientes (Je et al., 2001). Se procedió al seguimiento del cultivo celular por microscopía de contraste de fase hasta observar la formación de poliedros a las 96 horas post transfección (h.p.t.), se cosechó el sobrenadante, y éste fue posteriormente propagado para la generación de los *stocks* virales (Figura 15).

Diseño y generación de un baculovirus recombinante que expresa GPC de JUNV en fusión al CTD de GP64

Comúnmente, cuando se busca construir un baculovirus para *surface-display*, la proteína heteróloga es fusionada a alguna región de la proteína GP64 de los baculovirus. En esta tesis, se decidió generar una variante de GPC que incorpora el dominio CTD de GP64. El agregado de este dominio a proteínas heterólogas ha sido reportado por otros autores (Long et al., 2006; Tung et al., 2020) como un factor que incrementa el porcentaje de proteínas que se incorporan a la membrana del virión brotante, en contraste con las versiones *wild-type* de esas mismas proteínas.

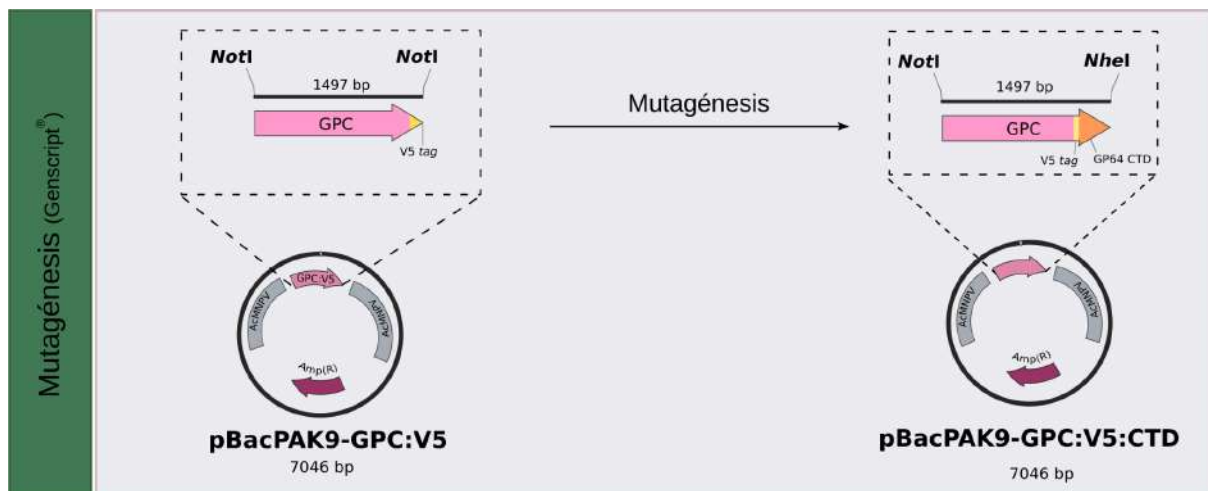


Figura 14. Mutagénesis del vector pBacPAK9-GPC::V5 para la obtención del vector pBacPAK9-GPC::V5::CTD. A partir de la construcción sintética pBacPAK9-GPC::V5 se solicitó a la empresa Genscript un servicio de mutagénesis para el agregado en marco traduccional del CTD de la proteína GP64 *downstream* del tag V5. Lo que se modificó fue el codón de terminación del *tag*, y parte externa del vector pBacPAK9; la secuencia de GPC::V5 se encuentra completa.

A partir de la construcción pBacPAK9-GPC::V5, se solicitó a la empresa Genscript el servicio de mutagénesis que permitió la incorporación del CTD en el extremo C-terminal de GPC::V5. De esta manera, el plásmido de transferencia obtenido, denominado pBacPAK9-GPC::V5::CTD (Figura 14) fue co-transfectado con el bAcMDO en células

High Five . A los 7 días post-transfección, cuando era posible observar signos de infección tardíos (poliedros, Figura 15), se colectaron los sobrenadantes y los mismos fueron amplificados para generar los stocks virales. El baculovirus recombinante se denominó AcMNPV-GPC::V5::CTD.

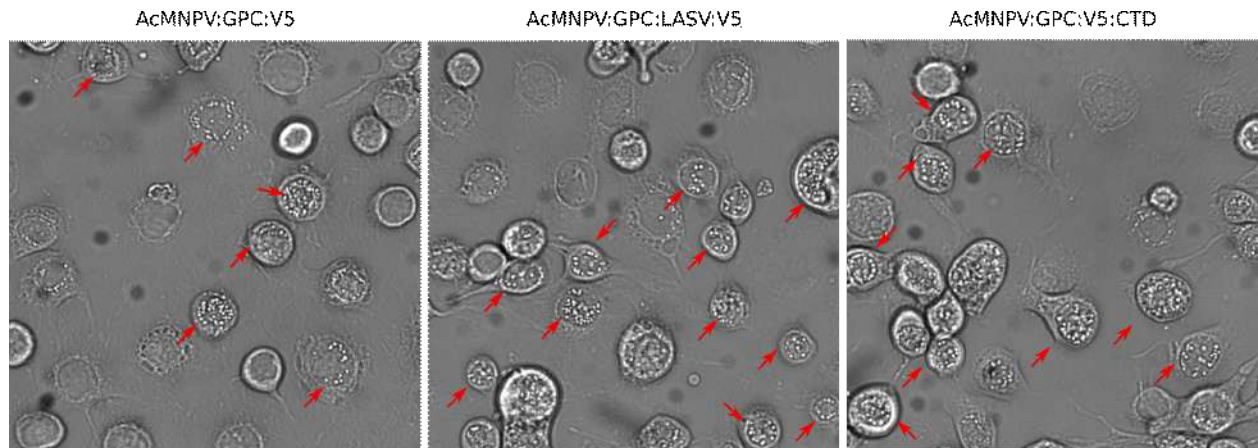


Figura 15. Signos tardíos de infección en las células transfectadas con el bÁcrido bApGOZA y los plÁsmidos de transferencia generados. Las flechas rojas señalan células con cuerpos de oclusión de AcMNPV.

Caracterización de los virus generados

Para confirmar la presencia de la construcción génica exógena en el genoma del bÁcrido, se realizó un ensayo de PCR amplificando parte del gen GPC a partir de DNA genómico del sobrenadante del tercer pasaje (generación P4) en cultivo celular. Como se observa en la figura 16A, fue posible amplificar un fragmento del gen GPC (~400 pb) usando el DNA genómico extraído de los tres virus, pero no del bÁcrido (control negativo) confirmando de esta manera que los recombinantes incorporaron el gen de interés.

Posteriormente, se evaluó la expresión de las proteínas recombinantes en células HighFive mediante *western blot* e inmunofluorescencia utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo anti-V5 (Figura 16B y C, respectivamente). Como control negativo se utilizaron células sin infectar en ambos casos.

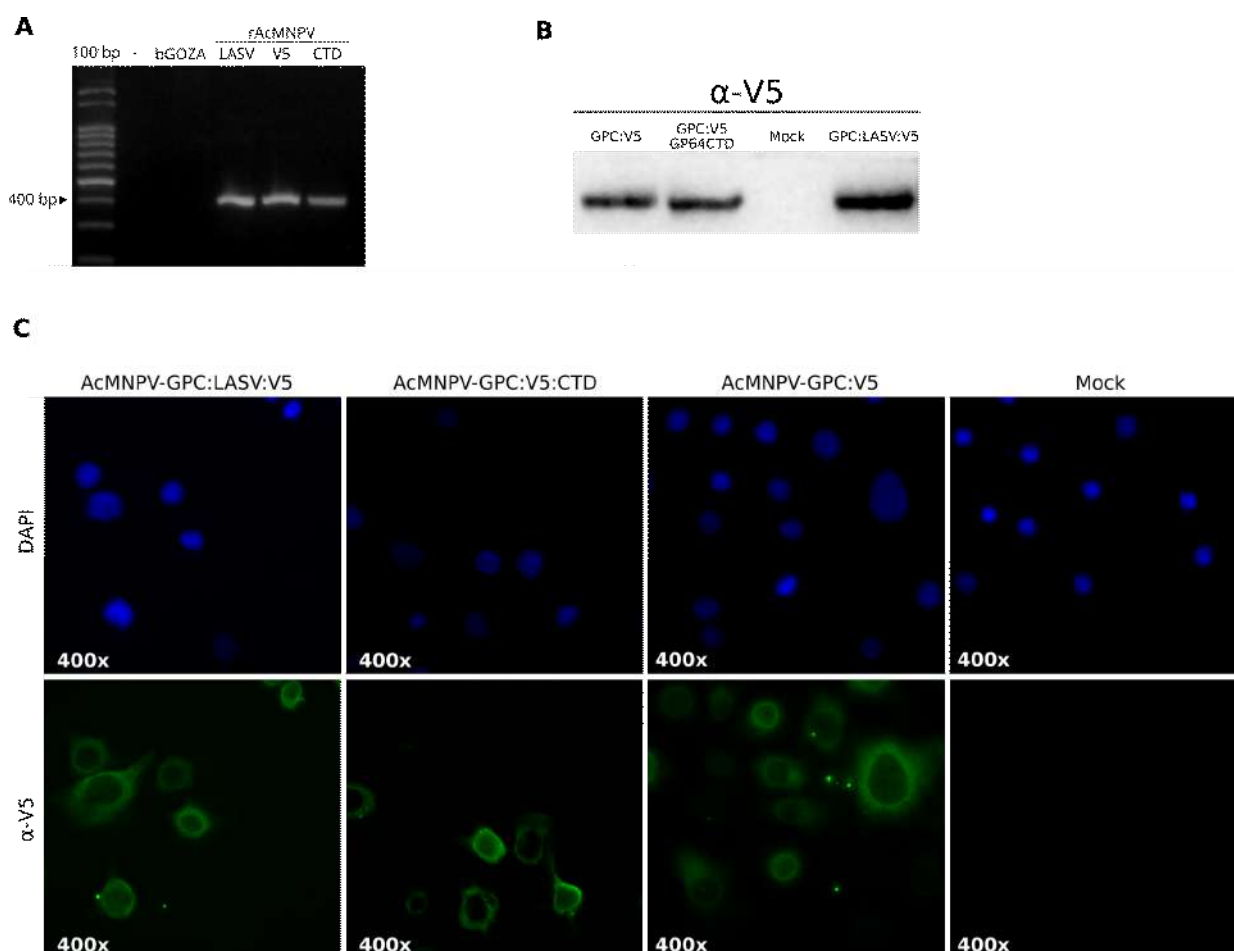


Figura 16. Caracterización de los virus generados. (A) PCR sobre extracciones de genoma viral. La PCR con primers específicos confirma la correcta inserción de los transgenes en el genoma baculoviral para los 3 virus. (B) Western blot con anticuerpo anti-V5. Se observa que todos los virus expresan correctamente la fusión. (C) Inmunofluorescencia con anticuerpo anti-V5 de células infectadas. Se observa que solo las células infectadas con los baculovirus recombinantes poseen señal Anti-V5, confirmando que expresan de manera correcta la fusión.

Localización celular de GPC en células de insecto

Para comprobar si GPC se localiza en la membrana plasmática de las células de insecto se realizaron ensayos de co-localización entre GPC y la membrana plasmática.

Para marcar la membrana plasmática, a las 48 h.p.i, las células fueron incubadas con una solución de WGA-Alexa555. Esta tinción se basa en la unión del WGA (*Wheat germ agglutinin*) a las glicoproteínas de membrana mediante unión directa a la N-acetil-D-glucosamina y los residuos de ácido siálico. Las células fueron observadas por

microscopía confocal. En la figura 17 se muestran los resultados para el virus AcMNPV-GPC::V5.

Este experimento permitió determinar que GPC se localiza en la membrana plasmática de las células de insecto sin la necesidad de la incorporación de un péptido señal de insecto.

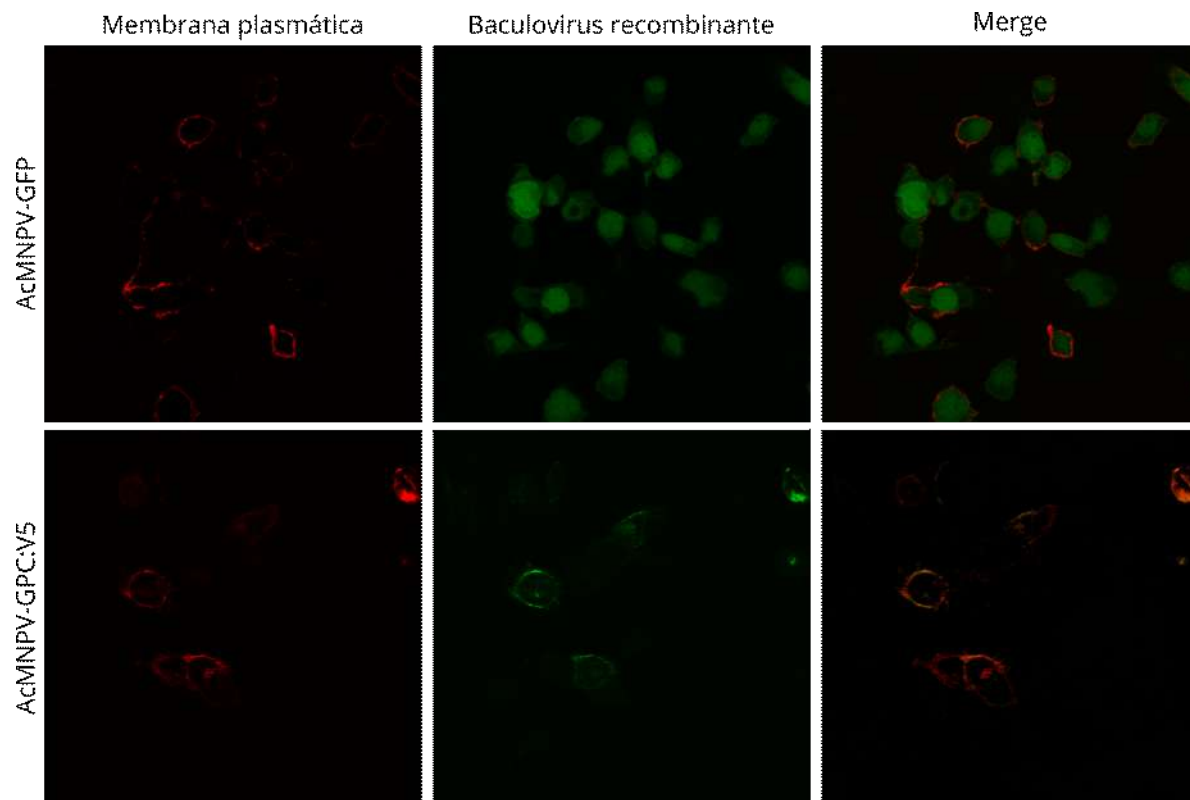


Figura 17. Localización superficial de GPC en células infectadas con AcMNPV-GPC::V5. Se marcó la membrana plasmática de células infectadas con AcMNPV-GFP (control negativo) e infectadas con AcMNPV-GPC::V5 con el reactivo WGA-Alexa 555. Las células no fueron permeabilizadas. En el caso de AcMNPV-GPC::V5, GPC fue detectada con un anticuerpo anti-GPC. Las células fueron observadas por microscopía confocal, y fue posible observar co-localización entre GPC y la membrana plasmática, lo cual indica que la misma se localiza allí sin necesidad de cambiar su péptido señal.

Localización superficial de GPC en la membrana de los viriones brotantes

Para determinar si las distintas construcciones de GPC ensayadas se localizan en la membrana de los viriones brotantes, los mismos fueron parcialmente purificados y

concentrados por ultracentrifugación en colchón de sacarosa, y se buscó detectar GPC en los *pellets* obtenidos mediante western blot.

No fue posible detectar ninguna de las versiones de GPC en los *pellets* correspondientes a los viriones brotantes, pero si GP64 (Figura 18).

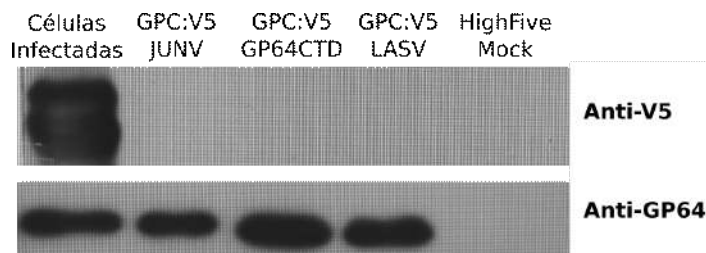


Figura 18. Localización superficial de GPC en la membrana de viriones brotantes. Western blot de viriones parcialmente purificados y células infectadas (control positivo) con anticuerpos anti-GP64 y anti-V5. No fue posible detectar señal para GPC en ninguno de los *pellets* obtenidos, pero se confirmó la presencia de los viriones (GP64 +).

Conclusiones y discusión

El *display* superficial de antígenos de diversa naturaleza en el sistema baculovirus-células de insecto ha sido logrado con éxito por múltiples grupos de investigación.

En este capítulo de tesis se buscó generar baculovirus brotantes de AcMNPV que lleven en su superficie la proteína GPC de JUNV. Para esto, se utilizaron dos estrategias distintas; la primera fue la exposición superficial de GPC sin la adición de secuencias pertenecientes a la glicoproteína baculoviral GP64, y la otra, fue mediante la incorporación de la secuencia del CTD de GP64, manteniendo el péptido señal estable de GPC y su secuencia completa.

Se construyeron exitosamente tres baculovirus recombinantes que expresan de manera correcta las proteínas GPC wild-type de JUNV y del LASV, y una versión quimérica de la proteína GPC de JUNV que incorpora el CTD de GP64.

Si bien las tres proteínas se localizan en la membrana de las células de insecto, por lo cual es posible aseverar que el péptido señal estable de GPC es capaz de direccionar correctamente a las glicoproteínas a la vía secretoria, no fue posible observar incorporación de GPC a la membrana de los baculovirus en ninguno de los casos.

Son pocos los casos reportados en bibliografía en los cuales las estrategias utilizadas en esta tesis logran de manera eficiente la incorporación de la proteína heteróloga en la membrana de los baculovirus, siendo siempre más efectiva la incorporación de pequeños péptidos en fusión a GP64 (o partes de ella). Sin embargo, se quería obtener la espícula viral completa para la correcta exposición de los epítopes antigénicos dependientes de la conformación nativa de GPC, incluyendo los péptidos presentes en G2 que son los responsables de la fusión entre las membranas, y los anticuerpos que reconocen esta región inhiben el proceso de entrada viral (York et. al, 2010).

No se descarta a futuro evaluar otro tipo de estrategias, que involucren GPC y GP64 quimérica, dado el gran atractivo del *display* superficial.

Capítulo II - Procesamiento de GPC en células de insecto

Introducción

Las modificaciones post-traduccionales y co-traduccionales incrementan la diversidad de las proteínas codificadas en los genomas de los organismos. La mayoría de las veces, estas influyen su función y se introducen en las proteínas o péptidos *target* mediante pasos enzimáticos específicos.

Una modificación post-traduccionales irreversible muy común es la proteólisis de las proteínas en sitios determinados para generar múltiples productos. Este proceso está mediado por proteasas que clivan uniones peptídicas determinadas. Los análisis tanto del genoma humano como del de ratón, revelan que hay cerca de 600 proteasas distintas que pertenecen a diferentes clases de enzimas proteolíticas. Dentro de estas se encuentran las serin-proteasas, caracterizadas por la presencia de un residuo de serina en el sitio activo que juega un papel esencial en la hidrólisis de las uniones peptídicas de sus sustratos.

Las proteínas de fusión virales de tipo I, incluyendo las de los virus de la influenza, HIV-1, Ebola y SARS-CoV-2, se sintetizan como precursores inactivos que se ensamblan como trímeros y luego del clivado proteolítico generan las espículas maduras que poseen capacidad fusogénica. El precursor de las glicoproteínas de los arenavirus GPC pertenece a este tipo de proteínas de fusión y se sintetiza como un polipéptido compuesto por un péptido señal estable (SSP: *stable signal peptide*) en el extremo N-terminal y luego las dos glicoproteínas G1 y G2.

SKI-1/S1P: Subtilisin kexin isozyme-1

Miembro de la familia de las pro-proteína convertasas, esta serín-proteasa, que se asemeja a la subtilisina bacteriana, es una enzima esencial en múltiples procesos celulares como lo son la activación de factores de transcripción unidos a membrana, el procesamiento de otras proteínas específicas que transitan el aparato de Golgi y el anabolismo de ácidos grasos y colesterol. Además, cumple funciones generales dentro de la respuesta al estrés celular, la supervivencia neuronal, y el direccionamiento de proteínas hacia los lisosomas.

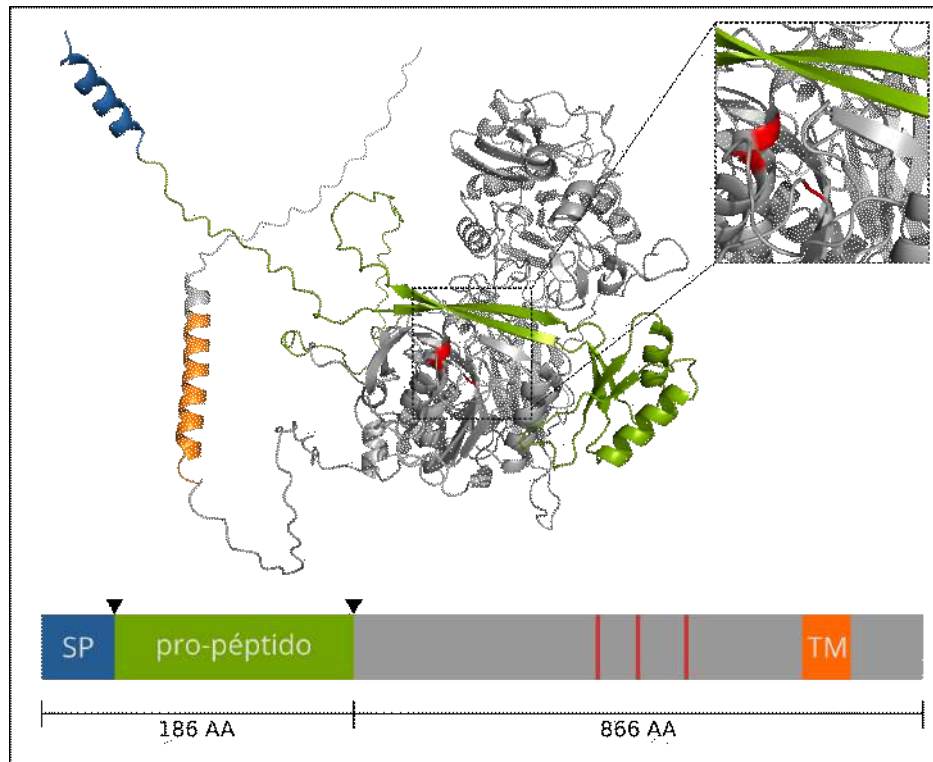


Figura 19. Estructura y representación esquemática de SKI-1/S1P. En la parte superior del panel se observa la predicción de AlphaFold2 para la estructura de SKI-1/S1P humana. Se resaltan el péptido señal (azul), el dominio transmembrana (TM naranja), el pro-péptido (en verde) y el sitio activo (en rojo). Es posible observar que el pro-péptido cubre el sitio activo de la proteasa, y que es por esto que la forma activa es sin dicho pro-péptido. En la parte inferior se esquematiza la organización del polipéptido incluyendo los sitios de procesamiento.

Se encuentra codificada por el gen MBTPS1 en los humanos y se sintetiza como un polipéptido inactivo de 1052 aa. Su maduración requiere del procesamiento inicial por una SPasa, que libera su péptido señal de 16 aa, y luego, se autoprocresa en dos sitios para dar lugar a la forma activa de 866 aa que se encuentra en el lado luminal del aparato de Golgi pero unida a membrana (da Palma et al., 2014, 2016).

Esta proteasa y una SPasa son esenciales para el procesamiento de la GPC de los arenavirus en sus 3 unidades. Este proceso es esencial para el correcto plegado y la formación de la espícula viral madura, que será la responsable de la interacción con el receptor celular y mediará luego la fusión de membranas y la consecuente liberación del material genético viral al interior de la célula para comenzar el ciclo replicativo.

Si G1 y G2 se mantienen covalentemente unidas, las espículas no son capaces de mediar la fusión de las membranas virales con las de los endosomas (Burri et al., 2013). El complejo

formado de esta manera es altamente estable, pero presenta alta propensión a formar oligómeros heterogéneos y estructuras similares a la de post-fusión de la espícula. Sin embargo, en el caso de JUNV, las espículas ensambladas de esta manera aún son capaces de unirse al receptor de transferrina, pero cuando se busca generar inmunógenos, es conveniente trabajar con la estructura de pre-fusión (Hastie & Saphire, 2018).

Antecedentes del procesamiento de la proteína GPC en células de insecto

A pesar de la existencia de un ortólogo de SKI-1/S1P en células de insecto, otros autores han mostrado que GPC no es clivada completamente en este sistema (Thomas et al., 2011, 2012). Una de las estrategias publicadas para intentar resolver este problema involucra el reemplazo del sitio de reconocimiento de SKI-1/S1P por el de furina, otra convertasa de la misma familia, sin éxito (Thomas et al., 2012). Lo cual es posible atribuirlo a la especificidad de secuencia para los productos de los genes ortólogos de insectos.

Objetivo general

A pesar de que la plataforma BEVS constituye un sistema de expresión eucariota, en algunas oportunidades las proteínas de interés requieren modificaciones post-traduccionales específicas que el sistema no permite.

Siendo el objetivo principal de esta tesis la generación de inmunógenos derivados de JUNV con las glicoproteínas como antígeno principal, cuya estructura trimérica de pre-fusión requiere un procesamiento adecuado del precursor, y ya habiendo otros autores demostrado que el mismo no es correctamente procesado en células de insecto, nos propusimos generar una línea celular de insecto establemente transformada que exprese de manera constitutiva la SKI-1/S1P humana para intentar suplir esta deficiencia.

Objetivos específicos

- ♦ Clonado del cDNA correspondiente a SKI-1/S1P en un vector de expresión de insecto a partir de mRNA de células humanas
- ♦ Generación de una línea celular de insecto establemente transformada que exprese constitutivamente SKI-1/S1P
- ♦ Diseño y generación de un sensor de actividad basado en un gen indicador fluorescente
- ♦ Evaluación de la capacidad de procesamiento de la línea celular de insecto generada

Resultados

Clonado del cDNA de SKI-1/S1P

Alineamiento múltiple de los ortólogos de Homo sapiens, Mus musculus y Trichoplusia ni

Se realizó un alineamiento múltiple entre las secuencias de los ortólogos de SKI-1/S1P de humano, ratón doméstico y *Trichoplusia ni* (organismo del cual deriva la línea celular High Five).

Para identificar el ortólogo de *Trichoplusia ni*, se hizo un t-blast-n con 250 aminoácidos del dominio catalítico de SKI-1/S1P humano sobre el genoma publicado de la línea celular High Five (Fu et al., 2018). Los péptidos encontrados fueron luego buscados en Uniprot, aplicando filtro de organismo en la búsqueda. A0A7E5VIB2 se encuentra anotada de manera automática como “*membrane bound transcription factor peptidase site-1*”. Una vez identificada, se realizó un alineamiento múltiple ClustalX (Blosum62). Lo primero que se puede observar en el alineamiento, es que el ortólogo de insecto es ligeramente más pequeño (1044 aa) que el de ratón y humano (1052 aa). El porcentaje de identidad compartido entre la proteasa de *Homo sapiens* y *Mus musculus* es de 95.82%. Mientras que ese valor para *Trichoplusia ni* y *Homo sapiens* es solo del 54.02%. Sin embargo, el sitio catalítico está completamente conservado.

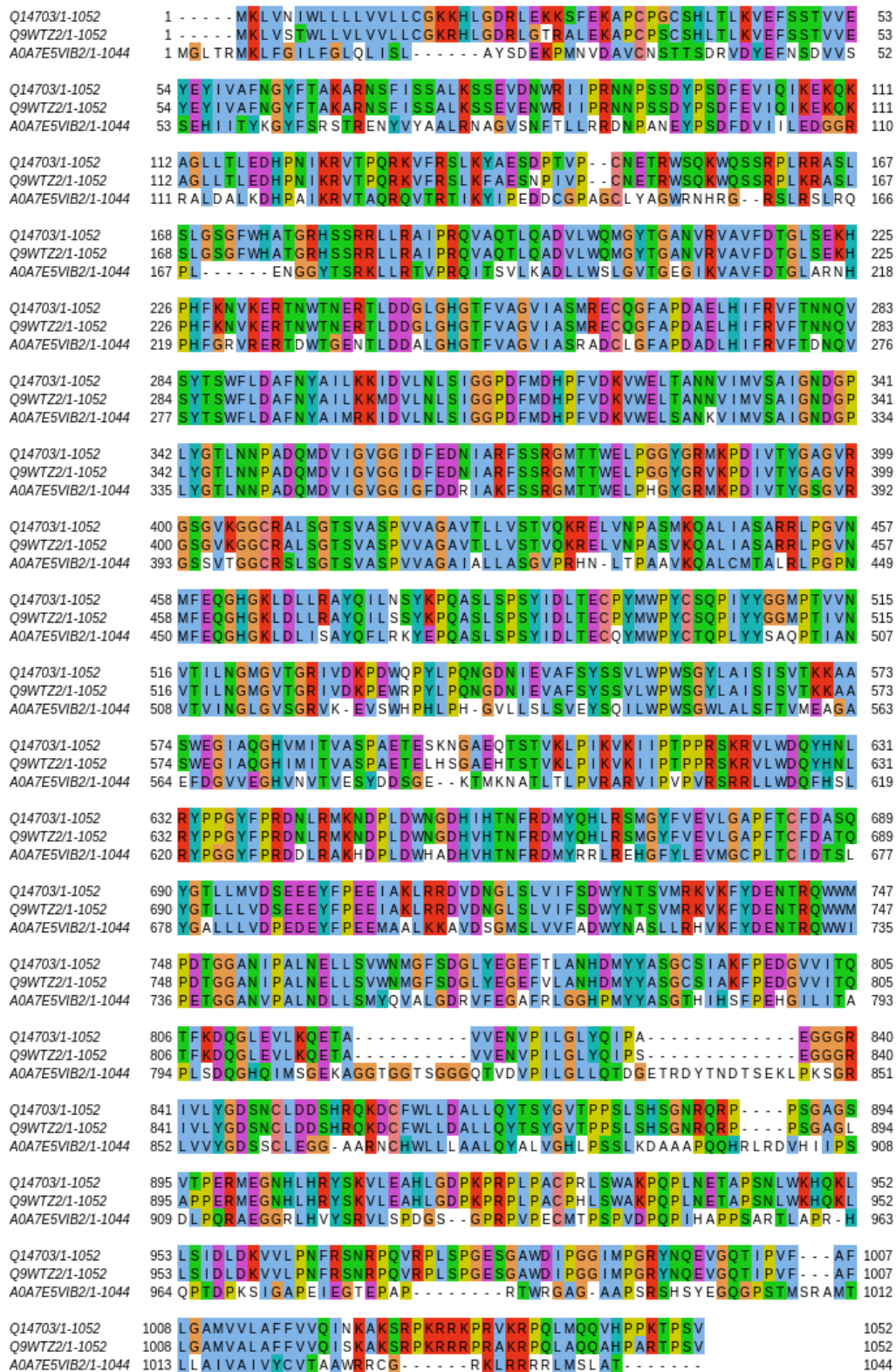


Figura 20. Alineamiento de secuencias de SKI-1/S1P de diferentes organismos. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos con ClustalX para las proteínas A0A7E5VIB2 de *T. ni*, Q14703 de *H. sapiens* y Q9WTZ2 de *M. musculus*.

Clonado del cDNA de *SKI-1/S1P* de *Mus musculus* en el vector de expresión *PIP*

A partir del plásmido sintético pcDNA3-MBTPS1::FLAG (Genscript®), se amplificó el ORF completo MBTPS1::FLAG utilizando los *primers* específicos *NM_001167910_Fwd_SacI* y *FLAG_XhoI* y una polimerasa de alta fidelidad (Figura 21A). Debido a que esta polimerasa no incorpora polyA en los extremos de los productos de PCR se realizó un *tailing* con Taq polimerasa para poder clonar el producto de PCR en el vector de entrada pGEM-T Easy.

Este plásmido y el vector pIP-V5/His fueron digeridos con las enzimas *SacI* y *XhoI*, se purificó el fragmento correspondiente al ORF, y se ligaron. Los clones que resultaron positivos tras el *screening* (Figura 21B) fueron secuenciados para asegurar la correcta inserción del gen de interés.

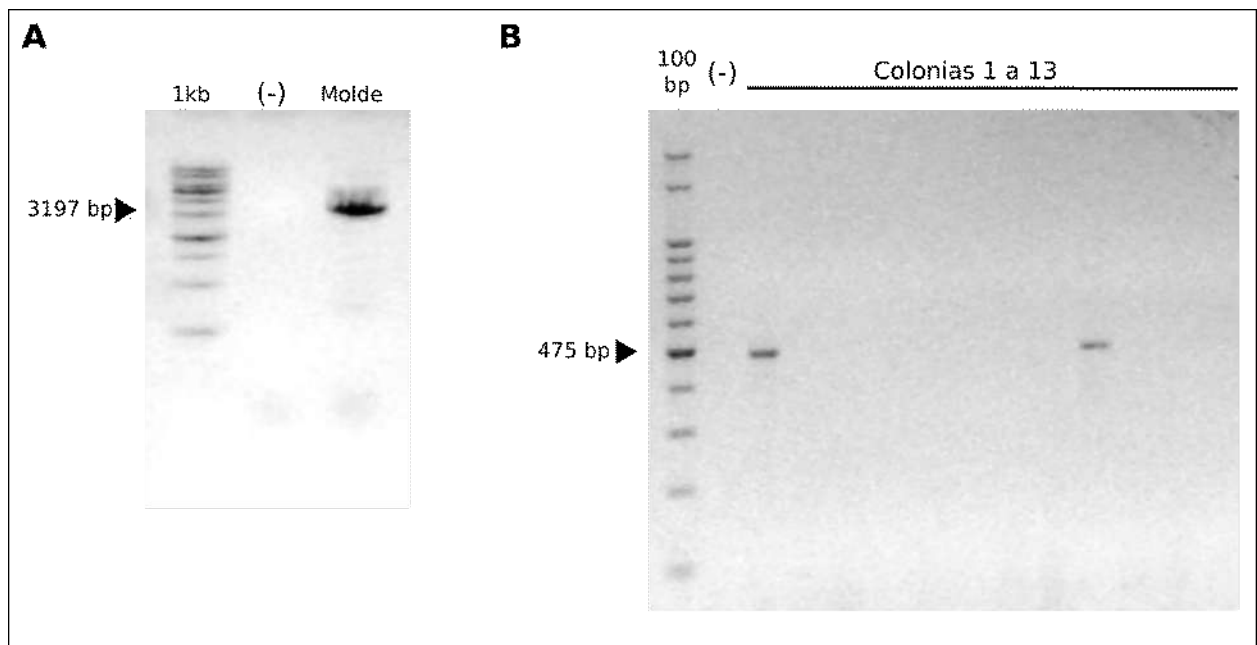


Figura 21. Clonado del ORF de *SKI-1* de *Mus musculus* en el vector de expresión *PIP*. (A) PCR preparativa con *primers* específicos. (B) Colony PCR con *primers* específicos sobre las colonias obtenidas tras la ligación del inserto en el plásmido *PIP*. solo 2 colonias de 19 fueron positivas. Los plásmidos obtenidos fueron secuenciados.

Generación de un baculovirus recombinante que expresa *SKI-1/S1P*

Se generó un baculovirus recombinante denominado AcMNPV-MBTPS1 que expresa *SKI-1/S1P* murina bajo el control del promotor viral tardío p_{polh} como alternativa a la línea celular transgénica.

Para esto, el ORF completo MBTPS1:FLAG fue clonado en el vector de transferencia pBacPAK9 con las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*. Los clones positivos fueron identificados por colony PCR (figura 22A).

A continuación, las células de insecto High Five se co-transfectaron con el báculo bApGOZA. A los 7 días post-transfección, tras la aparición de signos de infección tardíos (evidenciados por la presencia de cuerpos de oclusión), se colectaron los sobrenadantes y los mismos fueron posteriormente amplificados (Figura 22B).

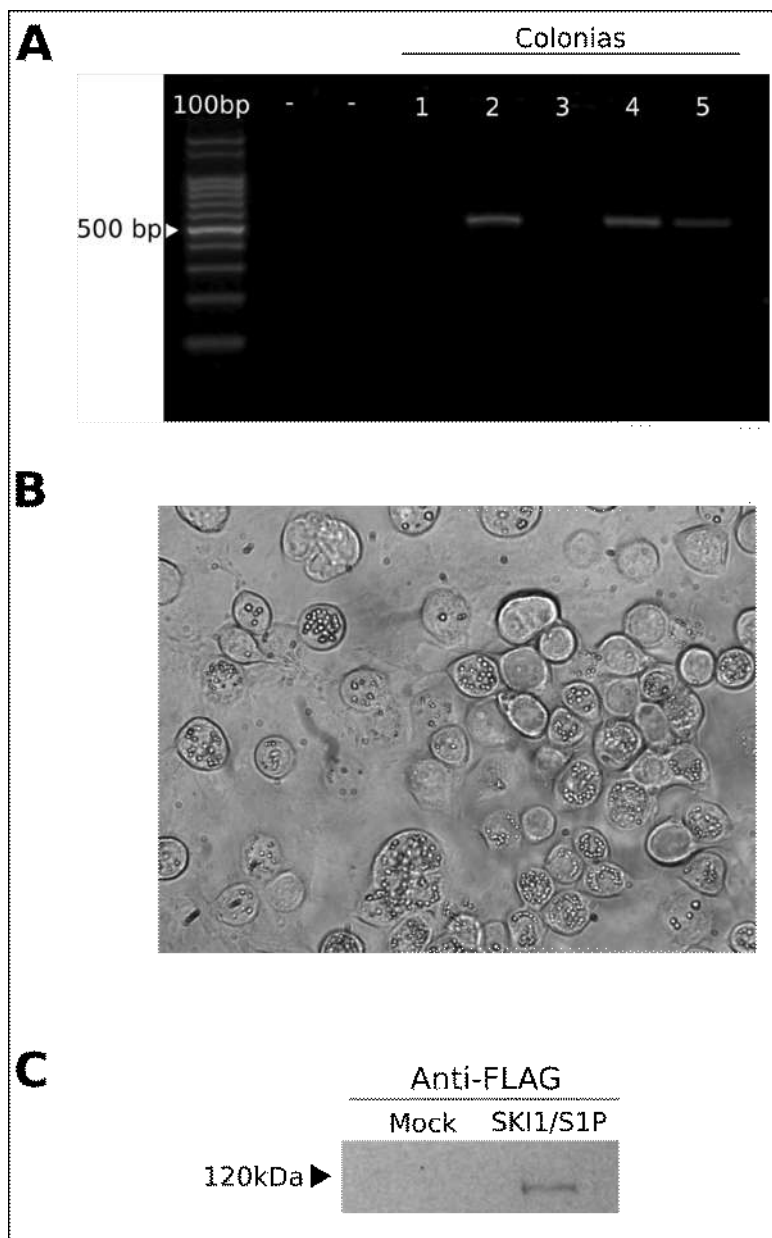


Figura 22. Generación de un baculovirus recombinante que expresa SKI-1/S1P. (A) Colony PCR. Se obtuvieron tres clones positivos de 5 colonias obtenidas tras la transformación de la ligación en células *E. coli*. **(B)** Micrografía en contraste de fase de células co-transfectadas con bApGOZA y el vector de transferencia pBacPAK-SKI1. Es posible observar cuerpos de oclusión (signo tardío de infección) en las células transfectadas tras 7 días. **(C)** Western blot sobre células infectadas con el baculovirus recombinante. Utilizando un anticuerpo anti-FLAG se confirmó la correcta expresión del transgén en células infectadas con el baculovirus recombinante que expresa SKI-1/S1P de ratón.

Expresión de SKI-1/S1P murina en células High Five

Paralelamente, se comprobó la expresión correcta del transgén en células transfectadas de manera transitoria con el vector pIP-MBTPS1:FLAG mediante ensayos de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-FLAG (Sigma). Es posible observar en la figura 23A, que solo las células transfectadas con el plásmido pIP-MBTPS:FLAG muestran marca positiva. El patrón de localización subcelular de la proteína corresponde con el reportado; un patrón de puntos característico de proteínas que se encuentran en el sistema de endomembranas y vesículas secretorias (Seidah et al., 1999).

Para determinar si la marca correspondía efectivamente a la fusión MBTPS1:FLAG y no sólo al *tag*, se realizó un western blot utilizando como muestra una extracción de proteínas totales de las células transfectadas. Como se muestra en la figura 23B, se observa la banda correspondiente al tamaño esperado para la construcción MBTPS1:FLAG (120 kDa) corroborando la correcta expresión de la proteína.

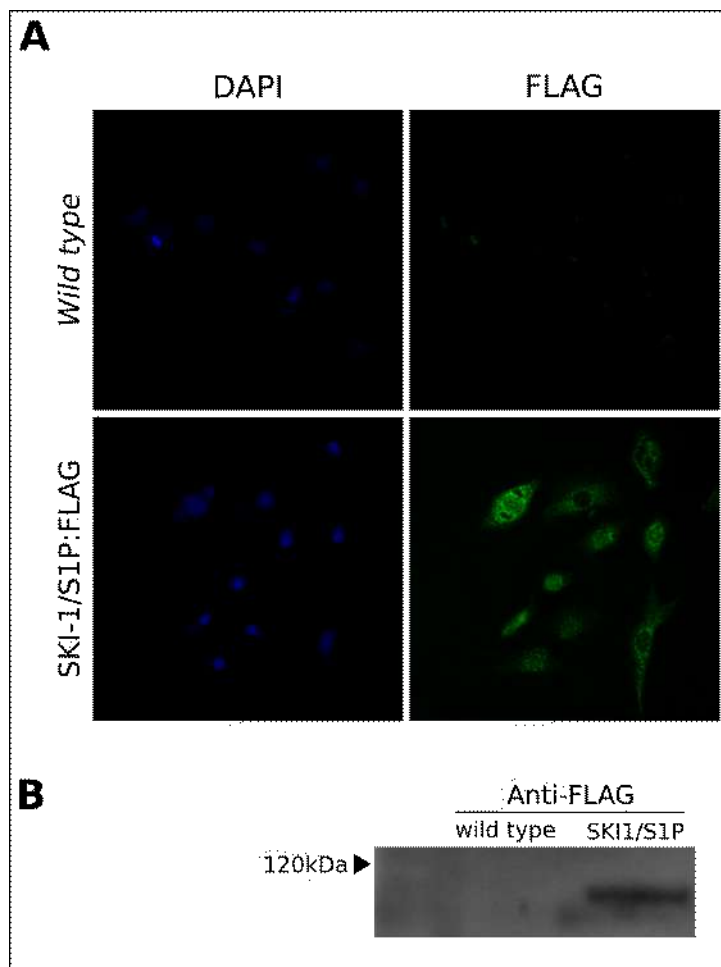


Figura 23. Expresión transiente de SKI-1/S1P en células de insecto mediante transfección. Para comprobar la correcta expresión del plásmido pIP-SKI1/S1P previo a la generación de la línea celular transgénica, se realizaron **(A)** una inmunofluorescencia sobre células transfectadas y **(B)** Un western blot sobre lisado de células transfectadas con anticuerpo anti-flag. Fue posible confirmar de esta manera la correcta expresión del transgén.

Línea HighFive:mSKI1/S1P establemente transformada

Generación de la línea

Las células High Five *wild type* fueron modificadas genéticamente para que expresen de manera constitutiva el gen *mbtps1:flag*, con el fin de evaluar si la expresión heteróloga de esta proteína mejora el procesamiento del precursor de las glicoproteínas arenavirales.

Con el vector de expresión pIP-MBTSP1:FLAG se generó una línea celular de insecto transgénica, denominada High Five:mSKI-1/S1P que expresa la proteasa de *Mus musculus* de manera constitutiva. Para la generación de la línea, las células High Five fueron transfectadas con el plásmido e incubadas con medio de selección (Medio de Grace 10%SFB, 10ug/ml puromicina), hasta que se obtuvieron clones resistentes al antibiótico. Estos fueron amplificados y se congelaron múltiples viales para la generación de un banco maestro de células.

Caracterización de la línea transgénica

Expresión del transgén

Esta línea celular no expresa un gen reportero que facilite la detección directa de clones que expresen el polipéptido SKI1/S1P:FLAG. Por lo tanto, la expresión del transgén debió ser evaluada y confirmada para todos los clones mediante inmunofluorescencia y western blot.

En la figura 24A se observan los resultados de western blot para uno de los clones ensayados. Como control negativo se utilizaron células High Five *wild type*, mientras que como control positivo se utilizaron células High Five infectadas con el virus AcMNPV-MBTSP1. Fue posible confirmar la correcta expresión de la proteasa en la línea transgénica, observándose dos bandas (Figura 24A); la más intensa, de 120 kDa corresponde a la proteasa completa (aún con el pro-péptido), mientras que la de aproximadamente 97 kDa corresponde a la forma activa de la proteasa (sin el pro-péptido). En el panel B de la figura 24, se observan los resultados de la inmunofluorescencia; donde solo hay marca en la línea transgénica y en la línea infectada con el virus AcMNPV-MBTSP1 (control positivo).

Susceptibilidad a infección por AcMNPV

Para evaluar si las líneas transgénicas obtenidas aún resultaban susceptibles a la infección por AcMNPV, estas fueron infectadas con el baculovirus reportero AcMNPV-DsRed y observadas durante 5 días mediante microscopía de fluorescencia. Como es posible observar en la figura 24C, se detectó expresión del reportero DsRed y la aparición de signos característicos de la infección temprana (aumento del tamaño de los núcleos) y tardía (cuerpos de oclusión), lo cual permite aseverar que la línea aún es susceptible a la infección por parte de AcMNPV, y que la expresión de la proteasa SKI-1/S1P no parece tener efecto negativo sobre el ciclo infectivo de estos virus.

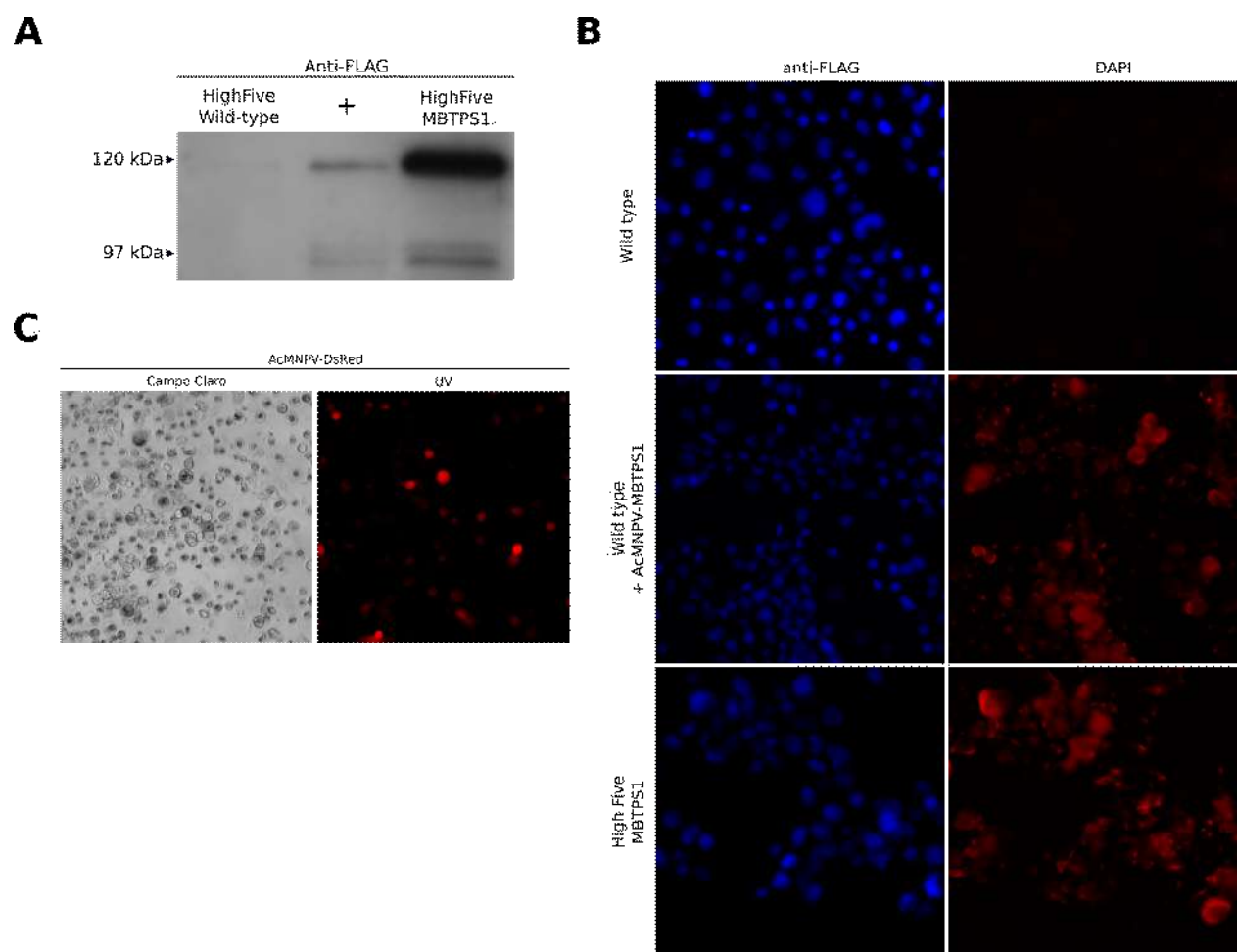


Figura 24. Caracterización de la línea celular transgénica HighFive:mSKI-1/S1P. Expresión de SKI-1/S1P en la línea transgénica. Se confirmó la correcta expresión del transgén mediante **(A)** western blot sobre extracción total de proteínas de la línea celular e Inmunofluorescencia **(B)**. El control positivo en ambos casos fueron células infectadas con AcMNPV-SKI1. **(C)** Susceptibilidad de la línea transgénica a la infección por baculovirus. Para confirmar que la línea generada aún es susceptible a la infección por AcMNPV, se infectó la misma con un baculovirus recombinante que expresa DsRed. Fue posible observar tanto fluorescencia como signos de infección tempranos (aumento del tamaño de los núcleos) y tardíos (cuerpos de oclusión).

Diseño y generación de un sensor de actividad

La actividad serín-proteasa de SKI-1/S1P puede ser evaluada midiendo el procesamiento de sus sustratos. En el caso de la proteína GPC de los arenavirus, esto se observa mediante western blot ya que el complejo unido G1/G2 y G1 y G2 por separado tienen un peso molecular distinto. Sin embargo, es conveniente medir el procesamiento de los sustratos de otras maneras que requieran menos tiempo y no sean tan costosas. Por esta razón, y basándonos en el sistema ideado por Wu et al. (Wu et al., 2013) que propone medir la actividad proteolítica de las caspasas mediante fluorescencia relativa, se diseñó una construcción sintética que posee la proteína indicadora EGFP, seguido del sitio de reconocimiento consenso de SKI-1/S1P y un péptido de *quenching* (QP). La fusión construida no es capaz de emitir fluorescencia, al menos que la secuencia de EGFP sea separada del QP tras un proceso de proteólisis. Esta fusión será utilizada para la generación de un baculovirus recombinante para luego medir la fluorescencia relativa en células HighFive WT y HighFive:mSKI1 infectadas con el mismo.

El ORF sintético no poseía un péptido señal para su direccionamiento a vía secretoria, que es dónde se localiza SKI-1/S1P y dónde tiene lugar su actividad catalítica. Por esta razón, previo a la construcción del baculovirus recombinante, se construyó un vector de transferencia basado en pBacPAK9 denominado pBacSig que incorpora el péptido señal de SKI-1/S1P. El péptido señal fue amplificado por PCR y clonado en pBacPAK9 con las enzimas BamHI y EcoRI. Se obtuvieron 4 clones positivos (figura 25A).

Una vez obtenido el vector pBacSig, se clonó en el mismo el ORF sintético utilizando las enzimas EcoRI y XhoI y se obtuvieron 7 clones positivos (Figura 25B).

Este vector denominado pBacSig-EGFP::QP fue co-transfectado con el bÁcmido bApGOZA para la generación del baculovirus recombinante en células HighFive wild-type, que se denominó AcMNPV-EGFP::QP. Cuando se evaluó la expresión del transgén a 24 y 48 horas post-infección mediante microscopía de fluorescencia, fue posible observar altos niveles de fluorescencia EGFP (Figura 25C) en las células *wild type* infectadas, con lo que determinamos que no era posible continuar con esta estrategia ya que las células *wild type* no deberían verse verdes.

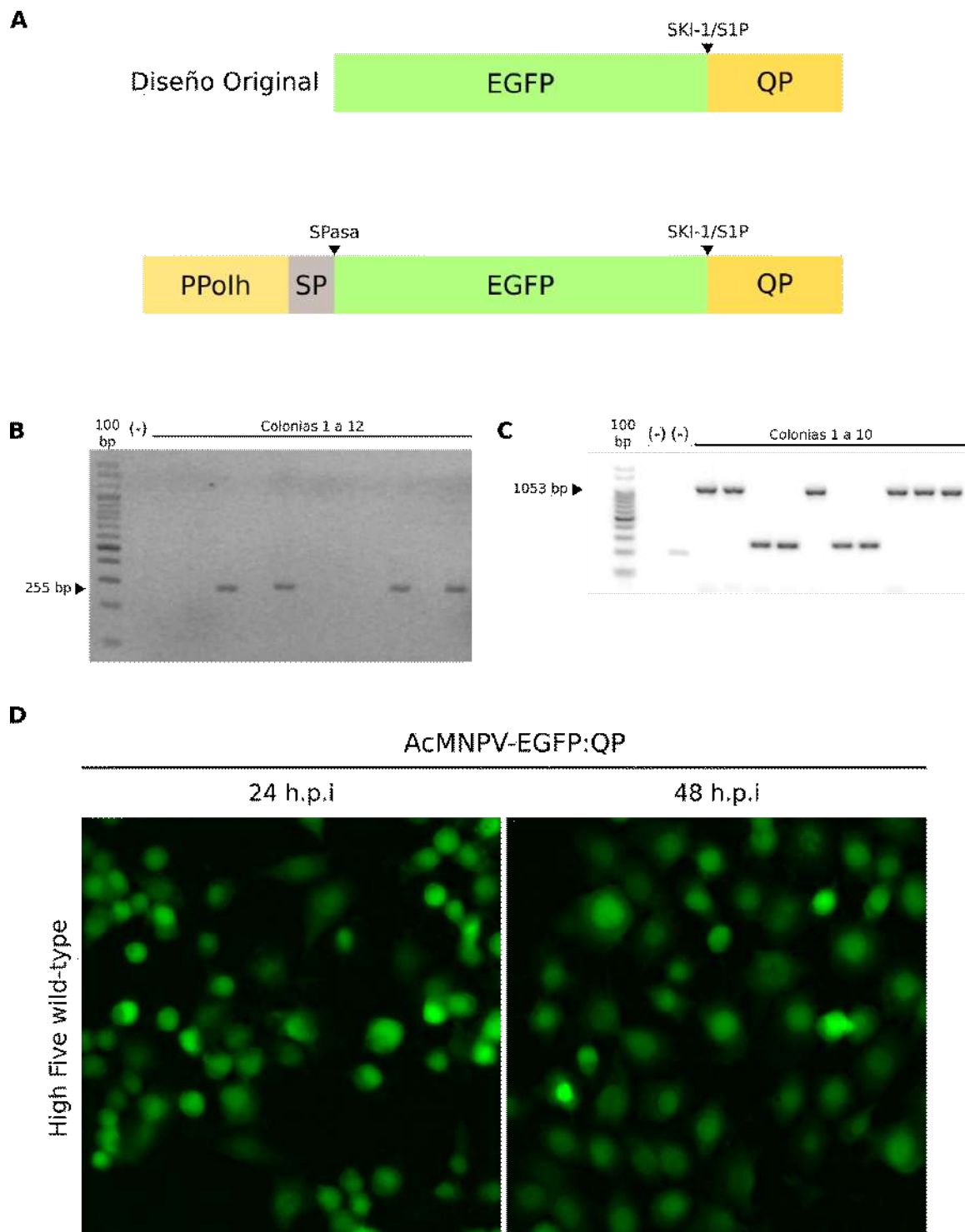


Figura 25. Sensor de actividad genérico de SKI-1/S1P. Se diseñó y generó un baculovirus recombinante con el objetivo de poseer un sensor genérico de la actividad serin-proteasa de SKI-1/S1P. **(A)** Diseño original sintético y diseño modificado para esta tesis. **(B)** Colony PCR para el vector pBacSig. **(C)** Colony PCR para el vector pBacSig-EGFP::QP. **(D)** Expresión del sensor en células High Five wild-type infectadas a las 24 y 48 horas post-infección (h.p.i). No se esperaba observar fluorescencia en la línea celular wild-type. La misma puede deberse a procesamiento pero también a que el péptido de *quenching* incorporado a GFP no sea capaz de impedir la fluorescencia.

Procesamiento de GPC del virus Junín en línea celular *wild type* infectada con AcMNPV:MBTPS1

Se evaluó la capacidad de procesamiento de GPC mediante la co-infección del virus que expresa GPC:V5 de JUNV y el virus que expresa mSKI1/S1P en células *wild type* con una MOI de 1. Para esto, se infectaron las células con una mezcla de ambos virus en proporción 1:1. Se utilizó como control negativo células infectadas sólo con AcMNPV-GPC:V5

El procesamiento fue evaluado mediante western blot sobre lisados celulares a 24 y 48 horas post-infección.

No fue posible observar diferencias en los patrones de procesamiento en ambas condiciones (*data not shown*).

Procesamiento de GPC de JUNV y LASV en la línea HighFive:mSKI1/S1P

Para evaluar la capacidad de procesamiento de la línea transgénica se utilizaron los baculovirus que expresan la proteína GPC:V5 del virus Junín y del virus Lassa construidos en esta tesis.

Se infectaron tanto células HighFive:mSKI1/S1P como *wild type* con los baculovirus mencionados anteriormente con una MOI de 1, y se evaluó el procesamiento de GPC a diferentes tiempos post infección en lisados celulares mediante western blot utilizando un anticuerpo anti-V5.

El patrón de procesamiento de GPC es similar en ambas líneas celulares, donde es posible ver algo de procesamiento, pero aún es posible detectar en gran cantidad G1:G2::V5 en ambas líneas celulares.

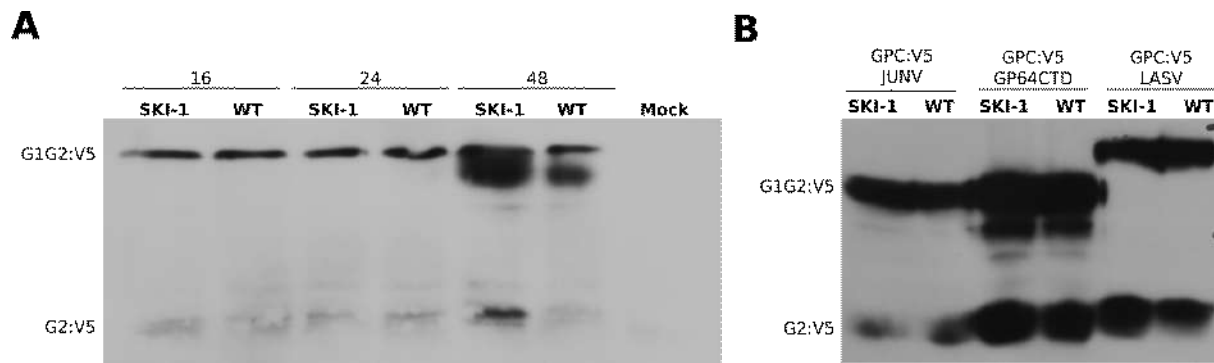


Figura 26. Procesamiento de GPC de JUNV y LASV en la línea transgénica. (A) *Time-course* del procesamiento de GPC de JUNV en la línea transgénica y en la línea wild-type. No es posible observar diferencias cualitativas del procesamiento entre ambas líneas celulares en ninguno de los tiempos ensayados (16, 24 y 48 hs). **(B)** Procesamiento de GPC de JUNV, LASV, y la variante de Junín que incorpora el CTD de GP64 en ambas líneas. No fue posible observar diferencias cualitativas en el procesamiento para ninguna de las proteínas ensayadas entre ambas líneas celulares. En ambos experimentos es posible observar que G1:G2 continúan unidas en gran proporción para todas las variantes.

Conclusiones y discusión

En este capítulo se describe la producción de una línea celular de insecto establemente transformada que expresa de manera constitutiva la serín-proteasa SKI-1/S1P, enzima responsable del correcto procesamiento de las GPC arenavirales, entre otras proteínas.

Inicialmente, se intentó clonar el cDNA de *Homo sapiens* a partir de extracciones de RNA total de células humanas A549. A pesar de que se generaron múltiples juegos de *primers*, y se evaluaron distintas estrategias para su amplificación, no fue posible obtener el cDNA completo.

Por esta razón, se decidió amplificar el ORF de SKI-1/S1P de *Mus musculus*. Se construyó con éxito un vector de expresión de insecto que expresa dicha proteasa en fusión al tag FLAG bajo el control del promotor del gen IE2 de *Orgyia pseudotsugata nucleopolyhedrovirus*. El uso de este vector permitió generar una línea transgénica que expresa dicho gen de manera constitutiva y es estable hasta los 30 pasajes.

Así mismo, se generó de manera exitosa un baculovirus recombinante basado en AcMNPV que expresa el mismo gen bajo el control del promotor de poliedrina.

A pesar de que tanto el virus como la línea celular transgénica expresan correctamente la proteasa, no fue posible en esta tesis observar procesamiento completo de GPC tanto de JUNV como de LASV, siempre obteniéndose altos niveles remanentes de G1:G2.

Sin embargo, es importante destacar, que no se realizaron ensayos cuantitativos de western blot para determinar efectivamente si las estrategias representan realmente una mejora en el procesamiento comparado con la línea HighFive *wild type*.

La presencia de G1:G2 en grandes cantidades podría deberse a poca actividad de la proteasa o estar asociada a los grandes niveles de expresión de la proteína GPC que se obtienen debido al uso del promotor fuerte p_{polh} .

Es de interés a futuro, ensayar si existen diferencias significativas en el procesamiento de GPC entre las líneas *wild type* y transgénica, así como también evaluar el efecto del cambio del promotor de poliedrina que regula la expresión de GPC por otros promotores alternativos

Capítulo III - *Virus-like particles* derivadas del virus Junín

Introducción

Las partículas similares a virus o pseudo-virales (VLP: *virus-like particles*) son complejos proteicos altamente estructurados que se asemejan a los viriones de los cuales derivan. En general, consisten de un “cascarón” que no contiene genoma viral, pero más ampliamente, el término se refiere a cualquier nanopartícula derivada de un virus (Chroboczek et al., 2014; Kushnir et al., 2012). Las VLP pueden ensamblarse a partir de una sola o de múltiples proteínas estructurales del virus dentro de un hospedador apropiado (ensamblado *in vivo*) o en condiciones *in vitro*.

Clasificación estructural de las VLP

La variedad de estructuras que pueden adoptar las VLP las hace funcionalmente muy atractivas. Generalmente se las clasifica en dos grupos diferentes, en base a su complejidad estructural: compuestas por una única proteína (*single-protein VLP*) o por varias (*multi-protein VLP*) (Yan et al., 2015). Así mismo, la presencia o ausencia de membrana lipídica (originaria de la membrana plasmática de las células en las que se producen) compone un segundo nivel de clasificación. Tanto las VLP no envueltas (normalmente llamadas VLP) como las envueltas (eVLP) se pueden clasificar dependiendo de cuántas capas de proteína las componen. Es importante mencionar que no es posible generar eVLP *in vitro*, y que el determinante de si una VLP será envuelta o no dependerá de dos factores: la naturaleza de la proteína o proteínas que se expresan y el virus del cual derivan.

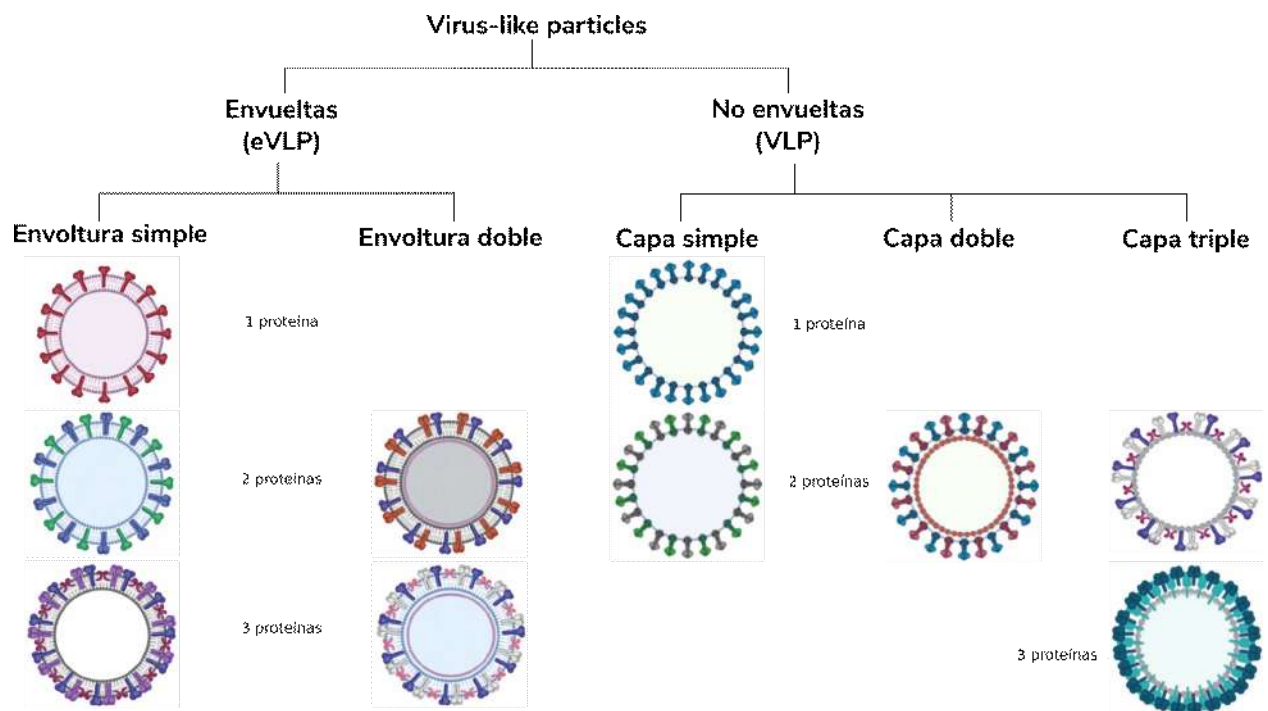


Figura 27. Clasificación de VLP. Representación esquemática de los tipos de VLP que pueden obtenerse y su clasificación en términos de presencia/ausencia de envoltura y número de proteínas presentes. Figura modificada de Nooraei, S et al. 2021.

Ambos tipos de VLP - tanto envueltas como no envueltas - pueden ser modificadas y funcionalizadas, tanto mediante técnicas de ingeniería genética como por métodos químicos (Lee et al., 2009).

Uso de las VLP como inmunógenos

Debido a que carecen de genoma, estas partículas son no-replicativas pero generalmente conservan tanto la capacidad de transducción del virus como su potencial inmunogénico.

Algunas de las características que hacen a las VLP interesantes como inmunógenos: poseen tamaños nanométricos (de entre 20 y 200 nm) y epítopes altamente organizados estructuralmente ideales para la fagocitosis y el reconocimiento por parte de las células dendríticas y las APC (*antigen presenting cells*). Además de llevar los antígenos virales de interés, las VLP pueden ser modificadas para también actuar como adyuvantes.

Estas características las convierten en candidatos ideales para la generación de vacunas, dada su alta inmunogenicidad y seguridad. Existen ya en el mercado vacunas basadas en estas estructuras, como las vacunas para el virus del papiloma humano (HPV: *human papillomavirus*) Cervarix y Gardasil, el virus de la hepatitis B (Sci-B-Vac), influenza (NanoFlu), entre otras (Nooraei et al., 2021; Qian et al., 2020).

VLP de arenavirus

Brotación viral y la proteína de matriz Z

La mayoría de los virus envueltos poseen proteínas, denominadas proteínas de matriz, que cumplen un rol central en el ensamblado y brotación de los viriones. La mayoría de las proteínas de matriz presentan pequeños motivos de aminoácidos pertenecientes a la familia de los SLiM (*short linear motifs*), denominados *late (L)-domains*, que interactúan con alguno de los componentes del complejo ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). Tres de estos motivos han sido identificados: PT/SAP, PPXY y YXXL (Martin-Serrano et al., 2004) y sus pares de interacción pertenecientes al complejo ESCRT son Tsg101, Nedd4-like E3 ubiquitin ligasa y ALIX/AIP1, respectivamente (Martin-Serrano et al., 2003).

La proteína Z de los arenavirus es considerada la proteína de matriz de esta familia (Strecker et al., 2003). Se trata de una proteína pequeña, de aproximadamente 11 kDa, que además de cumplir roles esenciales en el ensamblado y en la brotación de los arenavirus, cumple también roles en la terminación de la replicación y la transcripción (Eichler et al., 2004; May et al., 2010; Shao et al., 2018; J. Wang et al., 2012), y en la inhibición de la respuesta antiviral (Fan et al., 2010; Huang et al., 2020; Stott et al., 2020). Está compuesta por tres regiones principales que contienen diferentes dominios: amino-terminal (o dominio de miristoilación), dominio central (RING), y carboxilo-terminal, donde se encuentran los *L-domains* (**Fig. 28**). El tipo y la cantidad de *L-domain* presentes dependen de la especie, y su rol en la brotación y el ensamblado de esta familia ha sido ampliamente estudiado en distintos tipos celulares.

Si bien los *L-domains* esenciales para la brotación de los arenavirus, no son el único factor requerido, por ejemplo; el agregado de un grupo miristoilo al residuo de glicina (G2) de Z también cumple un rol central en este proceso. Además, el residuo L79 que se ubica en el

dominio RING está ampliamente conservado en la especie, siendo necesario para la producción de partículas infectivas pues es responsable del reclutamiento de las nucleocápsides (mediante interacción directa con N) a los sitios de ensamblado en la membrana (Casabona et al., 2009).

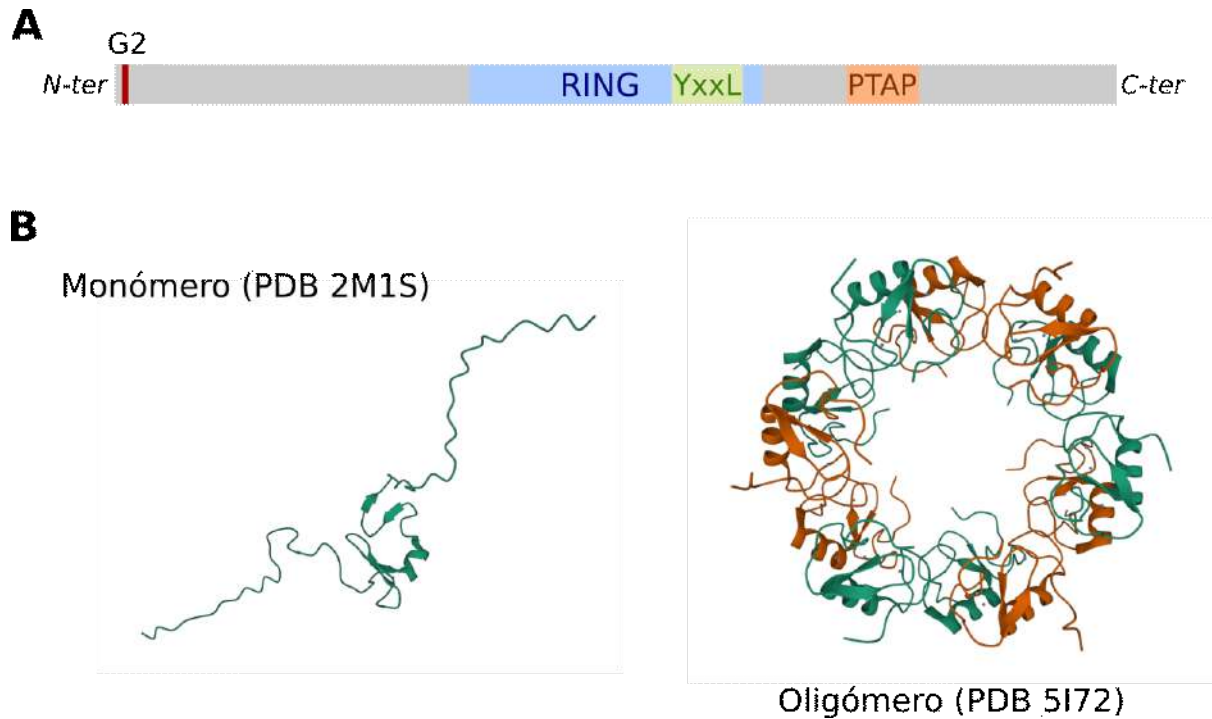


Figura 28. Proteína de matriz Z. (A) Representación esquemática de la organización de dominios de la proteína Z de los arenavirus. En rojo se señala el residuo de glicina 2 que es modificado mediante la adición de un grupo miristoilo y es requerido para la brotación. En celeste el dominio estructurado RING, responsable de la interacción con tanto proteínas virales como proteínas del hospedador. En verde el SLiM YxxL requerido para la interacción con las nucleocápsides. En naranja el dominio tardío (L-domain), cuyo número y secuencia puede ser variable dependiendo de que arenavirus se trate. (B) Estructuras experimentales de Z del virus Lassa, tanto monoméricas como oligoméricas.

Antecedentes de producción en células de mamífero

Existen múltiples reportes de la producción de VLP derivadas de arenavirus en cultivos celulares de mamífero, tanto de VLP simples (compuestas solo por la proteína Z), como de VLP más complejas (conteniendo además GPC y/o N) (Levingston Macleod et al., 2011; Mpingabo et al., 2020). Estas VLP han sido utilizadas como inmunógenos (Branco et al., 2010; Müller et al., 2020) con éxito en modelo animal, como vehículo de otros antígenos (Borio et al., 2012), y principalmente en estudios sobre los factores requeridos para el ensamblado y brotación de los arenavirus (Casabona et al., 2009; Harty, 2018; Shtanko et al., 2010; Urata & Yasuda, 2015).

Objetivo general

A pesar de que la producción de VLP derivadas de arenavirus en cultivo celular de mamífero es conocida y utilizada, su producción en el sistema de expresión baculovirus-células de insecto no ha sido reportada hasta el momento. Su potencial inmunogénico y su seguridad, sumadas al menor costo económico asociado a esta plataforma, la hace atractiva para la búsqueda de nuevos candidatos vacunales para la prevención de enfermedades virales como la fiebre hemorrágica argentina. Por esta razón, el objetivo general de este capítulo es la evaluación de la producción de VLP de JUNV en el sistema BEVS.

Objetivos específicos

- ♦ Clonado de la proteína Z de JUNV en fusión a la proteína fluorescente EGFP.
- ♦ Generación de un mutante en el *L-domain* de motivo PTAP y un mutante del residuo L79.
- ♦ Obtención de baculovirus recombinantes que expresen las distintas variantes de la proteína Z fusionadas a EGFP.
- ♦ Generación de líneas celulares de insecto establemente transformadas que expresen de manera constitutiva las diferentes variantes de la proteína Z de JUNV obtenidas previamente.
- ♦ Evaluación de la producción de VLP de JUNV en el sistema baculovirus-células de insecto.
- ♦ Generación de baculovirus recombinantes que expresen las proteínas GPC y N de la cepa Candid#1 de JUNV.
- ♦ Evaluación y caracterización de la producción de VLP complejas de JUNV en el sistema baculovirus-células de insecto.

Resultados

Clonado de la proteína Z en fusión a la proteína EGFP

Clonado del ORF de Z wild-type de dos cepas distintas de JUNV

Para el clonado del ORF de Z se partió de células de adenocarcinoma pulmonar humano A549 infectadas con JUNV (cepas Candid#1 y P3441). A las 48 h.p.i se extrajo RNA total con Trizol. El RNA obtenido fue tratado con DNasa y, mediante RT-PCR con *primers* específicos para Z (Z Sall F y Z BamHI R, ver **tabla 1**), se obtuvieron los fragmentos correspondientes. Los mismos fueron purificados y clonados en el vector de entrada pGEM-T (Promega). Se obtuvieron múltiples clones para ambas construcciones, denominadas pGEMT:Z:C#1 y pGEMT:Z:P3441 (**figura 29b y c**, respectivamente).

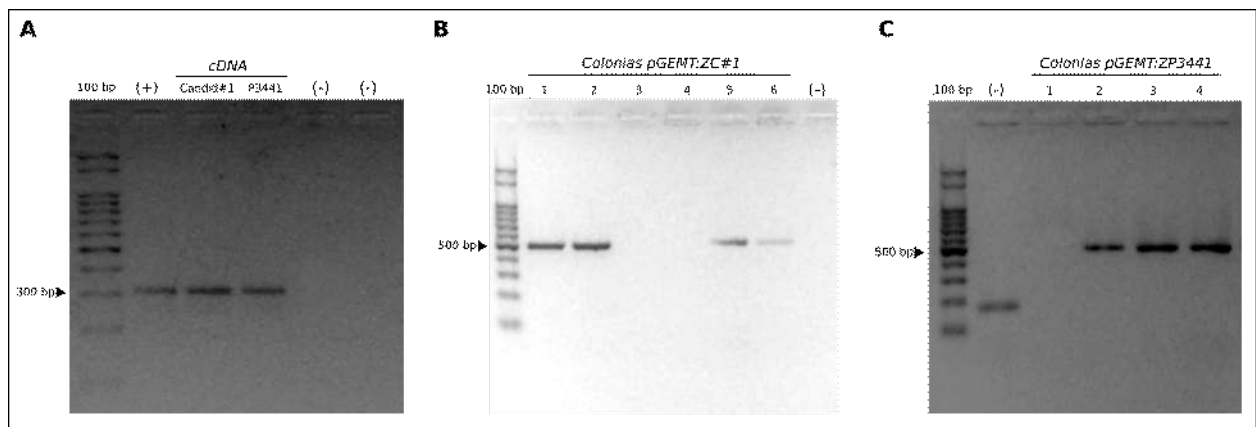


Figura 29. Clonado de la proteína Z de dos cepas del virus Junín a partir de cDNA. (A) Amplificación con *primers* específicos desde cDNA del ORF de Z para las cepas Candid#1 y P3441. **(B y C)** *Colony PCR* sobre las colonias obtenidas para los clonados de ambas Z en el vector de entrada pGEM-T.

Para la construcción de vectores que expresan los polipéptidos Z:EGFP, los plásmidos obtenidos y el vector de expresión de células de mamífero pEGFP:N3 fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI/*Sall* y luego ligados. Se obtuvieron varios clones para ambas construcciones, denominadas pEGFP:Z:C#1 y pEGFP:Z:P3441 (**Figura 30**).

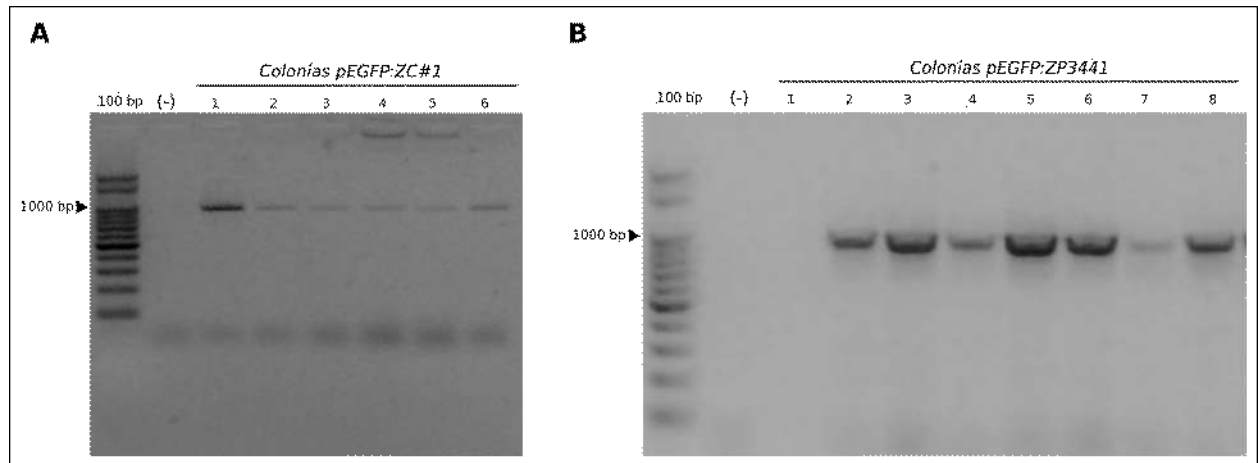


Figura 30. Clonado de la proteína Z de dos cepas de JUNV en fusión a la proteína EGFP. (A y B) Colony PCR sobre las colonias obtenidas para ambos plásmidos.

Mutagénesis sitio-dirigida del late-domain de Z

El *late-domain* de secuencia PTAP presente en el extremo C-terminal de Z es responsable de la brotación de los arnavirus y, por ende, los mutantes en esta secuencia ven significativamente reducida su capacidad de generar eVLP en cultivos celulares.

Con el objetivo de generar un mutante en esta secuencia y utilizarlo como control negativo en los subsiguientes experimentos de la presente tesis, se diseñó un juego de *primers* específico. Dicho juego de *primers* incorpora dos cambios nucleotídicos que se traducen en el cambio de dos codones de los 4 presentes en el *late-domain* de Z. El mismo fue utilizado para amplificar mediante PCR el ORF mutante de Z, usando como molde el plásmido pGEMT:ZC#1 obtenido anteriormente. El producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T EASY, y se obtuvieron 2 clones (**figura 31B**). La incorporación de la mutación fue confirmada por secuenciación (**figura 31C**). Estas variantes de Z fueron clonadas en el vector pEGFP-N3 como se describió previamente, obteniéndose los vectores pEGFP::ZC:Lmut (**figura 31D**).

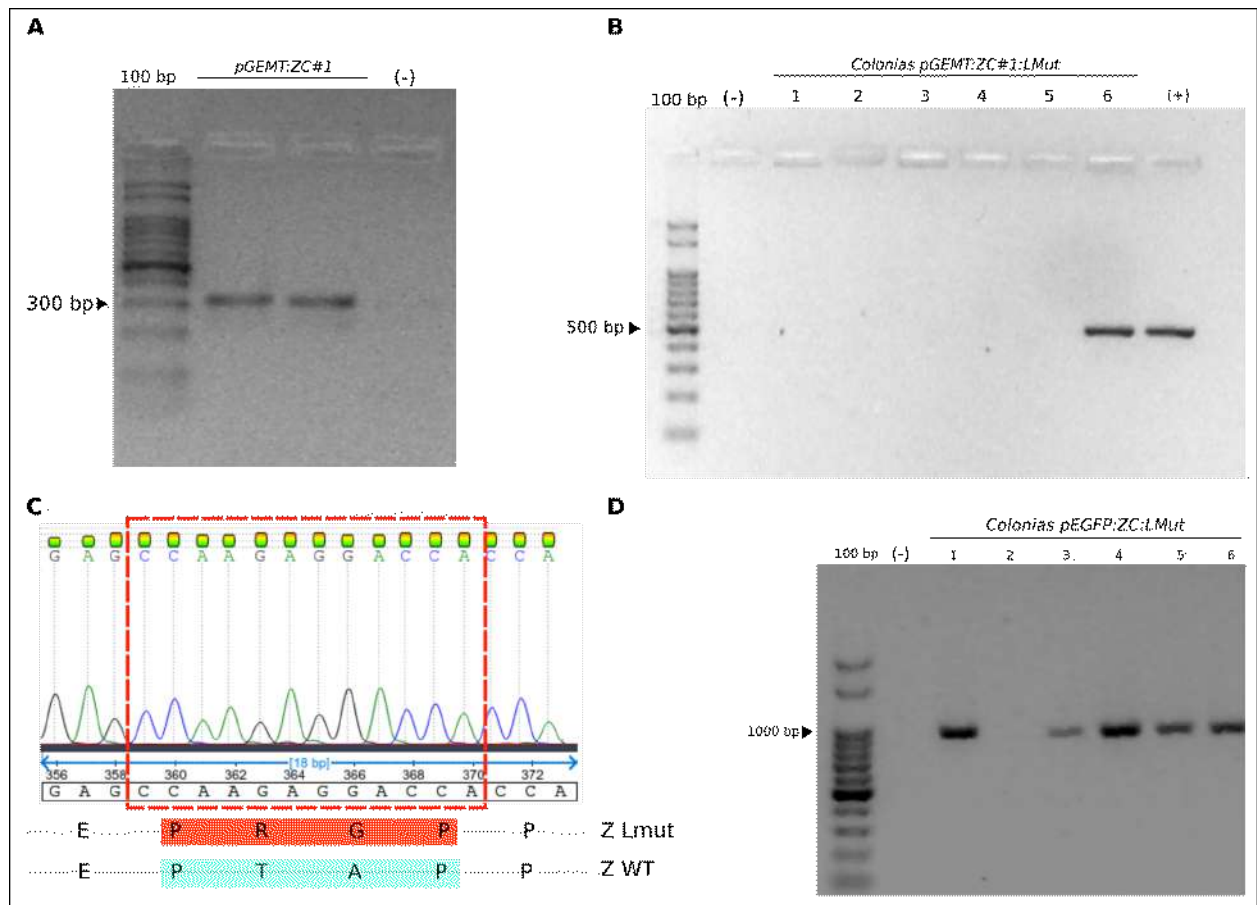


Figura 31. Mutagénesis del dominio L de la proteína Z de JUNV (cepa Candid#1). (A) PCR con *primers* mutagénicos. (B) *Colony* PCR sobre las colonias obtenidas para el plásmido *pGEMT-ZC#1:Lmut*. De 6 colonias obtenidas, solo se obtuvo un clon positivo. (C) Resultado de secuenciación y comparación entre la secuencia de Z *wild type* y la versión mutada. Es posible observar el cambio de dos aminoácidos del *L-domain* a una secuencia que no corresponde a ningún *Late-domain* motif reportado. (D) *Colony* PCR sobre las colonias del plásmido *pEGFP::ZC:Lmut*. Se obtuvieron 5 clones positivos para la fusión de la variante mutante de Z y EGFP.

Mutagénesis del residuo L79 de Z

Como se ha mencionado previamente, durante el ciclo viral de los arenavirus, la proteína Z cumple diversas funciones. Su rol en la brotación viral no solo se debe a su interacción directa con la maquinaria del hospedador, sino también a la interacción con los complejos RNP y a que facilita la incorporación de los mismos a los viriones mediante una interacción directa con la nucleoproteína.

En este trabajo de tesis resultó de particular interés generar una variante de Z que no pueda interactuar con N, con el objetivo de utilizarla como control negativo en los subsiguientes experimentos.

Con tal finalidad, se diseñó un *primer reverse* (denominado Z_L79P_R) que incorporó una mutación en el codón correspondiente a la leucina 79 de Z, y la reemplazó por una prolina. Se amplificó el ORF de Z con ese *primer* y el *primer Z BamHI R* como *primer forward*, utilizando como molde el plásmido pGEMT-Z:P3441 obtenido anteriormente. La incorporación de la mutación fue confirmada por secuenciación.

El inserto fue clonado en el vector pEGFP-N3 como fuese descrito anteriormente, obteniendo el vector pEGFP::Z:L79P.

Expresión transitoria de las fusiones construidas en células de mamífero

Con la finalidad de confirmar la correcta expresión de los plásmidos obtenidos, se transfectaron células Vero con los mismos. 48 horas post-transfección, las células fueron observadas en el microscopio de epifluorescencia.

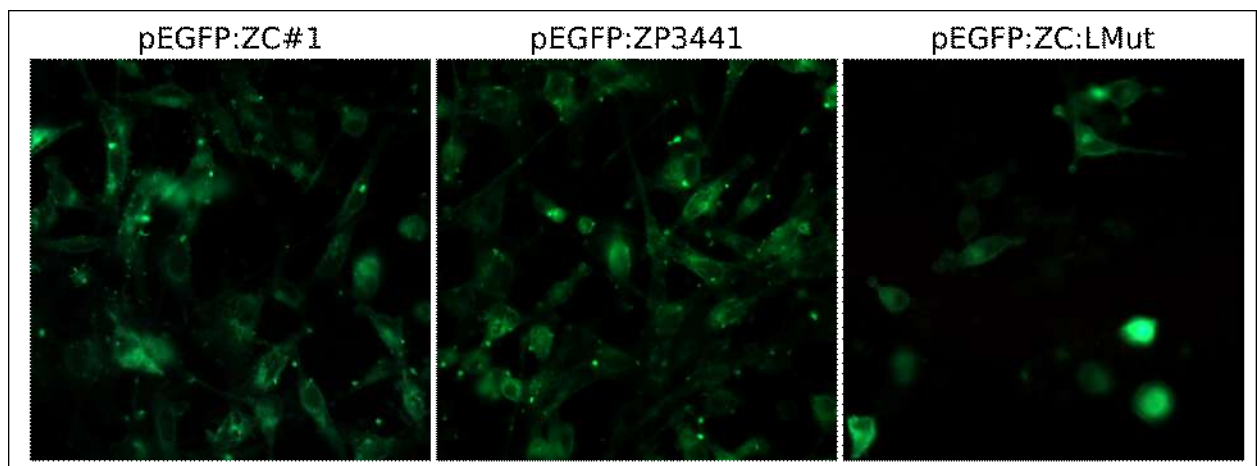


Figura 32. Expresión transiente de las construcciones obtenidas en células de mamífero. Se confirmó la correcta expresión de la fusión mediante microscopía de fluorescencia en células Vero transfectadas con los vectores obtenidos.

Clonado de las distintas variantes de Z en el vector de transferencia pBacPAK9

Todos los plásmidos pEGFP::Zx (dónde x es cada variante) obtenidos previamente fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI/*Not*I con el objetivo de obtener los fragmentos que incluyen la fusión transcripcional Zx::EGFP. Los mismos fueron clonados en el vector de transferencia pBacPAK9 para la generación de baculovirus recombinantes que expresan las distintas variantes de Z.

Clonado de Z wild-type y la variante mutante del L-domain en el vector de expresión de insecto pIP

Con el objetivo de generar líneas celulares de insecto transgénicas que expresen de forma constitutiva la proteína de fusión Z::EGFP se clonaron los marcos de lectura correspondientes a la versión *wild-type* y L-mut de Z en el vector pIP (variante generada en nuestro laboratorio del vector de expresión de insecto pIB-V5 de Invitrogen, donde la resistencia a blasticidina fue reemplazada por la resistencia al antibiótico puromicina). Los plásmidos previamente obtenidos fueron digeridos *Sac*I/*Not*I y clonados en el vector pIP. Se obtuvieron 4 clones positivos para la construcción pIP-ZC::EGFP y uno solo para la construcción pIP-ZLmut::EGFP (**Figura 33**, paneles **A** y **B**, respectivamente).

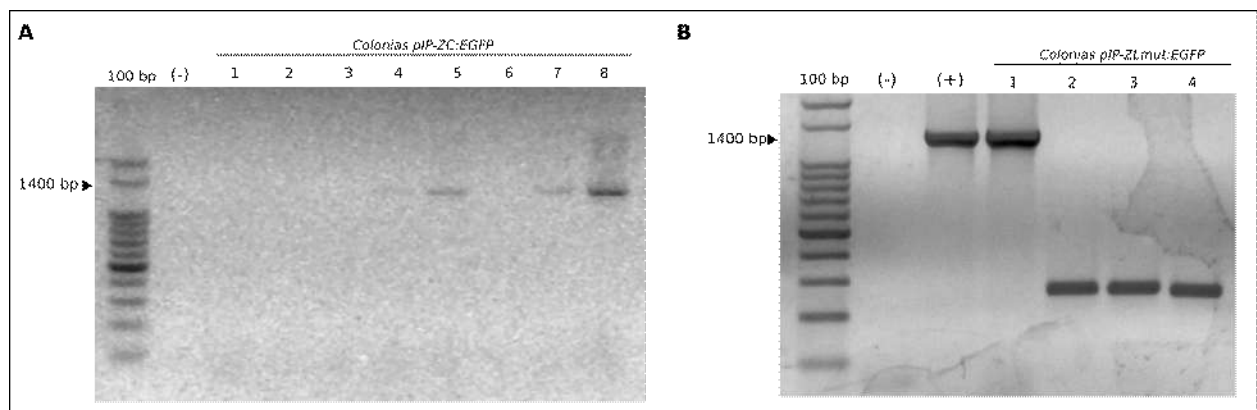


Figura 33. Clonado de las variantes wild-type y Lmut de Z (de la cepa Candid#1) en el vector de expresión de insecto pIP. (A) Colony PCR sobre colonias obtenidas para la construcción wild-type. Se obtuvieron 4 clones positivos. (B) Colony PCR sobre colonias obtenidas para la construcción con la variante mutante. Solo se obtuvo un clon positivo. En ambos casos las secuencias fueron confirmadas por secuenciación.

Generación de baculovirus recombinantes Zx::EGFP

Con el fin de obtener los baculovirus recombinantes basados en AcMNPV que expresan las distintas variantes de Z::EGFP, los plásmidos pBacPAK9-Zx::EGFP fueron co-transfectados con el bAcMNPV en células de insecto High Five al 70% de confluencia. Las células fueron observadas todos los días por microscopía de epifluorescencia.

A los 7 días post-transfección, los sobrenadantes fueron recolectados y utilizados para infectar monocapas de células High Five al 70% de confluencia para la generación de stocks virales.

La expresión de la fusión fue observada inicialmente por microscopía de fluorescencia y luego confirmada por western blot con anticuerpo anti-GFP.

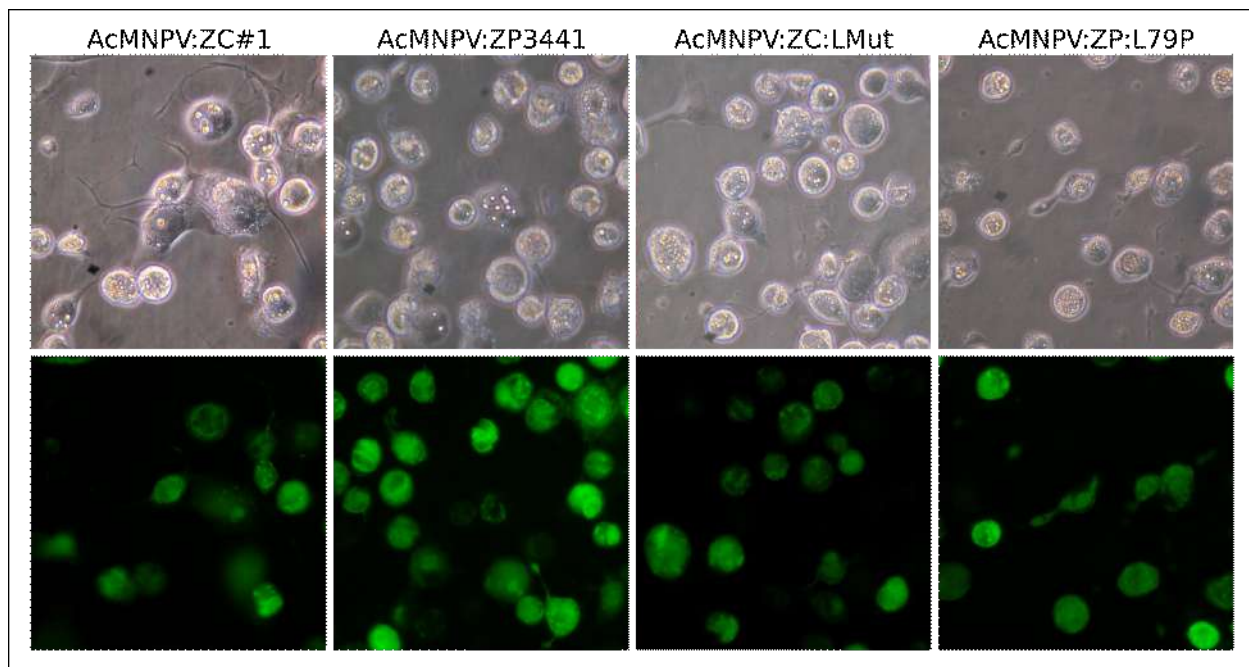


Figura 34. Baculovirus recombinantes que expresan las diferentes variantes de Z en fusión a EGFP. En la figura se observan signos tardíos de infección (OB) en el contraste de fase y la fluorescencia correspondiente a la correcta expresión del transgén para todos los virus generados.

Generación de líneas transgénicas High Five Zx::EGFP

Las células High Five *wild type* fueron modificadas genéticamente para que expresen el polipéptido de fusión Zx::EGFP (dónde x es la variante de Z utilizada) de manera constitutiva, con el fin de evaluar si era posible obtener VLP derivadas de Junín a partir de estas líneas.

Con los vectores de expresión pIP-ZC::EGFP y pIP:ZC:Lmut se generaron dos líneas transgénicas: HighFive ZC::EGFP, que expresó el polipéptido Z::EGFP, y HighFive ZC:Lmut, que expresó la versión de Z mutante en el *L-domain*, respectivamente. Si bien esta línea fue diseñada y generada con la intención de emplearla como control, finalmente se decidió emplear solo la línea High Five *wild type* como control. Para la generación de estas líneas celulares se transfectaron células High Five *wild type* con los plásmidos de expresión correspondientes y luego se incubaron con medio de selección (Medio de Grace 10%SFB con 10ug/ml de antibiótico puromicina) hasta que se obtuvieron varios clones resistentes al antibiótico. La expresión del gen reportero *egfp* se evaluó mediante microscopía de fluorescencia (**Figura 35A**). La incorporación del transgén al genoma de la línea celular se confirmó mediante PCR sobre DNA genómico extraído de la línea luego de 10 pasajes (**Figura**

35B).

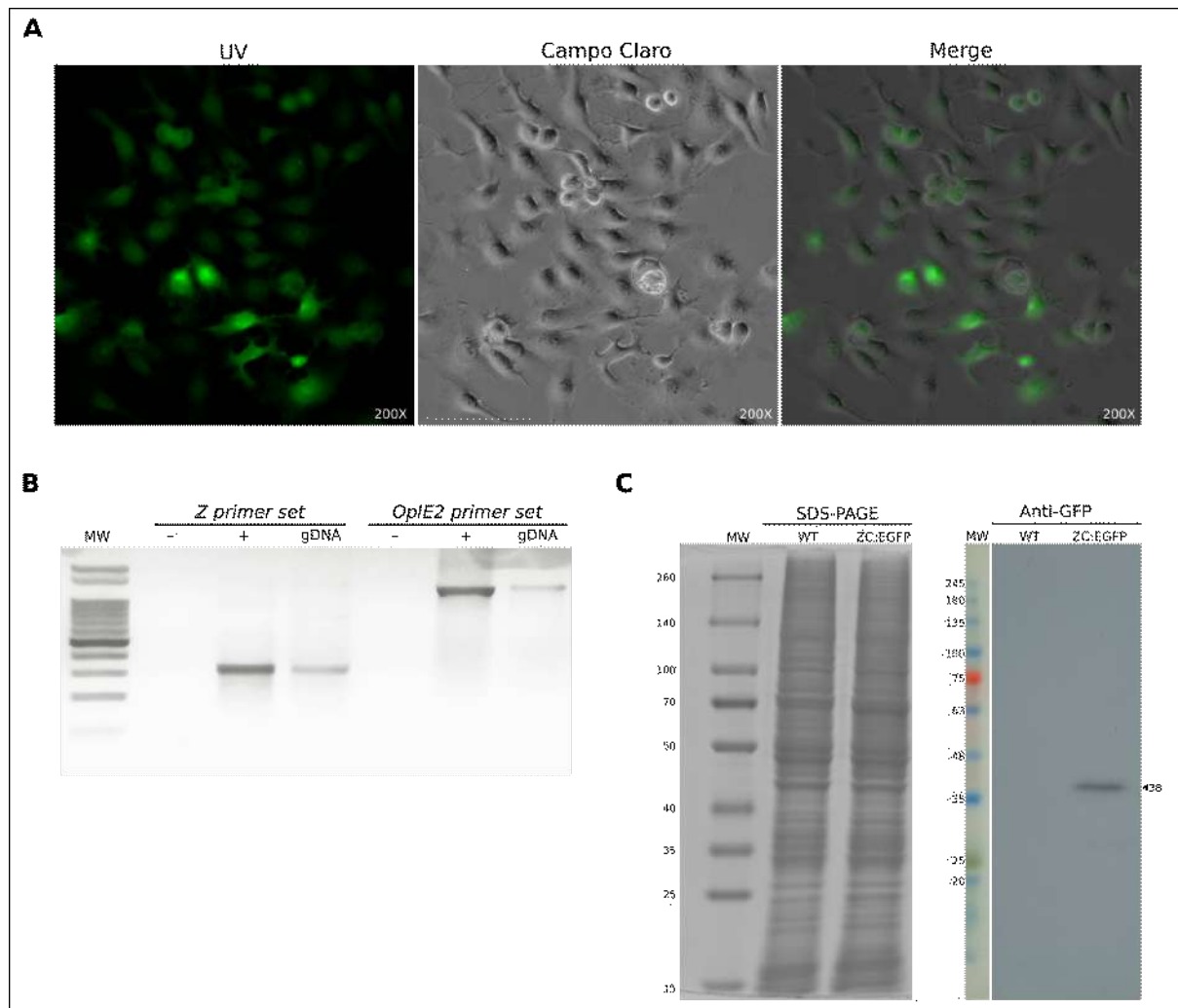


Figura 35. Generación de una línea transgénica High Five Z::EGFP. (A) Microscopía de epifluorescencia. Es posible observar expresión de la fusión Z:EGFP en casi todas las células. **(B)** PCR sobre DNA genómico de la línea celular transgénica. Se confirmó la incorporación del transgén mediante PCR utilizando dos juegos de *primers* específicos. Control positivo: plásmido pIP-Z::EGFP. **(C)** Patrón de expresión y western blot de la línea transgénica. No es posible observar grandes diferencias en los patrones de expresión para la línea transgénica y wild type en el SDS-PAGE. Fue posible detectar la fusión en el western blot con un anticuerpo anti-GFP solo en la línea transgénica.

La presencia de la proteína recombinante fue determinada por western blot. En la figura 35C se observa que, si bien no hay patrones de expresión distintos en el gel de SDS-PAGE, fue posible detectar en el western blot una única banda de aproximadamente 38 kDa en la línea transgénica. Esta banda corresponde al polipéptido ZC::EGFP, y no se encuentra presente en las células *wild type*.

Caracterización de la línea HighFive Z::EGFP

Tiempo de duplicación

El tiempo de duplicación de la línea celular obtenida fue calculado mediante la curva de proliferación de la misma, observándose un tiempo de duplicación (T_d) de 23,7 horas.

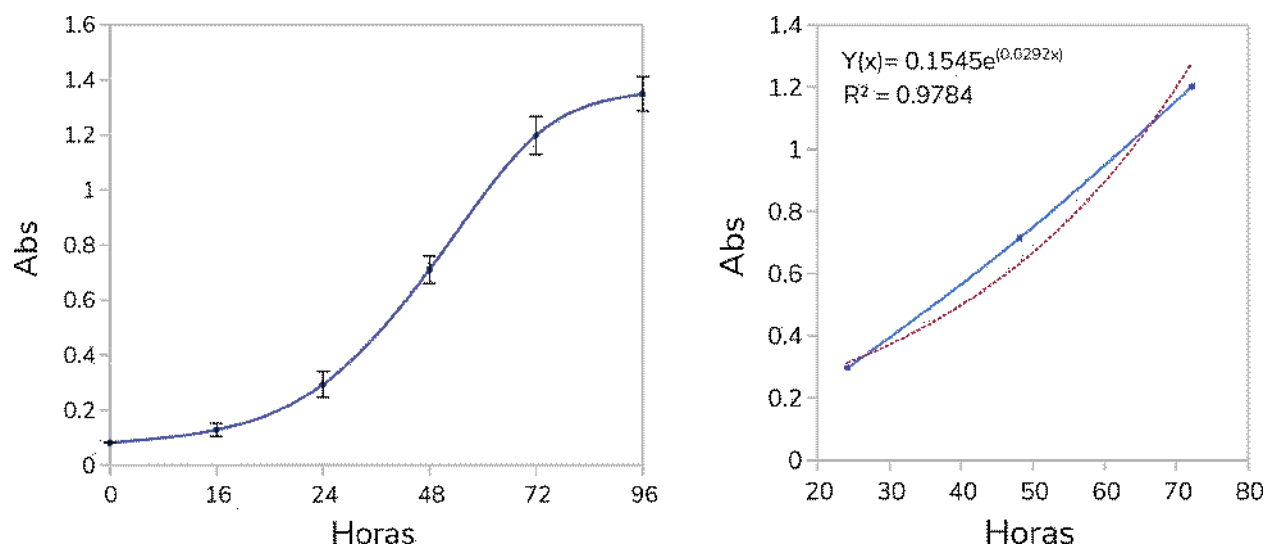


Figura 36. Curva de crecimiento de la línea High Five Z::EGFP. La gráfica de la izquierda muestra la curva de crecimiento para la línea High Five Z::EGFP construida a partir de un ensayo de proliferación. Las barras de error son las desviaciones estándar de cada punto (medida promedio, $n=3$). En la gráfica de la derecha se observan los puntos correspondientes a la fase exponencial de crecimiento (en azul) y el ajuste exponencial (en rojo y línea punteada).

Susceptibilidad a la infección por AcMNPV

Para evaluar si la línea transgénica obtenida aún resultaba susceptible a la infección por AcMNPV, la misma fue infectada con el baculovirus reportero AcMNPV-DsRed y, posteriormente, observada durante 5 días mediante microscopía de fluorescencia. Se detectó expresión del reportero DsRed y la aparición de signos característicos de la infección temprana (aumento del tamaño de los núcleos) y tardía (cuerpos de inclusión).

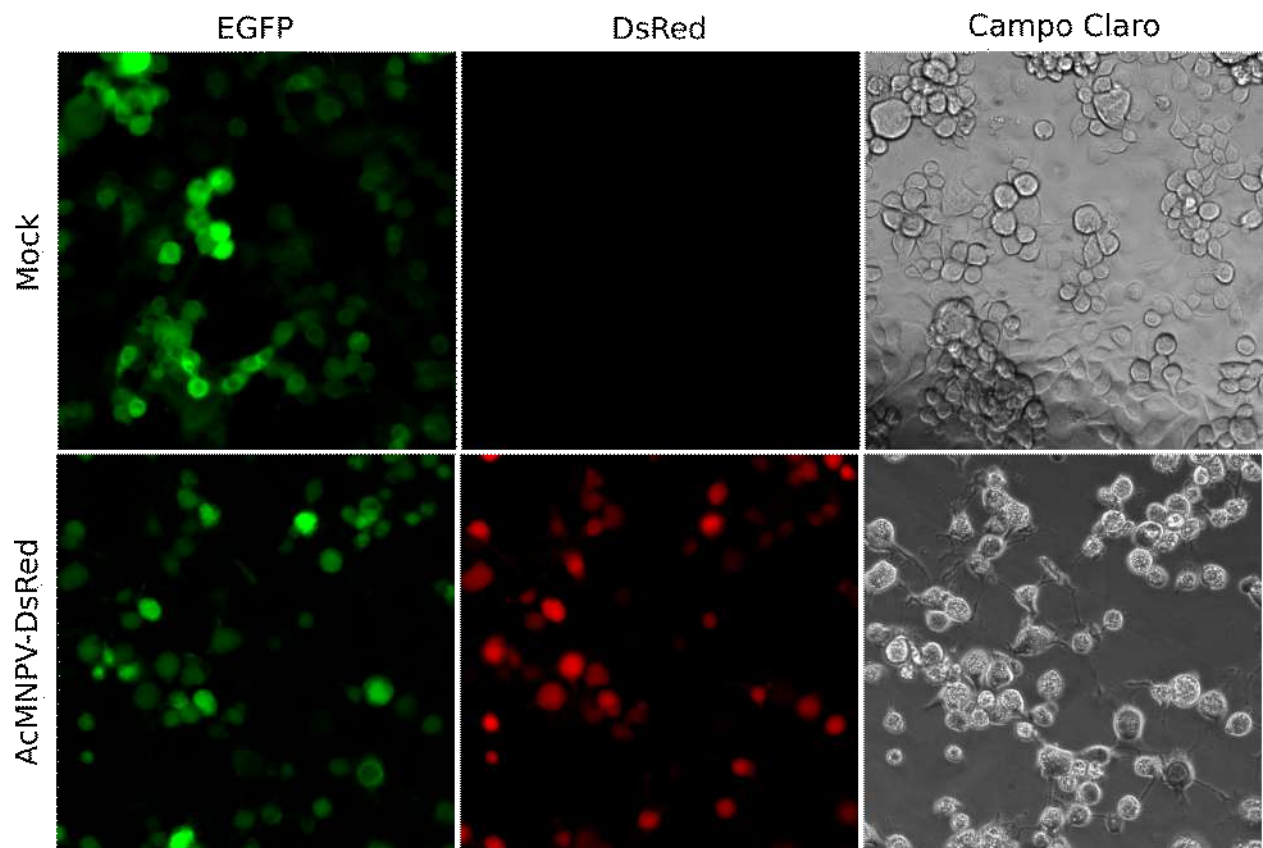


Figura 37. Susceptibilidad a la infección por AcMNPV de la línea transgénica High Five Z::EGFP. Para confirmar que la línea generada aún es susceptible a la infección por AcMNPV, se infectó la misma con un baculovirus recombinante que expresa DsRed. Fue posible observar tanto fluorescencia como signos de infección tempranos (aumento del tamaño de los núcleos) y tardíos (cuerpos de oclusión).

Estabilidad de la línea

Con la finalidad de determinar el número de pasajes en los cuales la línea celular mantiene la expresión del transgén, los cultivos fueron repicados, monitoreando la expresión de EGFP en el tiempo.

A los 40 pasajes, solo un 50% de las células conservó la expresión de EGFP, por lo cual se determinó este número como el límite consecutivo de pasajes posibles de realizar.

Evaluación de la producción de VLP de JUNV en el sistema BEVS

Para evaluar si la expresión de Z en el sistema de expresión baculovirus-células de insecto genera VLP, se probaron dos estrategias diferentes. La primera involucró la infección de

células High Five *wild-type* con los baculovirus recombinantes que expresan la fusión Z::EGFP *wild-type* de ambas cepas. El sobrenadante de las células infectadas fue colectado y sometido a ultracentrifugación diferencial para intentar purificar VLP, y evaluado mediante western blot. No se logró detectar señal correspondiente para EGFP en ninguna de las fracciones de sobrenadante, con lo cual concluimos que los baculovirus recombinantes no incorporaron de manera estocástica a Z y que, si hay brotación de Z::EGFP, los niveles alcanzados son menores a la capacidad de detección mediante western blot.

La otra estrategia analizada consistió en evaluar si la línea transgénica es capaz de producir de manera continua VLP de JUNV. Para esto, se colectó el sobrenadante de cultivo de estas células durante una semana y se procesó el mismo por ultracentrifugación diferencial, evaluándose luego la presencia de EGFP en las fracciones por western blot, observándose señal en la fracción del *pellet*. Los *pellets* obtenidos fueron luego utilizados para otros ensayos.

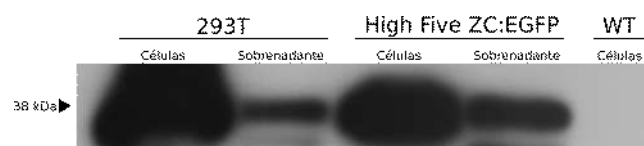


Figura 38. Evaluación de la producción de VLP de Junín en el sistema BEVS. Western blot sobre las fracciones celular y sobrenadante purificado de cultivos de células 293T transfectadas con el plásmido pEGFP::ZC#1, la línea transgénica High Five Z::EGFP. Fue posible detectar la fusión en los sobrenadantes de ambas líneas celulares.

Ensayo de protección a proteinasa K

Con el objetivo de evaluar si la señal detectada en los sobrenadantes de cultivo de la línea transgénica está asociada a vesículas, los *pellets* obtenidos previamente fueron sometidos a un ensayo de protección a proteinasa K. Se utilizó como control positivo de este experimento VLP obtenidas a partir de cultivos de células HEK293 transfectadas con Z::EGFP.

Se observó que la señal de Z::EGFP desapareció en las muestras tratadas con detergente y proteinasa K pero no en las condiciones control de solo proteinasa K y sólo detergente, lo cual es coincidente con la presencia de la fusión en el interior de vesículas lipídicas.

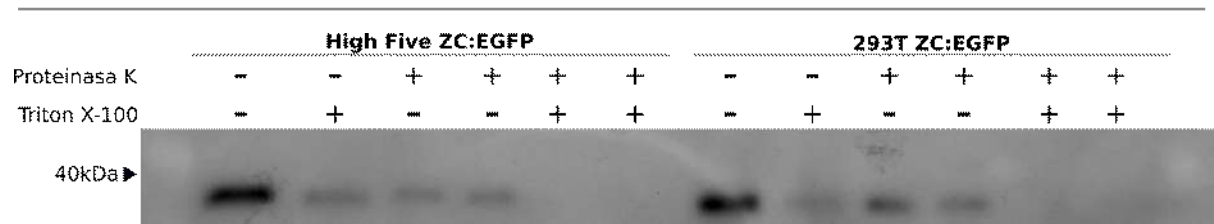


Figura 39. Ensayo de protección a proteínasa K. Para evidenciar de manera indirecta la presencia de vesículas membranosas (VLP) se realizó un ensayo de protección a proteínasa K con VLP obtenidas tanto de células de insecto como de células 293T. En ambos casos se observa que se pierde la señal de GFP cuando se trata las muestras con proteasa y detergente, lo cual indica que la fusión se encuentra en el interior de vesículas que poseen membrana.

Generación de un baculovirus recombinante que expresa N de JUNV

Se procedió a evaluar la producción de VLP de JUNV más complejas - es decir que además de Z incluyan otras proteínas - utilizando dos baculovirus recombinantes que expresan las proteínas N y GPC de JUNV, respectivamente. La obtención del virus que expresa GPC fue descrita anteriormente en esta tesis.

Para la generación del baculovirus recombinante que expresa N de JUNV, se digirió el plásmido pTrex-N (gentilmente cedido por la Dr. Cristina Borio, UNQ) con las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI*, y el fragmento generado fue purificado y ligado en el vector pBacPAK9.

El virus fue obtenido tras co-transfección del vector de transferencia con el bácido bApGOZA. La primera generación viral fue utilizada para infectar células High Five para la obtención de los stocks virales. La incorporación del transgén al genoma baculoviral fue comprobada por PCR, mientras que la expresión fue confirmada por western blot con un anticuerpo anti-N.

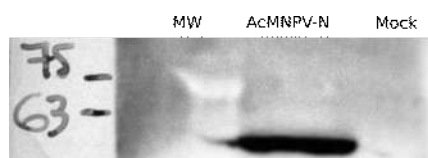


Figura 40. Expresión de N mediada por el baculovirus recombinante AcMNPV-N. Se confirmó la correcta expresión de la proteína heteróloga utilizando un anticuerpo anti-N sobre extracciones de proteína total de células infectadas.

Evaluación de la producción de *multi-protein VLP* de JUNV

Finalmente, se procedió a evaluar la producción de eVLP que contienen otras proteínas de JUNV, empleando la línea transgénica generada y los baculovirus recombinantes AcMNPV-GPC::V5 y AcMNPV-N.

La línea fue infectada a un 60% de confluencia, y los sobrenadantes de la infección fueron colectados hasta las 96 h.p.i. Los mismos fueron clarificados por centrifugación a baja velocidad, y luego se intentó separar los baculovirus brotantes de las eVLP mediante ultracentrifugación diferencial en gradiente de sacarosa. No fue posible detectar señal de N en ninguna de las fracciones. GP64 (control de presencia de baculovirus brotantes) fue detectada en las fracciones correspondientes a VLP y viriones brotantes de baculovirus, mientras que señal de Z y V5 solo fue detectada en la fracción de VLP (Figura 41).

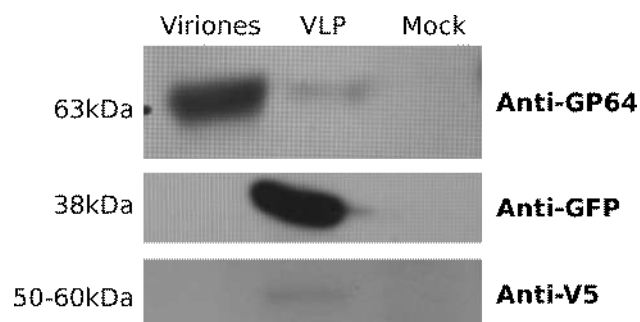


Figura 41. VLP complejas de JUNV en el sistema BEVS. Western blot de sobrenadantes de células HighFive Z::EGFP infectadas con el baculovirus AcMNPV-GPC::V5 purificados por ultracentrifugación diferencial. La fracción correspondiente a las VLP es positiva para Z::EGFP, GP64, y GPC::V5, estas dos últimas en baja proporción. En la fracción correspondiente a los viriones brotantes solo fue posible detectar GP64.

Conclusiones y discusión

Las *virus-like particles* (VLP) constituyen generalmente herramientas muy atractivas para el desarrollo de inmunógenos y transporte de fármacos tanto en la salud humana como veterinaria.

En la actualidad solo existe una vacuna disponible para una fiebre hemorrágica producida por arenavirus, Candid#1, que tiene una efectividad del 96% en la prevención de la FHA, pero la tecnología en la que se encuentra basada no permite que sea administrada a mujeres embarazadas ni a individuos inmunocomprometidos, y su costo de producción es elevado.

Por esta razón, en esta tesis se propuso evaluar si era posible producir eVLP de JUNV en el sistema de expresión baculovirus-células de insecto, que representa una alternativa de menor costo y mayor seguridad que los cultivos tradicionales de células de mamífero.

Existían reportes previos a esta tesis de la producción de eVLP de arenavirus haciendo uso de la capacidad de autobrotación de Z en cultivos de células de mamífero. Sin embargo, no había reportes de la producción de eVLP de JUNV producidas en células de insecto.

Para tal fin, se produjeron distintas herramientas que se utilizaron tanto en conjunto como por separado, que involucraron la generación de fusiones traducionales de diferentes versiones de la proteína Z al reportero fluorescente EGFP; tanto el ORF *wild type* de la cepa vacunal como de la cepa patogénica P3441, mutantes en el *late-domain* (SLiM responsable de la interacción con la maquinaria ESCRT y subsecuente brotación) y el residuo de leucina 79 (responsable de la interacción con la proteína N y la incorporación de los RNP a los viriones). La primera estrategia evaluada fue la producción de eVLP de JUNV mediante infección con los baculovirus recombinantes AcMNPV-Z::EGFP (tanto de la cepa vacunal como de la cepa patogénica). No se detectó señal de Z::EGFP en los sobrenadantes purificados de estas células, lo cual puede deberse a dos motivos: por un lado, es posible que Z::EGFP no sea incorporada de manera estocástica a los viriones brotantes de AcMNPV en cantidades suficientes como para resultar detectable por western blot; por otro lado, es posible que la producción de VLP por este método no ocurra, u ocurra en muy baja proporción.

La otra estrategia evaluada consistió en la expresión de la fusión traduccional de manera constitutiva mediante la generación de líneas celulares de insecto establemente transformadas. En este caso fue posible detectar señal de Z::EGFP en los sobrenadantes purificados de la línea celular para la línea con Z::EGFP *wild type* pero no para la que expresa el mutante en el *late-domain*. Además, mediante ensayos de protección a proteínasa K, se logró observar que la fusión se encuentra dentro de vesículas con membranas lipídicas.

El paso siguiente fue evaluar si la infección de esta línea transgénica con virus que expresan las otras proteínas de JUNV permite la producción de VLP con más de una proteína. Para esto se utilizaron los virus AcMNPV-GPC::V5, que expresa el precursor de las glicoproteínas de JUNV en fusión al tag V5 (cuya construcción y caracterización fuese descrita en el capítulo I de la presente tesis), y el virus AcMNPV-N, que expresa la nucleoproteína de la cepa Candid#1. Los sobrenadantes de las células infectadas con AcMNPV-N no mostraron señal de N, por lo que resultaría certero afirmar que si N se incorpora a las VLP en este diseño experimental, lo hace en muy baja proporción. En cambio, fue posible detectar el tag V5 en los sobrenadantes de células infectadas con AcMNPV-GPC::V5. Sin embargo, los *pellets* obtenidos también fueron positivos para GP64, la glicoproteína de los baculovirus, sugiriendo que estos *pellets* contienen, además de las VLP, viriones brotantes. Los intentos de separación de VLP y viriones brotantes mediante ultracentrifugación diferencial no resultaron exitosos, pero se realizaron en gradientes estándar sin conocer la densidad de las VLP de JUNV y dificultando el proceso.

Es importante destacar que resta caracterizar las VLP producidas por la línea transgénica en términos de evaluar el tamaño y distribución de las partículas mediante técnicas como citometría de flujo, *dynamic light scattering* (DLS) y microscopía electrónica de transmisión.

Resultaría interesante evaluar si el reemplazo de EGFP por GPC::V5/N permite un mayor nivel de incorporación de GPC y/o N a las VLP, así como también la construcción de una línea transgénica que quizás exprese ambas proteínas de manera independiente (no fusionadas entre sí).

Así mismo, resta por ser evaluada la capacidad inmunogénica de las VLP obtenidas de esta manera, que presentan señal positiva para GPC y Z. La contaminación de los *pellets* con viriones brotantes no representa en sí misma un problema, pues la capacidad adyuvante intrínseca de los baculovirus podría reemplazar en la formulación a los adyuvantes químicos.

Resumen y perspectivas

En la presente tesis se exploraron distintas alternativas para la producción de inmunógenos del virus Junín (JUNV) en el sistema de expresión baculovirus-células de insectos.

La FHA, una de las fiebres hemorrágicas producidas por arenavirus y una enfermedad endemo-epidémica de nuestro país, es la única que cuenta con una vacuna eficaz para su prevención. La vacuna disponible en Argentina es producida de manera local en el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio Maiztegui” (INEVH), y se basa en una tecnología, que, si bien es extremadamente efectiva y aún hoy continúa siendo ampliamente utilizada, no representa la estrategia más segura ni la más económica. En este trabajo se utilizó como modelo principalmente a JUNV y los desarrollos aquí realizados podrán extenderse a otros arenavirus.

Es conocido que, durante la infección natural y en el caso de la FHA, la protección otorgada por la vacuna a virus atenuado Candid#1, está dada por anticuerpos neutralizantes que reconocen epítopes conformacionales de la espícula viral. Por esta razón, se seleccionó a GPC de JUNV como la principal proteína a incorporar en los candidatos recombinantes generados en la presente tesis.

La primera estrategia (capítulo I) se basó en el *surface-display* de esta proteína; se diseñaron y generaron dos baculovirus recombinantes que expresan GPC de JUNV, el primero incorpora la glicoproteína *wild-type* (salvo por el agregado de un pequeño *tag* V5 en su extremo C-terminal), y el segundo el agregado del dominio CTD de la glicoproteína GP64 del baculovirus AcMNPV. Esta incorporación tiene como objetivo mejorar la interacción de la proteína recombinante con las nucleocápsides de los baculovirus, y aumentar su incorporación a la envoltura de los viriones brotantes. Asimismo, se diseñó y generó un baculovirus recombinante que expresa GPC de LASV cepa Josiah en su versión *wild-type* con el mismo fin. Si bien en Argentina no es posible realizar ensayos con LASV, si los resultados fueran prometedores, otros colaboradores podrían llevar a cabo las evaluaciones inmunológicas utilizando el virus generado en esta tesis.

En todos los casos se verificó que los baculovirus recombinantes fueron generados correctamente y que poseen la capacidad de expresar exitosamente las proteínas GPC.

En cuanto a la localización superficial del antígeno, lo primero que se exploró fue la presencia de la proteína en la membrana plasmática de las células de insecto. La misma fue confirmada

mediante estudios de co-localización entre la proteína heteróloga y WGA marcado con un fluoróforo en células no permeabilizadas.

Posteriormente, se purificaron parcialmente viriones brotantes de los baculovirus recombinantes generados en la tesis, mediante ultracentrifugación en colchón de sacarosa, y los *pellets* obtenidos fueron utilizados como muestras para western blot. Para ninguno de los virus generados fue posible detectar señal para la proteína heteróloga en los *pellets*, pero los mismos fueron positivos para GP64, la glicoproteína de los baculovirus. Este resultado nos permite inferir que, si bien GPC se localiza en la membrana celular, no es incorporada a los viriones brotantes en su versión *wild-type*, y que el agregado del CTD de GP64 tampoco parece ser suficiente para este fin.

Una alternativa a este diseño, sería la exposición superficial de los péptidos conteniendo los epítopes inmunogénicos que han sido caracterizados, mediante la fusión de estos péptidos a GP64, o la fusión de solo G1 al péptido señal y dominio transmembrana de GP64.

Como otras proteínas de fusión virales, GPC se sintetiza como un precursor que se procesa por el clivaje proteolítico en dos sitios catalizado por enzimas de la célula hospedadora. El primer procesamiento, es la proteólisis del péptido señal estable (SSP) por acción de una SPasa. SSP - a diferencia de otros péptidos señal - es incorporado a la espícula madura. Posteriormente, ocurre otro procesamiento en un sitio altamente conservado en la familia *Arenaviridae*, que separa a G1 (región que interactúa con el receptor) y a G2 (que forma el tallo de la espícula). Este procesamiento es producto de la acción de una serín-proteasa conocida vulgarmente como SKI-1/S1P.

Estudios de otros autores y experimentos previos a esta tesis en nuestro laboratorio, muestran que GPC no es totalmente procesada por el ortólogo de insecto en este sitio, y de manera consecuente, G1 y G2 continúan unidas en una proporción importante. Como los anticuerpos neutralizantes responsables de la protección otorgada por *Candid#1* son dirigidos a epítopes conformacionales, resulta de interés obtener a GPC expresada de manera heteróloga en su conformación nativa de pre-fusión.

Por esta razón, se intentó mejorar el procesamiento de las líneas celulares de insecto mediante la incorporación del gen de la proteasa SKI-1/S1P a su genoma. Con ese objetivo, como se describe en el capítulo II de la presente tesis, se generó un plásmido de expresión

de insecto que expresa la SKI-1/S1P murina, y con el mismo, una línea celular establemente transformada. La misma fue caracterizada; la expresión del transgén confirmada mediante inmunofluorescencia y western blot. Por otra parte, se confirmó su susceptibilidad a la infección por AcMNPV.

En paralelo, se generó un baculovirus recombinante que expresa SKI-1/S1P, como alternativa en el caso de que no fuese posible establecer la línea transgénica.

Una vez obtenida la línea, y confirmada la expresión de la proteína, se evaluó su capacidad de procesar las GPC de JUNV y LASV.

No fue posible observar diferencias cualitativas en el procesamiento de GPC entre la línea *wild type* y la línea transgénica; si bien hay procesamiento y se detecta G2 libre, hay una gran proporción de G1:G2 remanente. Esto podría deberse a que la proteína SKI-1/S1P, si bien se expresa, no es funcional, o al hecho que GPC se produce en grandes cantidades debido a que su expresión está bajo el control del promotor fuerte p_{polh} y no alcanza a ser procesada. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los western blots realizados no son cuantitativos, y no se puede aseverar que no exista una diferencia significativa entre ambas líneas; resta evaluar esto en el futuro.

En último lugar, en el capítulo III de la presente tesis se describe cómo se exploró la posibilidad de producir otro tipo de inmunógeno muy atractivo debido a su seguridad y menor costo de producción.

Las *virus-like particles* (VLP) son complejos nanoestructurados que se asemejan a los viriones de los cuales derivan. Su atractivo como inmunógenos radica principalmente en tres factores; el primero es que, al carecer de genoma, no tienen asociados los riesgos de un patógeno virulento (seguido de su inactivación) o vivo atenuado, tanto en su producción como su administración, respectivamente. El segundo es que su tamaño es ideal para el reconocimiento por las células del sistema inmune, mientras que quizás el más importante y relevante, es que las VLP son altamente versátiles y pueden exponer los antígenos en su conformación nativa de la misma manera que lo haría el virión, pero sin los riesgos asociados a un virus atenuado, y sin la necesidad de la inactivación, como en el caso de las vacunas a virus inactivado.

Otros autores han reportado la producción de VLP de arnavirus utilizando únicamente la proteína Z, o combinándola con otras proteínas como GPC, en células de mamífero. La mayoría de los autores las han utilizado como herramientas de estudio de la biología de los arnavirus, debido a que casi la totalidad de los miembros de esta familia son patógenos humanos que requieren niveles de bioseguridad 3 y 4. La producción de VLP en células de mamífero presenta los mismos costos y reglas GMP que la producción de virus atenuados. Por esta razón, se propuso en esta tesis producirlas en células de insecto, una alternativa que, en nuestro conocimiento, no había sido explorada previamente.

Para esto, se clonó la proteína de matriz Z de dos cepas de JUNV a partir de RNA viral; las mismas también se clonaron en fusión a la proteína EGFP en plásmidos de expresión de mamífero.

Asimismo, se generaron dos mutantes de Z; uno en el dominio L, que es esencial para la brotación, y otro en el residuo de leucina 79, esencial para la interacción con los RNP. Estas variantes de Z se clonaron también en fusión a EGFP. Todas las variantes se expresan correctamente.

Además, se generaron cuatro baculovirus recombinantes que expresan dichas variantes en fusión a EGFP, y dos plásmidos de expresión de insecto con las variantes *wild type* y mutante del dominio L.

Estas herramientas fueron utilizadas para evaluar la producción de VLP de JUNV en células de insecto. La primera alternativa, que consistió en utilizar los virus recombinantes para la expresión de Z, no permitió obtener VLP. La segunda, en la generación de líneas celulares transgénicas que expresan de manera constitutiva la fusión Z::EGFP.

Esta segunda alternativa nos permitió detectar señal de Z::EGFP en los sobrenadantes purificados de los cultivos celulares. Evaluamos de manera indirecta si esta señal corresponde a VLP mediante ensayos de protección a proteinasa K, utilizando como control VLP de JUNV obtenidas de células 293T. En este experimento, los *pellets* fueron tratados con diferentes combinaciones de proteinasa K y Triton X-100. Se observó que sólo en los casos en los que se combina la proteasa con el detergente, se pierde la señal de Z::EGFP, tanto para los *pellets* obtenidos de las células de insecto como para las VLP obtenidas de células de mamífero.

Este resultado prometedor, sugiere que efectivamente es posible producir VLP de Z en las células de insecto. Sin embargo, resta realizar experimentos de microscopía electrónica de transmisión, para confirmar efectivamente la presencia de VLP.

Siguiendo el resultado anterior, se evaluó si era posible complejizar la estructura de las VLP agregando N y GPC de JUNV a las mismas. Para esto se construyó un baculovirus recombinante que expresa N de la cepa Candid#1, y se utilizó el virus construido en el capítulo I AcMNPV-GPC:V5. Para el caso de N, no fue posible detectar la proteína en ninguna de las fracciones; ni en la correspondiente a VLP ni en la que contiene los viriones brotantes. Por el contrario fue posible detectar GPC en la fracción correspondiente a VLP en muy baja proporción, indicando que la misma sería incorporada a las VLP. Con este diseño experimental, los *pellets* de VLP obtenidos se encuentran contaminados con viriones brotantes de baculovirus. Esta contaminación con BV no necesariamente supone un problema para la producción de inmunógenos de JUNV, pues ha sido demostrado por otros autores que los baculovirus actúan como adyuvantes.

La proporción de GPC incorporada a las VLP podría mejorarse mediante la generación de líneas transgénicas que expresen ambas proteínas bajo promotores constitutivos o mediante la fusión de GPC a Z, evaluando si GPC es capaz de exponerse de esta manera en la superficie de las VLP en vez de ser encapsulada en las mismas (como parece suceder con EGFP).

La estrategia de generación de líneas transgénicas para la obtención de VLP constituye experimentalmente una alternativa más sencilla que la infección por baculovirus, permitiendo una producción constante de los inmunógenos.

Como perspectivas a futuro, se espera confirmar la presencia de VLP mediante microscopía electrónica de transmisión, la caracterización exhaustiva de las mismas en términos de morfología y la evaluación de su capacidad inmunogénica en modelos animales.

Materiales y métodos

Materiales

Productos químicos y enzimáticos

Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizaron reactivos de grado analítico o de grado biología molecular suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, EE.UU.) y BioPack (Buenos Aires, Argentina). Las enzimas utilizadas fueron provistas por las empresas Promega (Madison, EE.UU.), New England Biolabs (Beverly, EE.UU.), Thermofisher Scientific (Waltham, EE.UU.) y Productos Bio-Lógicos (Quilmes, Argentina). Los componentes de los medios de cultivo de células eucariotas fueron suministrados por Thermofisher Scientific (Waltham, EE.UU.). Los sueros fetales por Bioser (Buenos Aires, Argentina).

Productos descartables de cultivo celular

Las cajas de Petri y frascos y placas de poliestireno fueron provistos por Nunc (Kamstrup, Dinamarca) y Corning (EE.UU.).

Equipamiento

Las fotografías fueron tomadas con un equipo de Electrophoresis Documentation and Analysis system 120 (Kodak Digital Science), con la cámara de un celular Xiaomi Redmi9 o con una cámara CoolSNAP HQ (Photometrics®). La cuantificación de muestras por medidas de absorbancia fue realizada con un *Nanodrop Spectrophotometer ND-1000*.

Soluciones

Todas las soluciones preparadas fueron esterilizadas por tratamiento de calor en autoclave a 121°C a 1 atmósfera de sobrepresión. Las soluciones termolábiles fueron esterilizadas por filtración con filtro de diámetro de poro de 22µm. El agua utilizada en las soluciones fue bidestilada, filtrada por columna de intercambio iónico y esterilizada en autoclave. Para la preparación de medios de cultivo eucariotas, el agua utilizada fue de calidad inyectable.

Soluciones para la extracción de plásmidos

Alcoholes: Etanol 96% y 70%.

Solución I: Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM (pH=8) EDTA 1 mM

Solución II: NaOH 0,2 N; SDS 1%

Solución III: KCH_3CO_2 5M. pH=4.8

Buffer TE: Tris-HCl 10 mM (pH=8) EDTA 1 mM

NaCH_3CO_2 3 M: se pesó 246.1 gramos de NaCH_3CO_2 y se disolvió en agua bidestilada. Se llevó a pH 5,2 con ácido acético y se añadió agua hasta llegar a un volumen final de 1 L.

Soluciones de antibióticos

Los antibióticos fueron disueltos en agua bidestilada estéril o agua de calidad inyectable a concentración final de 100mg/ml, 50mg/ml, 20mg/ml, dependiendo del antibiótico que se trate, y esterilizados por filtración.

Soluciones para electroforesis de ácidos nucleicos

Buffer de corrida TAE (Tris-HCl, ácido acético, EDTA) 50 X: 242 Tris base, 57,1 ml ácido acético glacial y 100 mM EDTA 0,5 M pH=8,0. Completado a 1 L con agua.

TAE 1X: Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM.

Solución Stock Bromuro de etidio: 10 mg/ml BrEt, conservado en oscuridad.

Geles Agarosa: Agarosa 0,3% - 2% en buffer TAE 1X.

Solución de siembra: TAE 1X, Glicerol 30% y colorantes Xilen cianol FF y azul de Bromofenol.

Soluciones para el análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS / western blot

Gel separador: 10%, 12% o 15% dependiendo del experimento. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (29:1) diluyendo en buffer de separación 1X: 0.375 M Tris-HCl pH 8.8; 0.1% SDS. Se agrega además persulfato de amonio y TEMED al 0.1 y 0.01%, respectivamente.

Gel de *stacking*: 5%. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (29:1) diluyendo en buffer 1X: 125 mM Tris-HCl pH 6.8; 0.1% SDS. Se agrega además persulfato de amonio y TEMED al 0.1 y 0.01%, respectivamente.

Buffer de corrida 1X: Tris base 25 mM, glicina pH 8.3 250 mM, SDS 0.1%. Buffer de siembra (Laemmli buffer) 2X: 65.8 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.1% SDS, 26.3% (p/v), glicerol, 0.01% azul de bromofenol.

Coomassie blue coloidal: se prepara agregando 50 g de $(\text{NH}_4)_3\text{SO}_4$ a 375ml de agua bi-distilada, 10 ml de Coomassie blue G250 5%, 15 ml de ácido orto-fosfórico y 100 ml de etanol 96%.

Buffer de transferencia 1X: Tris base 25mM, glicina pH 8.3 250mM, Etanol 15%

Solución de bloqueo: 5% leche descremada en TBS-T 0.01%

Soluciones de revelado ECL: Tris-HCl 1 M pH 8.5, Ácido cumárico 90 mM, Luminol 250mM. Peróxido de hidrógeno 30 volúmenes

Soluciones utilizadas en reacciones con enzimas de restricción

Las distintas reacciones de digestión se llevaron a cabo incubando el DNA a digerir con la enzima correspondiente, teniendo en cuenta la actividad de la enzima y utilizando el buffer de digestión, la cantidad de enzima, tiempo y temperatura de incubación recomendados por el proveedor.

Soluciones utilizadas para ultracentrifugación diferencial

Las soluciones de sacarosa utilizadas fueron en el rango 25-60% p/p, preparadas en agua bidestilada y conservadas a -20°C.

Anticuerpos

Todos los anticuerpos fueron preparados y conservados siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Nombre del anticuerpo, número de catálogo y fabricante
THE V5 Tag Antibody (A01724), Genscript
Goat Anti-Mouse IgG-HRP (A00160), Genscript
Anti-GFP (3H9), Chromotek
Anti-Rat IgG -HRP, (HAF005), RD systems
Anti-Rabbit-HRP (656120), Invitrogen
Anti-N JUNV (NR-49274, NR-48834), BEI Resources (NIAD, NIH)
Anti-GP64 (AcV5), AbCam
Anti-Flag (1804), Sigma
Donkey Anti-mouse Alexa 488 (15-545-150), Jackson ImmunoResearch
Cy3-conjugated Donkey anti-rabbit (711-165-152), Jackson ImmunoResearch
Anti-GPC JUNV (NR-43227), BEI Resources (NIAD, NIH)

Cepas bacterianas

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* DH5 α TM y TOP10, que poseen los siguientes genotipos:

DH5 α TM: F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk-,mk+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1 tonA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

TOP10: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 endA1 ara Δ 139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ - rpsL(StrR) nupG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Medios de cultivo

Medio Luria-Bertani: se disuelven 5 g de NaCl, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura en aproximadamente 700 ml de agua destilada. Una vez disueltos los reactivos se ajusta el volumen a 1 litro con agua destilada. Se esteriliza en autoclave.

Para preparar medios sólidos se agrega 15 g de ágar por cada litro de medio líquido.

Medio de Grace Thermo-Fisher / Life Sciences / Invitrogen (Grand Island, USA). Para el mantenimiento de las líneas celulares: suplementado con 10% de suero fetal bovino (BioSer, Buenos Aires, Argentina). Para infecciones y transfecciones: sin suplementar.

Medio MEM: Thermo-Fisher / Life Sciences / Invitrogen (Grand Island, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser, Buenos Aires, Argentina).

Métodos

Técnicas que involucran DNA

Se utilizaron las técnicas de clonado generales detalladas en Green et al., 2012.

Preparación de DNA plasmídico

La purificación de DNA plasmídico se efectuó por el método de lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979). Se crecieron bacterias *E. coli* (DH-5 α o TOP10) en medio LB hasta saturación con el antibiótico correspondiente. Se centrifugó 1,5 ml de estos cultivos a 14000-18000 x g durante 30 segundos en un tubo Eppendorf y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió cinco veces sobre el mismo Eppendorf. Se añadieron 200 μ l de Solución I al sedimento obtenido y se lo resuspendió con vórtex. Luego se agregó 400 μ l de Solución II. Después se invirtió suavemente el tubo 5 a 10 veces o hasta observar la clarificación de la suspensión y se incubó en agua-hielo durante 5 min. Luego se neutralizó el pH con 300 μ l de Solución III (a 4°C) y se incubó durante 2-5 min en agua-hielo. El tubo Eppendorf se centrifugó 5 minutos a 14.000-18.000 x g a 4°C y se extrajo el sobrenadante (DNA plasmídico) evitando tomar el precipitado de DNA cromosómico, restos celulares y proteínas acomplejadas con el SDS. Los RNA celulares de esta solución se degradaron por incubación con RNasa A (20 μ g/ml) durante 30 min a 37°C. El DNA plasmídico se aisló de las proteínas por dos extracciones sucesivas con fenol y cloroformo/isoamílico (24:1) y se concentró por precipitación etanólica o con isopropanol. La preparación plasmídica se purificó luego con polvo de sílice.

Extracción de b́acmido

Este protocolo fue adaptado de Birnboim & Doly, 1979.

A partir de un cultivo de 15ml de *E. coli DH10B-bApGOZA* crecido ON a 37°C y con Kanamicina, se centrifugó 1,5 ml de este cultivo a 14000g durante 1 minuto en un tubo Eppendorf y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió 2 veces sobre el mismo Eppendorf. El sobrenadante fue removido y se colocaron 300 µl de solución I de miniprep, el *pellet* fue suavemente resuspendido.

Posteriormente se agregaron 300 µl de solución II de miniprep, se mezclaron ambas soluciones suavemente por inversión del tubo y se incubó en hielo por 5 minutos. Luego se agregaron 300 µl de solución 3 III de miniprep gota a gota, mezclando suavemente por inversión las soluciones. Se incubó el tubo en hielo por 10 minutos, y luego se centrifugó a 14000 g por 10 minutos. El sobrenadante fue tomado con pipeta suavemente, teniendo precaución de no arrastrar el precipitado generado, y al mismo se le agregaron 800 µl de isopropanol absoluto. Se incubó nuevamente 10 minutos en hielo y luego se centrifugó a 14000g por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue lavado con isopropanol 70%. Se volvió a centrifugar a 14000g por 5 minutos esta vez y luego se descartó suavemente el sobrenadante. El *pellet* fue secado brevemente a temperatura ambiente y luego se dejó resuspender en 40 µl de agua.

La correcta extracción del b́acmido se confirmó mediante geles de agarosa 0.6%.

Precipitación de ácidos nucleicos

Los DNA virales fueron precipitados mediante la adición de 0,1 volúmenes (vol) de NaCH₃CO₂ 3 M más 2,5 volúmenes de etanol 96%. Alternativamente, se precipitaron los DNA por adición de 0,3 vol de NaCH₃CO₂ 3M más 0,6-0,9 volúmenes de alcohol isopropílico. En cualquiera de los dos protocolos, las soluciones se centrifugaron a 14.000g 4°C durante 30 min. Las sales fueron lavadas con solución de etanol 70%, preparado con agua bidestilada estéril. El sedimento se secó a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en agua bidestilada estéril.

Electroforesis en geles de agarosa

Se pesó agarosa en un frasco de vidrio, se añadió buffer TAE (con Bret 0,5 µg/ml) y se calentó en horno microondas hasta disolución de la agarosa en el buffer. Una vez que la agarosa se enfrió, pero aún se encontraba en estado líquido, se colocó un volumen conveniente sobre un molde acrílico con un peine para generar calles de siembra de muestra. Una vez gelificada la agarosa, el gel se colocó en una cuba de electroforesis y se lo cubrió con buffer TAE. Las muestras de DNA se mezclaron con buffer de muestra en una relación buffer/muestra correspondiente y se depositaron dentro de las calles del gel. Los DNA se resolvieron en geles de agarosa aplicando un voltaje entre 80-120 V en caso que los tamaños de los fragmentos fueran pequeños o de 50-70 V para fragmentos grandes y porcentajes de geles bajos (0,3-0,6%). Los geles de agarosa se resolvieron en aparatos Bio-Rad. Los DNA se visualizaron por iluminación con transiluminadores de luz ultravioleta de 310 nm (Fotodyne, EE.UU. o Stratagene, EE.UU.) y las imágenes se capturaron con un aparato de documentación de geles Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak Digital Science).

Purificación de fragmentos de DNA por adsorción de DNA a polvo de sílice

Los fragmentos de DNA o de productos de amplificación, se purificaron a partir de geles de agarosa por adsorción a polvo de sílice (Geneclean Bio 101 Inc.). Se extrajo la porción del gel con la banda de interés y se incubó en 3 volúmenes de NaI saturado durante 5 min a 60°C. Posteriormente, se resuspendió en 20 µl de polvo de sílice (previamente resuspendido) y se incubó con agitación durante 5 min. La solución fue centrifugada durante 10 segundos a 14-18.000 X g. El sobrenadante se descartó y el precipitado fue lavado con 200 µl de solución New Wash (NaCl, etanol y agua), este paso se repitió 2 veces. Este precipitado fue secado durante 5 min a temperatura ambiente y luego resuspendido en una cantidad conveniente de agua bidestilada. Se centrifugó 30 seg a 14-18.000 X g y el sobrenadante conteniendo el DNA de interés se transfirió a otro tubo que fue conservado a -20 °C hasta su uso. El protocolo anterior fue adaptado para la purificación de minipreps. En este caso, se agregaron 3 volúmenes de NaI a la solución de miniprep y 20 µl de polvo de sílice, siendo el resto de los pasos iguales.

Métodos de transformación y screening

Preparación de bacterias E. coli electrocompetentes

Se crecieron bacterias *E. coli* DH5 α hasta saturación. Ese cultivo se diluyó 1/20 en medio LB sin NaCl (1.000 ml) y se cultivó a 37 °C con agitación de 180-220 rpm hasta alcanzar 0,5 a 0,6 unidades de densidad óptica a 600 nm. En este punto, el cultivo se enfrió en agua hielo durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 2800 g durante 20 minutos a 4 °C y el sedimento de bacterias se resuspendió en 500 ml de glicerol 10% (v/v) preparado en agua bidestilada estéril. El proceso de resuspensión y centrifugación se repitió dos veces, disminuyendo el volumen de glicerol utilizado en los lavados, reuniendo los sobrenadantes resuspendidos de dos recipientes en uno. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 2 ml de glicerol 10% o medio GYT, se separaron en alícuotas y se congelaron rápidamente a -80 °C hasta el momento de su uso.

Transformación de E. coli por electroporación

La transformación de bacterias electrocompetentes se realizó en un electroporador Gene Pulser™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Se mezclaron 50 de bacterias electrocompetentes con 2 μ l reacción de ligación. Esta mezcla se colocó en una cubeta de electroporación fría de 0,2 cm de distancia entre los electrodos y la mezcla se sometió a un pulso de 2,2 kV. Las variables capacitancia y resistencia se fijaron en 25 μ F y 200 ohm (Ω), respectivamente. Inmediatamente luego del pulso eléctrico, se añadió 1 ml de medio LB sin antibiótico a las bacterias y se las incubó 1 h a 37 °C con agitación. Se sembraron 200 y 300 μ l de cultivo en placas de LB con el agregado de antibiótico de selección (Ampicilina 100 μ g/ml). Las placas se incubaron 18-24 h a 37 °C.

Colony PCR

Con palillos estériles se tomaron las colonias resultantes de las diferentes transformaciones y fueron estriadas en una placa con antibiótico. El remanente de bacterias fue depositado en un tubo eppendorf con agua estéril, reuniendo hasta 10 colonias en cada tubo. Los tubos eppendorf fueron hervidos durante quince minutos, para provocar la lisis celular y liberación del DNA plasmídico. Posteriormente, cada tubo se centrifugó a 14-18.000 X g durante 5 min.

Las reacciones de amplificación se realizaron en las condiciones descritas anteriormente, utilizando 1 µl del sobrenadante como molde en 10 µl de volumen final y empleando los *primers* correspondientes. Los pools que presentaron una señal positiva por PCR fueron analizados en una *colony PCR* individual, con una colonia por tubo, a partir de las estrías del proceso anterior.

Reacciones de amplificación por PCR

Las reacciones de amplificación de DNA fueron llevadas a cabo en cicladores térmicos Mastercycler Gradient (Eppendorf) y PCR Sprint (Thermofisher). Las reacciones en las que se iba a utilizar el producto de amplificación para clonación se utilizó la polimerasa Taq si el producto era menor a 1000 pb. En las reacciones de caracterización se usó la misma polimerasa. La mezcla de reacción fue diseñada de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes. La mezcla de reacción fue diseñada de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes de la enzima, variando únicamente la concentración de MgCl₂. Para el clonado de productos de más de 1000 pb se utilizó la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerases (Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Métodos que involucran cultivo celular

Mantenimiento de células

Las células High FiveTM (BTI-TN-5B1-4) se mantuvieron a 27°C en medio de Grace suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Las células Vero y 293T se mantuvieron a 37°C, en atmósfera con 5% CO₂, en medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Congelamiento

Para el congelamiento de las células de insecto se parte de monocapas de células confluentes de frascos T25. Se extrae el medio de cultivo y se agregan 5 ml de medio de Grace con 10% SFB inactivado por calor y 10% DMSO. Se suspenden las células

mecánicamente y se alicuotan en crioviales. Luego se procede a un congelamiento graduado hasta -80°C , colocando los crioviales en contacto con una suspensión de etanol o glicerol y finalmente en $\text{N}_2(\text{L})$.

Transfecciones

Como reactivo de transfección se utiliza Cellfectin II (Invitrogen™) o PEI (*Polyethylenimine*, linear, MW 25000, Polysciences, Inc.). Se utiliza el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, para la transfección de una placa de 10 cm² se realiza una mezcla de DNA a transfectar con 200 μl de medio sin suero y otra mezcla de 5 μl de Cellfectin y 200 μl de medio sin suero. Las mezclas de DNA y Cellfectin se mezclan por goteo suave y se espera 15 minutos (Cellfectin II) para permitir la formación de complejos DNA-Reactivo de transfección. Se retira el sobrenadante de la placa de cultivo a transfectar y se lava 3 veces con medio sin suero. Finalmente, se gotea suavemente la mezcla de transfección sobre la placa. Luego se agregan 400 μl adicionales de medio sin suero para completar el volumen mínimo de medio requerido por la placa para la supervivencia de las células. Al día siguiente se extrae el medio de transfección y se agregan 2 ml de medio completo. Para la transfección con el reactivo PEI las células se sembraron en una placa de 6 pocillos (2×10^6 células/pocillo) y se transfectaron con 1 μg de DNA plasmídico utilizando 3 μl de 1 mg / ml de polietilenimina (PEI). Brevemente, 1 μg del DNA plasmídico se mezcló con 100 μL de NaCl 150 mM y se mezcló suavemente con PEI. Después de la incubación se añadió a las células temperatura ambiente durante 5 minutos de complejo de DNA-PEI.

Generación de líneas celulares transgénicas

Para el aislamiento de poblaciones celulares clonales se utilizó el método de dilución terminal (InsectSelect™ BSD System, 2008). En este método se producen diluciones seriadas de las células previamente transfectadas en placas multipocillo. Se utiliza una placa de 96 pocillos y las células se diluye de tal manera que en la primera fila de la placa (12 pocillos) se siembran 1000 células por pocillo. En la segunda fila se siembran 500 células por pocillo y se continúa diluyendo 2 veces la concentración de cada fila. Luego las diluciones sembradas en cada pocillo son seleccionadas mediante el agregado de antibiótico (Puromicina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En algunos pocillos de alguna dilución sobrevivirá una única célula que formará una microcolonia luego de varios días. Se considera que cada pocillo en el cual se formó una

única microcolonia proviene de una única célula y por lo tanto representa una población clonal. Cada población clonal es repicada e infectada para observar la expresión del transgén. Para asegurar la homogeneidad genética de los clones, la dilución terminal se vuelve a repetir dos o tres veces más, rescatando en cada repetición células de una única microcolonia.

Ensayo de proliferación celular y determinación del tiempo de duplicación

Se colocaron en una placa de 96-well 1200 células/well (contadas en cámara de Neubauer) en medio de Grace 10% SFB. Se colocaron en la estufa a 27°C y se dejaron crecer. En los distintos tiempos ensayados las células se fijaron con paraformaldehído 4% a temperatura ambiente por 10' y luego se lavaron y permanecieron en PBS hasta el final del experimento. Una vez terminado el ensayo, se removió el medio por aspiración con mucho cuidado de no romper la monocapa celular. Se lavaron los wells nuevamente con PBS. Se retiró el PBS, se agregó cristal violeta 0.2% y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó la placa 3 veces en agua de la canilla mediante inmersión, teniendo cuidado de no levantar la monocapa. Luego, la placa se secó boca abajo sobre servilletas de papel, se agregó SDS 1% para solubilizar el colorante y se dejó agitando en un *shaker* orbital hasta que el color fue uniforme. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm.

Para el cálculo del tiempo de duplicación, se graficó la curva de crecimiento, se seleccionó la región de crecimiento exponencial, y con esos puntos se realizó un ajuste exponencial. La ecuación de la curva es del tipo $Y(x)=Ae^{Bx}$. El tiempo de duplicación se calculó como:

$$\text{Tiempo de duplicación (Td)} \quad Td = \frac{\ln(2)}{B}$$

Métodos que involucran manipulación de baculovirus en cultivo celular

Para el mantenimiento de virus en cultivo celular, se siguieron los protocolos sugeridos en los libros de referencia “Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual” (O'Reilly et al., 1994) y “Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols” (Murhammer, 2007).

Generación de baculovirus recombinantes

Se utilizó el sistema desarrollado por Je et al. (Je et al., 2001) basado en un bÁcmido (genoma viral capaz de replicar en *E. coli*, denominado bAcGOZA) deficiente en el gen esencial ORF1629 y el rescate de DNA viral viable por recombinación con un plÁsmido de transferencia que contiene ese gen junto con otros que se desea expresar. Para ello, se co-transfectaron los DNA del plÁsmido de transferencia y del bÁcmido en células High Five con el reactivo Cellfectin II de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se monitoreó el cultivo celular hasta observarse la formación de poliedros. A continuación, se tomó el sobrenadante y se lo utilizó como inóculo para infectar un frasco T25 de células High Five al 70% de confluencia.

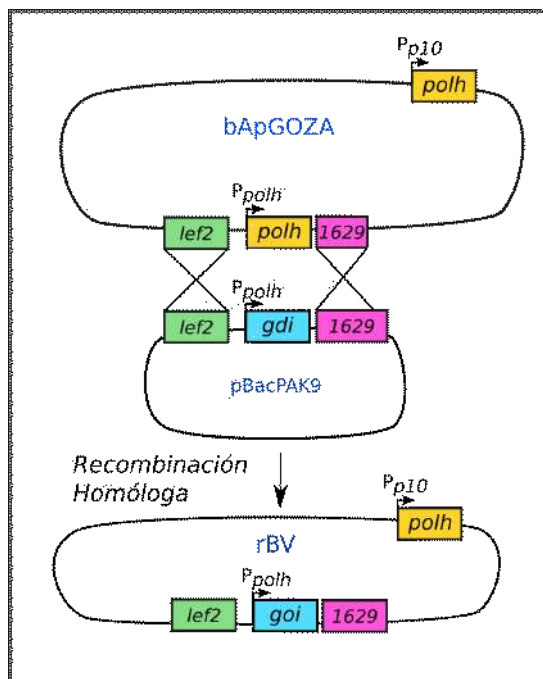


Figura 41. Esquema de la estrategia de doble recombinación homóloga en células de insecto para la generación de baculovirus AcMNPV recombinantes utilizando el bÁcmido bApGOZA y el vector de transferencia pBacPAK9, donde *gdi* representa al gen de interés que se desea incorporar en el baculovirus recombinante.

Purificación parcial y concentración de viriones brotantes de AcMNPV

El siguiente protocolo se encuentra detallado en "Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual" (O'Reilly et al., 1994). Brevemente, se cargaron los tubos de ultracentrífuga con el stock viral, y se colocó un colchón de 2,5 ml *underlay* de sacarosa 25% p/p en 5 mM NaCl y 10 mM EDTA. Las condiciones de centrifugación fueron: 80.000g durante 75 minutos a 4°C. El *pellet* obtenido se resuspendió en PBS pH 6.2 y se conservó a 4°C.

Métodos que involucran VLP

Concentración y purificación de VLP

Para concentrar las VLP derivadas de líneas celulares no infectadas se colectaron los sobrenadantes de los cultivos durante una semana. Se realizó un primer paso de clarificación para eliminar el *debris* celular. El mismo consistió en la centrifugación de las muestras a 1000g durante 10 minutos.

Posteriormente, se procedió a la concentración de la muestra mediante ultracentrifugación en colchón de sacarosa 30% p/p. Para pequeños volúmenes de muestra (menores a 40 ml de cultivo) se utilizó un rotor SW41 Ti en una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima LE-80K. Las condiciones de corrida fueron 30' a 196500g a 4°C. Para volúmenes superiores a los 40 ml de muestra, las corridas se realizaron en las mismas condiciones, pero utilizando un rotor 70 Ti.

Los *pellets* obtenidos fueron resuspendidos en PBS y conservados a 4°C hasta su uso para otros experimentos.

Ensayo de protección a proteinasa K

Para evaluar indirectamente si los *pellets* obtenidos (positivos para la fusión Z::EGFP) correspondían a VLP se realizó un ensayo de protección a proteinasa K. Se armaron 4 mezclas de reacción diferentes: 1) Conteniendo Tritón X-100 1%, proteinasa K (0.1ug/ul) + muestra, 2) Tritón X-100 1% + muestra, 3) proteinasa K (0.1ug/ul) + muestra y 4) muestra + PBS. Las cuatro muestras fueron incubadas a 37°C durante 30'. Pasado el tiempo de reacción se agregó a todas las muestras 1 mM de PMSF. El western blot para evaluar la señal de Z::EGFP fue realizado inmediatamente luego del ensayo.

Lista de *primers* utilizados

Gen/Molde	Primer	Secuencia
GPC Virus Lassa (Cepa Josiah)	GPC_Josiah_SacI Fwd	CGACGCGAGCTCATGGGACAAATAGTGA
	GPC_LASV_Rev	GGTGGCGGCCGCTTAATCTCTTCCATTTTC
SP6 RNA polymerase promoter	SP6 Rev	ATTTAGGTGACACTATAG
T7 promoter	T7 Promoter Fwd	TAATACGACTCACTATAGGG
V5 tag	V5 NotI Fwd	CAGTGGCGCCGCGGTAAGCCTATCCCT
	V5 PacI Rev	GATCTTAATTAACGTAGAATCGAGACC
pBacPAK9	Bac1	AACCATCTCGCAAATAAATA
	Bac2	AACGCACAGAATCTAGCGCTT
SKI-1 (Homo sapiens)	SKI cDNA	CGGCTCACCCACCAGCGCCG
	SKI -21 F	GTGGCCGGATCCTGATCATATTCCG
	SKI R +3673	TATAGCGGCCGCTCACACCGAAGC
	NM_003791_522Fwd	TCGCTTGTGACCATGAAGCTTGT
	NM_003791_2220Rev	CCAGGTAGCCCGACCAAGGC
	NM_003791_1970Fwd	GCCACAGGCAAGTTTGAGCCC
	NM_003791_3741Rev	GCCGTCCGTGAAGGCTCTCT
	NM_003791_3442Fwd	CTCAAGTGAGGCCCTTGCC
S1PRevScreen	CTTGAGGGAACGAAAGAC	
SKI-1 (Mus musculus)	NM_001167910_Fwd_SacI	AAAGAGCTCATGAAGCTCGTCAGCACCTG
	FLAG_XhoI	AACTCGAGCTTATCGTCGTCATCCTTGAATC
Péptido señal SKI-1	Sig_BamHI_Fwd	CAGTGGATCCATGAAGCTCGTCAGCAC
	Sig_EcoRI_Rev	CAGTGAATTCAGGTGCCGTTTCCAC
pIP/pIB-V5-His	pIB CHECK Fwd	CGCAACGATCTGGTAAACAC
	pIB CHECK Rev	GACAATACAAACTAAGATTTAGTCAG
Z (Cepas Candid#1 y P3441)	Z Sall F	GCTAGCGTCGACACCATGGGCAACTGCAACGGGGC
	Z BamHI R	GCGTTCGGATCCTGGTGGTGGTCTGTTGGCTC
	Z_LdomMut_R	GGATCCTGGTGGTGGTGGTCTCTTGCTC
	Z_L79P_R	GATCCTGGTGGTGGTGGTCTGTTGGCTCCACCGGTACTGTGATTGTG GTGGCGGGGG
N (Candid#1)	N_Candid#1_Fwd_XhoI	CGAACTCGAGATGGCACACTCCAAGGAGG
	N_Candid#1_Rev_Sall	GGCTGTCGACAACAGTGCATAGGCTGCCT

Tabla 1. Listado de *primers* utilizados. Se indica nombre del gen/molde que amplifican, nombre del primer y secuencia correspondiente.

Inmunofluorescencia

Para todas las inmunofluorescencias realizadas en esta tesis las células fueron crecidas en *coverslips* circulares.

Para las inmunofluorescencias regulares las células fueron lavadas con PBS, y fijadas con paraformaldehído 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas nuevamente y permeabilizadas con 0.5% saponina en PBS. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados con *blocking buffer* (SFB 3% en PBS) durante media hora. Luego las células fueron lavadas nuevamente con PBS e incubadas con el anticuerpo primario correspondiente durante una hora y media, y luego con secundario durante 40 minutos.

Para la inmunofluorescencia que sigue a la tinción con WGA alexa-555, las células fueron primero incubadas con el WGA previo a la fijación durante 10'. Luego las mismas fueron suavemente lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído 4% por 10' a temperatura ambiente. En este caso no se realizó permeabilización de las células pues se buscaba marca en la membrana celular. Tras la fijación, se bloquearon los sitios inespecíficos con *blocking buffer* durante media hora. El resto del procedimiento fue igual a una inmunofluorescencia regular.

Los *coverslips* fueron montados en portaobjetos utilizando Mowiol y observados en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse o en un microscopio confocal Leica TCS SP5 II.

Bibliografía

- Abe, T., Hemmi, H., Miyamoto, H., Moriishi, K., Tamura, S., Takaku, H., Akira, S., & Matsuura, Y. (2005). Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *Journal of Virology*, 79(5), 2847–2858. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.2847-2858.2005>
- Abe, T., Kaname, Y., Wen, X., Tani, H., Moriishi, K., Uematsu, S., Takeuchi, O., Ishii, K. J., Kawai, T., Akira, S., & Matsuura, Y. (2009). Baculovirus induces type I interferon production through toll-like receptor-dependent and -independent pathways in a cell-type-specific manner. *Journal of Virology*, 83(15), 7629–7640. <https://doi.org/10.1128/JVI.00679-09>
- Abe, T., & Matsuura, Y. (2010). Host innate immune responses induced by baculovirus in mammals. *Current Gene Therapy*, 10(3), 226–231. <https://doi.org/10.2174/156652310791321279>
- Abe, T., Takahashi, H., Hamazaki, H., Miyano-Kurosaki, N., Matsuura, Y., & Takaku, H. (2003). Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(3), 1133–1139. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.3.1133>
- Abraham, J., Corbett, K. D., Farzan, M., Choe, H., & Harrison, S. C. (2010). Structural basis for receptor recognition by New World hemorrhagic fever arenaviruses. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(4), 438–444. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1772>
- Aghebati-Maleki, L., Bakhshinejad, B., Baradaran, B., Motalebnezhad, M., Aghebati-Maleki, A., Nickho, H., Yousefi, M., & Majidi, J. (2016). Phage display as a promising approach for vaccine development. *Journal of Biomedical Science*, 23(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0285-9>
- Albariño, C. G., Bird, B. H., Chakrabarti, A. K., Dodd, K. A., Flint, M., Bergeron, E., White, D. M., & Nichol, S. T. (2011). The major determinant of attenuation in mice of the Candid1 vaccine for Argentine hemorrhagic fever is located in the G2 glycoprotein transmembrane domain. *Journal of Virology*, 85(19), 10404–10408. <https://doi.org/10.1128/JVI.00856-11>
- Albariño, C. G., Ghiringhelli, P. D., Posik, D. M., Lozano, M. E., Ambrosio, A. M., Sanchez, A., & Romanowski, V. (1997). Molecular characterization of attenuated Junin virus strains. *The Journal of General Virology*, 78 (Pt 7), 1605–1610. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-7-1605>
- Aumiller, J. J., Hollister, J. R., & Jarvis, D. L. (2006). Molecular cloning and functional characterization of beta-N-acetylglucosaminidase genes from Sf9 cells. *Protein Expression and Purification*, 47(2), 571–590. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.11.026>
- Bai, H., Wang, Y., Li, X., Mao, H., Li, Y., Han, S., Shi, Z., & Chen, X. (2011). Isolation and characterization of a novel alphanodavirus. *Virology Journal*, 8, 311. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-311>
- Bederka, L. H., Bonhomme, C. J., Ling, E. L., & Buchmeier, M. J. (2014). Arenavirus stable signal peptide is the keystone subunit for glycoprotein complex organization. *MBio*, 5(6), e02063. <https://doi.org/10.1128/mBio.02063-14>
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
- Bonhomme, C. J., Capul, A. A., Lauron, E. J., Bederka, L. H., Knopp, K. A., & Buchmeier, M. J. (2011). Glycosylation modulates arenavirus glycoprotein expression and function. *Virology*,

- 409(2), 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.10.011>
- Borg, J., Nevsten, P., Wallenberg, R., Stenstrom, M., Cardell, S., Falkenberg, C., & Holm, C. (2004). Amino-terminal anchored surface display in insect cells and budded baculovirus using the amino-terminal end of neuraminidase. *Journal of Biotechnology*, 114(1–2), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.05.014>
- Borio, C. S., Bilen, M. F., Argüelles, M. H., Goñi, S. E., Iserte, J. A., Glikmann, G., & Lozano, M. E. (2012). Antigen vehiculization particles based on the Z protein of Junin virus. *BMC Biotechnology*, 12, 80. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-80>
- Boxaca, M. C., de las Mercedes Gómez, M., Lascano, E. F., & de Guerrero, L. B. (1982). [The nursing guinea pig as an indicator of Junin virus neurovirulence]. *Medicina*, 42(6 Pt 1), 698–699.
- Branco, L. M., Grove, J. N., Geske, F. J., Boisen, M. L., Muncy, I. J., Magliato, S. A., Henderson, L. A., Schoepp, R. J., Cashman, K. A., Hensley, L. E., & Garry, R. F. (2010). Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever. *Virology Journal*, 7, 279. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-279>
- Braunagel, S. C., Burks, J. K., Rosas-Acosta, G., Harrison, R. L., Ma, H., & Summers, M. D. (1999). Mutations within the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus FP25K gene decrease the accumulation of ODV-E66 and alter its intranuclear transport. *Journal of Virology*, 73(10), 8559–8570. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.10.8559-8570.1999>
- Burri, D. J., da Palma, J. R., Kunz, S., & Pasquato, A. (2012). Envelope glycoprotein of arenaviruses. *Viruses*, 4(10), 2162–2181. <https://doi.org/10.3390/v4102162>
- Burri, D. J., Pasquato, A., da Palma, J. R., Igonet, S., Oldstone, M. B. A., & Kunz, S. (2013). The role of proteolytic processing and the stable signal peptide in expression of the Old World arenavirus envelope glycoprotein ectodomain. *Virology*, 436(1), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.10.038>
- Cao, W., Henry, M. D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J. H., Ravkov, E. V., Nichol, S. T., Compans, R. W., Campbell, K. P., & Oldstone, M. B. (1998). Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5396), 2079–2081. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2079>
- Casabona, J. C., Levingston Macleod, J. M., Loureiro, M. E., Gomez, G. A., & Lopez, N. (2009). The RING domain and the L79 residue of Z protein are involved in both the rescue of nucleocapsids and the incorporation of glycoproteins into infectious chimeric arenavirus-like particles. *Journal of Virology*, 83(14), 7029–7039. <https://doi.org/10.1128/JVI.00329-09>
- Chapple, S. D. J., & Jones, I. M. (2002). Non-polar distribution of green fluorescent protein on the surface of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus using a heterologous membrane anchor. *Journal of Biotechnology*, 95(3), 269–275. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(02\)00023-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(02)00023-8)
- Charrel, R. N., & de Lamballerie, X. (2003). Arenaviruses other than Lassa virus. *Antiviral Research*, 57(1–2), 89–100. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(02\)00202-4](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(02)00202-4)
- Charrel, R. N., de Lamballerie, X., & Emonet, S. (2008). Phylogeny of the genus Arenavirus. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), 362–368. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.001>
- Charrel, R. N., Lemasson, J. J., Garbutt, M., Khelifa, R., De Micco, P., Feldmann, H., & de Lamballerie, X. (2003). New insights into the evolutionary relationships between arenaviruses provided by comparative analysis of small and large segment sequences. *Virology*,

- 317(2), 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.08.016>
- Chen, B. J., & Lamb, R. A. (2008). Mechanisms for enveloped virus budding: Can some viruses do without an ESCRT? *Virology*, 372(2), 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.11.008>
- Chimeno Zoth, S., Carballeda, J. M., Gómez, E., Gravisaco, M. J., Carrillo, E., & Berinstein, A. (2012). Modulation of innate immunity in chickens induced by in vivo administration of baculovirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 145(1–2), 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.11.008>
- Chisholm, G. E., & Henner, D. J. (1988). Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. *Journal of Virology*, 62(9), 3193–3200. <https://doi.org/10.1128/JVI.62.9.3193-3200.1988>
- Chroboczek, J., Szurgot, I., & Szolajska, E. (2014). Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochimica Polonica*, 61(3), 531–539.
- Crouch, E. A., & Passarelli, A. L. (2002). Genetic requirements for homologous recombination in *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 76(18), 9323–9334. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.18.9323-9334.2002>
- da Palma, J. R., Burri, D. J., Oppliger, J., Salamina, M., Cendron, L., de Laureto, P. P., Seidah, N. G., Kunz, S., & Pasquato, A. (2014). Zymogen activation and subcellular activity of subtilisin kexin isozyme 1/site 1 protease. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(52), 35743–35756. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.588525>
- da Palma, J. R., Cendron, L., Seidah, N. G., Pasquato, A., & Kunz, S. (2016). Mechanism of Folding and Activation of Subtilisin Kexin Isozyme-1 (SKI-1)/Site-1 Protease (S1P). *The Journal of Biological Chemistry*, 291(5), 2055–2066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.677757>
- Damonte, E. B., Coto, C. E., Calello, M. A., & Weissenbacher, M. C. (1978). [Heterologous immunization against Junin virus. Early protection]. *Medicina*, 38(3), 226–232.
- de Bracco, M. M., Rimoldi, M. T., Cossio, P. M., Rabinovich, A., Maiztegui, J. I., Carballal, G., & Arana, R. M. (1978). Argentine hemorrhagic fever. Alterations of the complement system and anti-Junin-virus humoral response. *The New England Journal of Medicine*, 299(5), 216–221. <https://doi.org/10.1056/NEJM197808032990502>
- Drugmand, J.-C., Schneider, Y.-J., & Agathos, S. N. (2012). Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1140–1157. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.014>
- Eastman, S. W., Martin-Serrano, J., Chung, W., Zang, T., & Bieniasz, P. D. (2005). Identification of human VPS37C, a component of endosomal sorting complex required for transport-I important for viral budding. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(1), 628–636. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410384200>
- Eichler, R., Strecker, T., Kolesnikova, L., ter Meulen, J., Weissenhorn, W., Becker, S., Klenk, H. D., Garten, W., & Lenz, O. (2004). Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: Electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP). *Virus Research*, 100(2), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.11.017>
- Enria, D. A., Ambrosio, A. M., Briggiler, A. M., Feuillade, M. R., Crivelli, E., & Study Group on Argentine Hemorrhagic Fever Vaccine. (2010). [Candid#1 vaccine against Argentine hemorrhagic fever produced in Argentina. Immunogenicity and safety]. *Medicina*, 70(3), 215–222.
- Enria, D. A., & Barrera Oro, J. G. (2002). Junin virus vaccines. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 263, 239–261. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56055-2_12

- Enria, D. A., Briggiler, A. M., Fernandez, N. J., Levis, S. C., & Maiztegui, J. I. (1984). Importance of dose of neutralising antibodies in treatment of Argentine haemorrhagic fever with immune plasma. *Lancet (London, England)*, 2(8397), 255–256. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)90299-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)90299-x)
- Enria, D. A., Briggiler, A. M., & Sánchez, Z. (2008). Treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, 78(1), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.10.010>
- Fan, L., Briese, T., & Lipkin, W. I. (2010). Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction. *Journal of Virology*, 84(4), 1785–1791. <https://doi.org/10.1128/JVI.01362-09>
- Ferron, F., Weber, F., de la Torre, J. C., & Reguera, J. (2017). Transcription and replication mechanisms of Bunyaviridae and Arenaviridae L proteins. *Virus Research*, 234, 118–134. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.018>
- Froeschke, M., Basler, M., Groettrup, M., & Dobberstein, B. (2003). Long-lived signal peptide of lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein pGP-C. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 41914–41920. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302343200>
- Fu, Y., Yang, Y., Zhang, H., Farley, G., Wang, J., Quarles, K. A., Weng, Z., & Zamore, P. D. (2018). The genome of the Hi5 germ cell line from *Trichoplusia ni*, an agricultural pest and novel model for small RNA biology. *ELife*, 7, e31628. <https://doi.org/10.7554/eLife.31628>
- García, J. B., Morzunov, S. P., Levis, S., Rowe, J., Calderón, G., Enría, D., Sabattini, M., Buchmeier, M. J., Bowen, M. D., & St Jeor, S. C. (2000). Genetic diversity of the Junin virus in Argentina: Geographic and temporal patterns. *Virology*, 272(1), 127–136. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0345>
- Geisbert, T. W., & Jahrling, P. B. (2004). Exotic emerging viral diseases: Progress and challenges. *Nature Medicine*, 10(12 Suppl), S110–121. <https://doi.org/10.1038/nm1142>
- Geisler, C., & Jarvis, D. L. (2010). Identification of genes encoding N-glycan processing beta-N-acetylglucosaminidases in *Trichoplusia ni* and *Bombyx mori*: Implications for glycoengineering of baculovirus expression systems. *Biotechnology Progress*, 26(1), 34–44. <https://doi.org/10.1002/btpr.298>
- Golden, J. W., Maes, P., Kwilas, S. A., Ballantyne, J., & Hooper, J. W. (2016). Glycoprotein-Specific Antibodies Produced by DNA Vaccination Protect Guinea Pigs from Lethal Argentine and Venezuelan Hemorrhagic Fever. *Journal of Virology*, 90(7), 3515–3529. <https://doi.org/10.1128/JVI.02969-15>
- Goñi, S. E., Iserte, J. A., Stephan, B. I., Borio, C. S., Ghiringhelli, P. D., & Lozano, M. E. (2010). Molecular analysis of the virulence attenuation process in Junín virus vaccine genealogy. *Virus Genes*, 40(3), 320–328. <https://doi.org/10.1007/s11262-010-0450-2>
- Grabherr, R., Ernst, W., Oker-Blom, C., & Jones, I. (2001). Developments in the use of baculoviruses for the surface display of complex eukaryotic proteins. *Trends in Biotechnology*, 19(6), 231–236. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(01\)01610-9](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(01)01610-9)
- Grace, T. D. (1962). Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature*, 195, 788–789. <https://doi.org/10.1038/195788a0>
- Green, M. R., Sambrook, J., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gronowski, A. M., Hilbert, D. M., Sheehan, K. C., Garotta, G., & Schreiber, R. D. (1999). Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *Journal of Virology*, 73(12), 9944–9951. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.12.9944-9951.1999>
- Haase, S., Ferrelli, L., Luis, M., & Romanowski, V. (2013). Genetic Engineering of Baculoviruses. In

- V. Romanowski (Ed.), *Current Issues in Molecular Virology—Viral Genetics and Biotechnological Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/56976>
- Han, Y., Niu, M., An, L., & Li, W. (2010). Involvement of TLR21 in baculovirus-induced interleukin-12 gene expression in avian macrophage-like cell line HD11. *Veterinary Microbiology*, 144(1-2), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.001>
- Harrison, L. H., Halsey, N. A., McKee, K. T., Peters, C. J., Barrera Oro, J. G., Briggiler, A. M., Feuillade, M. R., & Maiztegui, J. I. (1999). Clinical case definitions for Argentine hemorrhagic fever. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 28(5), 1091–1094. <https://doi.org/10.1086/514749>
- Harrison, R. L., Herniou, E. A., Jehle, J. A., Theilmann, D. A., Burand, J. P., Becnel, J. J., Krell, P. J., van Oers, M. M., Mowery, J. D., Bauchan, G. R., & Ictv Report Consortium, null. (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Baculoviridae. *The Journal of General Virology*, 99(9), 1185–1186. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001107>
- Harty, R. N. (2018). Hemorrhagic Fever Virus Budding Studies. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1604, 209–215. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6981-4_15
- Hastie, K. M., Igonet, S., Sullivan, B. M., Legrand, P., Zandonatti, M. A., Robinson, J. E., Garry, R. F., Rey, F. A., Oldstone, M. B., & Saphire, E. O. (2016). Crystal structure of the prefusion surface glycoprotein of the prototypic arenavirus LCMV. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(6), 513–521. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3210>
- Hastie, K. M., & Saphire, E. O. (2018). Lassa virus glycoprotein: Stopping a moving target. *Current Opinion in Virology*, 31, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.05.002>
- Hervas-Stubbs, S., Rueda, P., Lopez, L., & Leclerc, C. (2007). Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(4), 2361–2369. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.4.2361>
- Hoenen, T., Groseth, A., Kolesnikova, L., Theriault, S., Ebihara, H., Hartlieb, B., Bamberg, S., Feldmann, H., Ströher, U., & Becker, S. (2006). Infection of naive target cells with virus-like particles: Implications for the function of ebola virus VP24. *Journal of Virology*, 80(14), 7260–7264. <https://doi.org/10.1128/JVI.00051-06>
- Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., & VandePol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science (New York, N.Y.)*, 215(4540), 1577–1585. <https://doi.org/10.1126/science.7041255>
- Huang, Q., Liu, X., Brisse, M., Ly, H., & Liang, Y. (2020). Effect of Strain Variations on Lassa Virus Z Protein-Mediated Human RIG-I Inhibition. *Viruses*, 12(9), E907. <https://doi.org/10.3390/v12090907>
- Ikonomou, L., Schneider, Y.-J., & Agathos, S. N. (2003). Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1223-9>
- Je, Y.-H., Chang, J.-H., Roh, J.-Y., & Jin, B.-R. (2001). Generation of Baculovirus Expression Vector Using Detective Autographa California Nuclear Polyhedrosis Virus Genome Maintained in Escherichia coli for Occ+ Virus Production. *International Journal of Industrial Entomology*, 2(2), 155–160.
- Kitajima, M., Abe, T., Miyano-Kurosaki, N., Taniguchi, M., Nakayama, T., & Takaku, H. (2008). Induction of natural killer cell-dependent antitumor immunity by the Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(2), 261–268.

- <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300364>
- Kool, M., Ahrens, C. H., Vlak, J. M., & Rohrmann, G. F. (1995). Replication of baculovirus DNA. *The Journal of General Virology*, 76 (Pt 9), 2103–2118. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-9-2103>
- Kool, M., Voeten, J. T., Goldbach, R. W., & Vlak, J. M. (1994). Functional mapping of regions of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis viral genome required for DNA replication. *Virology*, 198(2), 680–689. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1080>
- Kranzusch, P. J., & Whelan, S. P. J. (2011). Arenavirus Z protein controls viral RNA synthesis by locking a polymerase-promoter complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), 19743–19748. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112742108>
- Kukkonen, S. P., Airene, K. J., Marjomäki, V., Laitinen, O. H., Lehtolainen, P., Kankaanpää, P., Mähönen, A. J., Rätty, J. K., Nordlund, H. R., Oker-Blom, C., Kulomaa, M. S., & Ylä-Herttuala, S. (2003). Baculovirus capsid display: A novel tool for transduction imaging. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 8(5), 853–862. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2003.07.009>
- Kunz, S., Borrow, P., & Oldstone, M. B. A. (2002). Receptor structure, binding, and cell entry of arenaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 262, 111–137. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56029-3_5
- Kunz, S., Edelmann, K. H., de la Torre, J.-C., Gorney, R., & Oldstone, M. B. A. (2003). Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions. *Virology*, 314(1), 168–178. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(03\)00421-5](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00421-5)
- Kushnir, N., Streatfield, S. J., & Yusibov, V. (2012). Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 31(1), 58–83. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.083>
- Lee, H., & Krell, P. J. (1994). Reiterated DNA fragments in defective genomes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus are competent for AcMNPV-dependent DNA replication. *Virology*, 202(1), 418–429. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1358>
- Lee, L. A., Niu, Z., & Wang, Q. (2009). Viruses and virus-like protein assemblies—Chemically programmable nanoscale building blocks. *Nano Research*, 2(5), 349–364. <https://doi.org/10.1007/s12274-009-9033-8>
- Leisy, D. J., & Rohrmann, G. F. (1993). Characterization of the replication of plasmids containing hr sequences in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Virology*, 196(2), 722–730. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1529>
- Lenz, O., ter Meulen, J., Klenk, H. D., Seidah, N. G., & Garten, W. (2001). The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12701–12705. <https://doi.org/10.1073/pnas.221447598>
- Levingston Macleod, J. M., D'Antuono, A., Loureiro, M. E., Casabona, J. C., Gomez, G. A., & Lopez, N. (2011). Identification of two functional domains within the arenavirus nucleoprotein. *Journal of Virology*, 85(5), 2012–2023. <https://doi.org/10.1128/JVI.01875-10>
- Long, G., Pan, X., Westenberg, M., & Vlak, J. M. (2006). Functional role of the cytoplasmic tail domain of the major envelope fusion protein of group II baculoviruses. *Journal of Virology*, 80(22), 11226–11234. <https://doi.org/10.1128/JVI.01178-06>
- Lu, A., & Miller, L. K. (1995). Differential requirements for baculovirus late expression factor

- genes in two cell lines. *Journal of Virology*, 69(10), 6265–6272. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.10.6265-6272.1995>
- Lynn, D. E. (2001). Novel techniques to establish new insect cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 37(6), 319–321. <https://doi.org/10.1007/BF02577564>
- Ma, H., Galvin, T. A., Glasner, D. R., Shaheduzzaman, S., & Khan, A. S. (2014). Identification of a novel rhabdovirus in *Spodoptera frugiperda* cell lines. *Journal of Virology*, 88(12), 6576–6585. <https://doi.org/10.1128/JVI.00780-14>
- Mabashi-Asazuma, H., Kuo, C.-W., Khoo, K.-H., & Jarvis, D. L. (2014). A novel baculovirus vector for the production of nonfucosylated recombinant glycoproteins in insect cells. *Glycobiology*, 24(3), 325–340. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt161>
- Maghodia, A. B., Geisler, C., & Jarvis, D. L. (2021). A New Bacmid for Customized Protein Glycosylation Pathway Engineering in the Baculovirus-Insect Cell System. *ACS Chemical Biology*, 16(10), 1941–1950. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00974>
- Maiztegui, J. I., McKee, K. T., Barrera Oro, J. G., Harrison, L. H., Gibbs, P. H., Feuillade, M. R., Enria, D. A., Briggiler, A. M., Levis, S. C., Ambrosio, A. M., Halsey, N. A., & Peters, C. J. (1998). Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever. AHF Study Group. *The Journal of Infectious Diseases*, 177(2), 277–283. <https://doi.org/10.1086/514211>
- Mäkelä, A. R., Ernst, W., Grabherr, R., & Oker-Blom, C. (2010). Baculovirus-based display and gene delivery systems. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(3), pdb.top72. <https://doi.org/10.1101/pdb.top72>
- Mäkelä, A. R., & Oker-Blom, C. (2006). Baculovirus display: A multifunctional technology for gene delivery and eukaryotic library development. *Advances in Virus Research*, 68, 91–112. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)68003-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)68003-2)
- Martin-Serrano, J., Perez-Caballero, D., & Bieniasz, P. D. (2004). Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding. *Journal of Virology*, 78(11), 5554–5563. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.11.5554-5563.2004>
- Martin-Serrano, J., Yarovoy, A., Perez-Caballero, D., Bieniasz, P. D., & Yarovoy, A. (2003). Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), 12414–12419. <https://doi.org/10.1073/pnas.2133846100>
- May, E. R., Armen, R. S., Mannan, A. M., & Brooks, C. L. (2010). The flexible C-terminal arm of the Lassa arenavirus Z-protein mediates interactions with multiple binding partners. *Proteins*, 78(10), 2251–2264. <https://doi.org/10.1002/prot.22738>
- McKee, K. T., Oro, J. G., Kuehne, A. I., Spisso, J. A., & Mahlandt, B. G. (1992). Candid No. 1 Argentine hemorrhagic fever vaccine protects against lethal Junin virus challenge in rhesus macaques. *Intervirology*, 34(3), 154–163. <https://doi.org/10.1159/000150276>
- Mills, J. N., Ellis, B. A., Childs, J. E., McKee, K. T., Maiztegui, J. I., Peters, C. J., Ksiazek, T. G., & Jahrling, P. B. (1994). Prevalence of infection with Junin virus in rodent populations in the epidemic area of Argentine hemorrhagic fever. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51(5), 554–562.
- Ministerio de Salud, Gobierno de la Provincia de Buenos Aires. (2020). *Situación epidemiológica de la Fiebre Hemorrágica Argentina en la Provincia de Buenos Aires*. <https://www.ms.gba.gov.ar/sitios/media/files/2020/11/Situaci%C3%B3n-Epidemiol%C3%B3gica-de-la-Fiebre-Hemorr%C3%A1gica-Argentina-en-la-Provincia-de-Buenos-Air>

- es.pdf
- Molinari, P., Crespo, M. I., Gravisaco, M. J., Taboga, O., & Morón, G. (2011). Baculovirus capsid display potentiates OVA cytotoxic and innate immune responses. *PLoS One*, *6*(8), e24108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024108>
- Morin, B., Coutard, B., Lelke, M., Ferron, F., Kerber, R., Jamal, S., Frangeul, A., Baronti, C., Charrel, R., de Lamballerie, X., Vornheim, C., Lescar, J., Bricogne, G., Günther, S., & Canard, B. (2010). The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an RNA endonuclease essential in mRNA transcription. *PLoS Pathogens*, *6*(9), e1001038. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001038>
- Motohashi, T., Shimojima, T., Fukagawa, T., Maenaka, K., & Park, E. Y. (2005). Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus bacmid system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *326*(3), 564–569. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.060>
- Mottershead, D., van der Linden, I., von Bonsdorff, C. H., Keinänen, K., & Oker-Blom, C. (1997). Baculoviral display of the green fluorescent protein and rubella virus envelope proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *238*(3), 717–722. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7372>
- Mpingabo, P. I., Urata, S., & Yasuda, J. (2020). Analysis of the Cell Type-Dependence on the Arenavirus Z-Mediated Virus-Like Particle Production. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 562814. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562814>
- Müller, H., Fehling, S. K., Dorna, J., Urbanowicz, R. A., Oestereich, L., Krebs, Y., Kolesnikova, L., Schauflinger, M., Krähling, V., Magassouba, N., Fichet-Calvet, E., Ball, J. K., Kaufmann, A., Bauer, S., Becker, S., von Messling, V., & Strecker, T. (2020). Adjuvant formulated virus-like particles expressing native-like forms of the Lassa virus envelope surface glycoprotein are immunogenic and induce antibodies with broadly neutralizing activity. *NPJ Vaccines*, *5*(1), 71. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-00219-x>
- Murhammer, D. W. (Ed.). (2007). *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols* (Vol. 388). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-457-5>
- Nooraei, S., Bahrololum, H., Hoseini, Z. S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A. J., & Ahmadian, G. (2021). Virus-like particles: Preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal of Nanobiotechnology*, *19*(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00806-7>
- Ojala, K., Koski, J., Ernst, W., Grabherr, R., Jones, I., & Oker-Blom, C. (2004). Improved display of synthetic IgG-binding domains on the baculovirus surface. *Technology in Cancer Research & Treatment*, *3*(1), 77–84. <https://doi.org/10.1177/153303460400300109>
- Okada, T., Ihara, H., Ito, R., Nakano, M., Matsumoto, K., Yamaguchi, Y., Taniguchi, N., & Ikeda, Y. (2010). N-Glycosylation engineering of lepidopteran insect cells by the introduction of the beta1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III gene. *Glycobiology*, *20*(9), 1147–1159. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq080>
- Oker-Blom, C., Airene, K. J., & Grabherr, R. (2003). Baculovirus display strategies: Emerging tools for eukaryotic libraries and gene delivery. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, *2*(3), 244–253. <https://doi.org/10.1093/bfpg/2.3.244>
- O'Reilly, D. R., & Miller, L. K. (1991). Improvement of a Baculovirus Pesticide by Deletion of the EGT Gene. *Bio/Technology*, *9*(11), 1086–1089. <https://doi.org/10.1038/nbt1191-1086>
- O'Reilly, D. R., Miller, L., & Luckow, V. A. (1994). *Baculovirus expression vectors: A laboratory manual*. Oxford University Press.

- Pasquato, A., Burri, D. J., Traba, E. G.-I., Hanna-El-Daher, L., Seidah, N. G., & Kunz, S. (2011). Arenavirus envelope glycoproteins mimic autoprocessing sites of the cellular proprotein convertase subtilisin kexin isozyme-1/site-1 protease. *Virology*, *417*(1), 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.04.021>
- Pearson, M. N., & Rohrmann, G. F. (1995). Lymantria dispar nuclear polyhedrosis virus homologous regions: Characterization of their ability to function as replication origins. *Journal of Virology*, *69*(1), 213–221. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.1.213-221.1995>
- Perez, M., Craven, R. C., & de la Torre, J. C. (2003). The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: Implications for antiviral strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(22), 12978–12983. <https://doi.org/10.1073/pnas.2133782100>
- Perez, M., Greenwald, D. L., & de la Torre, J. C. (2004). Myristoylation of the RING finger Z protein is essential for arenavirus budding. *Journal of Virology*, *78*(20), 11443–11448. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.11443-11448.2004>
- Pidre, M. L., Leticia, M., Haase, S., & Romanowski, V. (2013). Baculovirus Display: A Novel Tool for Vaccination. In V. Romanowski (Ed.), *Current Issues in Molecular Virology—Viral Genetics and Biotechnological Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/55572>
- Pinschewer, D. D., Perez, M., & de la Torre, J. C. (2005). Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation. *Journal of Virology*, *79*(7), 4519–4526. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.4519-4526.2005>
- Premanand, B., Zhong Wee, P., & Prabakaran, M. (2018). Baculovirus Surface Display of Immunogenic Proteins for Vaccine Development. *Viruses*, *10*(6), E298. <https://doi.org/10.3390/v10060298>
- Pullen, S. S., & Friesen, P. D. (1995a). Early transcription of the ie-1 transregulator gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus is regulated by DNA sequences within its 5' noncoding leader region. *Journal of Virology*, *69*(1), 156–165. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.1.156-165.1995>
- Pullen, S. S., & Friesen, P. D. (1995b). The CAGT motif functions as an initiator element during early transcription of the baculovirus transregulator ie-1. *Journal of Virology*, *69*(6), 3575–3583. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.6.3575-3583.1995>
- Qian, C., Liu, X., Xu, Q., Wang, Z., Chen, J., Li, T., Zheng, Q., Yu, H., Gu, Y., Li, S., & Xia, N. (2020). Recent Progress on the Versatility of Virus-Like Particles. *Vaccines*, *8*(1), E139. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010139>
- Radoshitzky, S. R., Abraham, J., Spiropoulou, C. F., Kuhn, J. H., Nguyen, D., Li, W., Nagel, J., Schmidt, P. J., Nunberg, J. H., Andrews, N. C., Farzan, M., & Choe, H. (2007). Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature*, *446*(7131), 92–96. <https://doi.org/10.1038/nature05539>
- Radoshitzky, S. R., Buchmeier, M. J., Charrel, R. N., Clegg, J. C. S., Gonzalez, J.-P. J., Günther, S., Hepojoki, J., Kuhn, J. H., Lukashevich, I. S., Romanowski, V., Salvato, M. S., Sironi, M., Stenglein, M. D., de la Torre, J. C., & ICTV Report Consortium. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Arenaviridae. *Journal of General Virology*, *100*(8), 1200–1201. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001280>
- Rawls, W. E., Chan, M. A., & Gee, S. R. (1981). Mechanisms of persistence in arenavirus infections: A brief review. *Canadian Journal of Microbiology*, *27*(6), 568–574. <https://doi.org/10.1139/m81-086>

- Rohrmann, G. F. (2013). *Baculovirus Molecular Biology* (3rd ed.). National Center for Biotechnology Information (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114593/>
- Rojek, J. M., Lee, A. M., Nguyen, N., Spiropoulou, C. F., & Kunz, S. (2008). Site 1 protease is required for proteolytic processing of the glycoproteins of the South American hemorrhagic fever viruses Junin, Machupo, and Guanarito. *Journal of Virology*, *82*(12), 6045–6051. <https://doi.org/10.1128/JVI.02392-07>
- Rojek, J. M., Sanchez, A. B., Nguyen, N. T., de la Torre, J.-C., & Kunz, S. (2008). Different mechanisms of cell entry by human-pathogenic Old World and New World arenaviruses. *Journal of Virology*, *82*(15), 7677–7687. <https://doi.org/10.1128/JVI.00560-08>
- Seidah, N. G., Mowla, S. J., Hamelin, J., Mamarbachi, A. M., Benjannet, S., Touré, B. B., Basak, A., Munzer, J. S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., Barale, J. C., Lazure, C., Murphy, R. A., Chrétien, M., & Marcinkiewicz, M. (1999). Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(4), 1321–1326. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1321>
- Seregin, A. V., Yun, N. E., Miller, M., Aronson, J., Smith, J. K., Walker, A. G., Smith, J. N., Huang, C., Manning, J. T., de la Torre, J. C., & Paessler, S. (2015). The glycoprotein precursor gene of Junin virus determines the virulence of the Romero strain and the attenuation of the Candid #1 strain in a representative animal model of Argentine hemorrhagic fever. *Journal of Virology*, *89*(11), 5949–5956. <https://doi.org/10.1128/JVI.00104-15>
- Shao, J., Liang, Y., & Ly, H. (2018). Roles of Arenavirus Z Protein in Mediating Virion Budding, Viral Transcription-Inhibition and Interferon-Beta Suppression. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1604*, 217–227. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6981-4_16
- Shimojima, M., Ströher, U., Ebihara, H., Feldmann, H., & Kawaoka, Y. (2012). Identification of cell surface molecules involved in dystroglycan-independent Lassa virus cell entry. *Journal of Virology*, *86*(4), 2067–2078. <https://doi.org/10.1128/JVI.06451-11>
- Shtanko, O., Imai, M., Goto, H., Lukashevich, I. S., Neumann, G., Watanabe, T., & Kawaoka, Y. (2010). A role for the C terminus of Mopeia virus nucleoprotein in its incorporation into Z protein-induced virus-like particles. *Journal of Virology*, *84*(10), 5415–5422. <https://doi.org/10.1128/JVI.02417-09>
- Shtanko, O., Watanabe, S., Jasenosky, L. D., Watanabe, T., & Kawaoka, Y. (2011). ALIX/AIP1 is required for NP incorporation into Mopeia virus Z-induced virus-like particles. *Journal of Virology*, *85*(7), 3631–3641. <https://doi.org/10.1128/JVI.01984-10>
- Smith, G. E., Summers, M. D., & Fraser, M. J. (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology*, *3*(12), 2156–2165. <https://doi.org/10.1128/mcb.3.12.2156-2165.1983>
- Spiropoulou, C. F., Kunz, S., Rollin, P. E., Campbell, K. P., & Oldstone, M. B. A. (2002). New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor. *Journal of Virology*, *76*(10), 5140–5146. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.10.5140-5146.2002>
- Staneck, L. D., Trowbridge, R. S., Welsh, R. M., Wright, E. A., & Pfau, C. J. (1972). Arenaviruses: Cellular response to long-term in vitro infection with parana and lymphocytic choriomeningitis viruses. *Infection and Immunity*, *6*(4), 444–450. <https://doi.org/10.1128/iai.6.4.444-450.1972>
- Stott, R. J., Strecker, T., & Foster, T. L. (2020). Distinct Molecular Mechanisms of Host Immune Response Modulation by Arenavirus NP and Z Proteins. *Viruses*, *12*(7), E784.

- <https://doi.org/10.3390/v12070784>
- Strecker, T., Eichler, R., Meulen, J. ter, Weissenhorn, W., Dieter Klenk, H., Garten, W., & Lenz, O. (2003). Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]. *Journal of Virology*, 77(19), 10700–10705. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.19.10700-10705.2003>
- Thomas, C. J., Casquilho-Gray, H. E., York, J., DeCamp, D. L., Dai, D., Petrilli, E. B., Boger, D. L., Slayden, R. A., Amberg, S. M., Sprang, S. R., & Nunberg, J. H. (2011). A specific interaction of small molecule entry inhibitors with the envelope glycoprotein complex of the Junín hemorrhagic fever arenavirus. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(8), 6192–6200. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.196428>
- Thomas, C. J., Shankar, S., Casquilho-Gray, H. E., York, J., Sprang, S. R., & Nunberg, J. H. (2012). Biochemical reconstitution of hemorrhagic-fever arenavirus envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *PloS One*, 7(11), e51114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051114>
- Tortorici, M. A., Albariño, C. G., Posik, D. M., Ghiringhelli, P. D., Lozano, M. E., Rivera Pomar, R., & Romanowski, V. (2001). Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity in vivo. *Virus Research*, 73(1), 41–55. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(00\)00222-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(00)00222-7)
- Tung, M.-C., Lu, H.-Y., Chang, Y.-K., Huang, W.-R., Liao, T.-L., Wu, H.-Y., Chang, C.-D., Fan, H.-C., Nielsen, B. L., & Liu, H.-J. (2020). Baculovirus surface display of the HA protein of H5N2 avian influenza virus and its immunogenicity against a lethal challenge with H5N1 virus in chickens. *Veterinary Microbiology*, 243, 108640. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108640>
- Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Morikawa, S., Yokosawa, H., & Yasuda, J. (2007). Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *Journal of Virology*, 81(9), 4895–4899. <https://doi.org/10.1128/JVI.02829-06>
- Urata, S., & Yasuda, J. (2015). Cis- and cell-type-dependent trans-requirements for Lassa virus-like particle production. *The Journal of General Virology*, 96(Pt 7), 1626–1635. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000105>
- Urata, S., Yasuda, J., & de la Torre, J. C. (2009). The z protein of the new world arenavirus tacaribe virus has bona fide budding activity that does not depend on known late domain motifs. *Journal of Virology*, 83(23), 12651–12655. <https://doi.org/10.1128/JVI.01012-09>
- Vaughn, J. L., & Fan, F. (1997). Differential requirements of two insect cell lines for growth in serum-free medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 33(6), 479–482. <https://doi.org/10.1007/s11626-997-0067-5>
- Veza, A. C., Cash, P., Jahrling, P., Eddy, G., & Bishop, D. H. (1980). Arenavirus recombination: The formation of recombinants between prototype pichinde and pichinde munchique viruses and evidence that arenavirus S RNA codes for N polypeptide. *Virology*, 106(2), 250–260. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(80\)90248-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(80)90248-2)
- Wang, J., Danzy, S., Kumar, N., Ly, H., & Liang, Y. (2012). Biological roles and functional mechanisms of arenavirus Z protein in viral replication. *Journal of Virology*, 86(18), 9794–9801. <https://doi.org/10.1128/JVI.00385-12>
- Wang, P., Hammer, D. A., & Granados, R. R. (1994). Interaction of Trichoplusia ni granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four

- lepidopteran insects. *The Journal of General Virology*, 75 (Pt 8), 1961–1967.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-8-1961>
- Weissenbacher, M. C., Laguens, R. P., & Coto, C. E. (1987). Argentine hemorrhagic fever. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 134, 79–116.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-71726-0_4
- Weissenbacher, M. C., Sabattini, M. S., Avila, M. M., Sangiorgio, P. M., de Sensi, M. R., Contigiani, M. S., Levis, S. C., & Maiztegui, J. I. (1983). Junin virus activity in two rural populations of the Argentine hemorrhagic fever (AHF) endemic area. *Journal of Medical Virology*, 12(4), 273–280. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890120407>
- White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M., & Schornberg, K. (2008). Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: Multiple variations on a common theme. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43(3), 189–219.
<https://doi.org/10.1080/10409230802058320>
- Whitford, M., Stewart, S., Kuzio, J., & Faulkner, P. (1989). Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. *Journal of Virology*, 63(3), 1393–1399.
<https://doi.org/10.1128/JVI.63.3.1393-1399.1989>
- Wu, P., Nicholls, S. B., & Hardy, J. A. (2013). A tunable, modular approach to fluorescent protease-activated reporters. *Biophysical Journal*, 104(7), 1605–1614.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.01.058>
- Yan, D., Wei, Y.-Q., Guo, H.-C., & Sun, S.-Q. (2015). The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(24), 10415–10432. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7000-8>
- York, J., & Nunberg, J. H. (2006). Role of the stable signal peptide of Junín arenavirus envelope glycoprotein in pH-dependent membrane fusion. *Journal of Virology*, 80(15), 7775–7780.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00642-06>
- York, J., Romanowski, V., Lu, M., & Nunberg, J. H. (2004). The signal peptide of the Junín arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex. *Journal of Virology*, 78(19), 10783–10792.
<https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10783-10792.2004>
- York, J., Berry J.D., Ströher, U., Li, Q., Feldmann, H., Lu, M., Trahey M., Nunberg, J.H. (2010). An antibody directed against the fusion peptide of Junin virus envelope protein GPC inhibits pH-induced membrane fusion. *Journal of Virology*, 84(12), 6119–29.
<https://doi.org/10.1128/JVI.02700-09>
- Young, C. A., Williams, I. R., & MacFarlane, I. A. (1991). Unrecognised Cushing's syndrome and adrenal suppression due to topical clobetasol propionate. *The British Journal of Clinical Practice*, 45(1), 61–62.
- Zhou, M., Shi, B., Wang, P., Gu, J., & Li, Z. (2011). Large-scale production of functional recombinant CAR in a baculovirus- insect cell system. *Acta Virologica*, 55(2), 93–99.
https://doi.org/10.4149/av_2011_02_93

