



Universitat Autònoma de Barcelona

**Institut de Biotecnologia i de Biomedicina
«Vicent Villar i Palasí»**

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Expresión de la Glicoproteína E del BoHV-1 en *Escherichia coli*. Determinación de una Secuencia Citotóxica

Memòria presentada per a optar al grau de Doctor en Ciències (Secció Biologia)
per en Xavier Serra Hartmann, llicenciat en Ciències (Secció Biologia)

Treball realitzat a l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat
Autònoma de Barcelona, sota la direcció dels doctors Jaume Piñol Ribas i
Enrique Querol Murillo

Dr. Jaume Piñol Ribas

Dr. Enrique Querol Murillo

Xavier Serra Hartmann

Bellaterra, desembre de 2004

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	7
II. OBJETIVOS.....	47
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
IV. DISCUSIÓN GENERAL.....	137
V. CONCLUSIONES.....	153
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	157
VII. BIBLIOGRAFÍA	229

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABREVIATURAS.....	iii
I. INTRODUCCIÓN	7
I.A. Los Herpesvirus	9
I.A.1. Características de los herpesvirus	10
<i>I.A.1.A. Genoma</i>	12
<i>I.A.1.B. Cápside</i>	15
<i>I.A.1.C. Tegumento</i>	16
<i>I.A.1.D. Envoltura</i>	18
I.A.2. Morfogénesis de los herpesvirus	19
I.A.3. Clasificación de los herpesvirus	21
I.B. El herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1)	23
I.B.1. Características del BoHV-1	24
<i>I.B.1.A. Genoma</i>	24
<i>I.B.1.B. Tegumento</i>	25
<i>I.B.1.C. Glicoproteínas de la envoltura</i>	25
I.B.1.C.1. Glicoproteína B (gB).....	25
I.B.1.C.2. Glicoproteína C (gC)	26
I.B.1.C.3. Glicoproteína D (gD)	26
I.B.1.C.4. Glicoproteína E (gE) y glicoproteína I (gI)	27
I.B.1.C.5. Glicoproteína G (gG).....	28
I.B.1.C.6. Glicoproteína H (gH) y glicoproteína L (gL).....	28
I.B.1.C.7. Glicoproteína K (gK).....	29
I.B.1.C.8. Glicoproteína M (gM) y glicoproteína N (gN).....	30
I.B.2. Ciclo de infección, patogénesis y lesiones	31
I.B.3. Diagnóstico y control	33
I.C. La glicoproteína E	34
I.C.1. Función de la gE y gI	34
I.C.2. Interés de la gE del BoHV-1	36
I.C.3. Estructura de la gE del BoHV-1	37
I.C.4. Expresión recombinante en <i>E. coli</i>. Expresión de la gE del BoHV-1	42
<i>I.C.4.A. Precedente a este trabajo experimental</i>	44

II. OBJETIVOS 47

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 51

III.A. Acotación de una secuencia citotóxica en el fragmento A5 de la gE53

III.A.1. Deleciones Ct del fragmento A5. Análisis de expresión 53

III.A.1.A.1.a. Construcción..... 53

III.A.1.A.1.b. Expresión..... 56

III.A.2. Deleciones Nt del fragmento A5. Análisis de expresión 57

III.A.2.A.1.a. Construcción..... 57

III.A.2.A.1.b. Expresión..... 60

III.A.3. Determinación de la secuencia TRAPP. Análisis de expresión..... 61

III.A.3.A.1.a. Construcción..... 61

III.A.3.A.1.b. Expresión..... 67

III.B. Toxicidad de la secuencia TRAPP70

III.B.1. Expresión del dominio extracelular de la gE 70

III.B.1.A.1.a. Construcción..... 70

III.B.1.A.1.b. Expresión..... 72

III.B.2. Expresión de la secuencia TRAPP en proteínas de *E. coli* 73

III.B.2.A. Expresión de la secuencia TRAPP en la MBP 73

III.B.2.A.1. Inserción de la secuencia TRAPP en la MBP 74

III.B.2.A.1.a. Construcción..... 74

III.B.2.A.1.b. Expresión..... 77

III.B.2.A.2. Substitución de la secuencia TRAPP en la MBP 79

III.B.2.A.2.a. Construcción..... 79

III.B.2.A.2.b. Expresión..... 81

III.B.2.A.2.c. Construcción..... 83

III.B.2.A.2.d. Expresión..... 85

III.B.2.B. Expresión de la secuencia TRAPP en la β -galactosidasa 87

III.B.2.B.1.a. Construcción..... 89

III.B.2.B.1.b. Expresión..... 91

III.B.2.B.1.c. Construcción..... 92

III.B.2.B.1.d. Expresión..... 94

III.B.3. Inducción de la respuesta 'heat-shock' 96

III.B.4. Viabilidad del cultivo inhibido 99

III.C. La secuencia TRAPP en el proteoma de *E. coli*. Otras secuencias minoritarias101

III.C.1. La secuencia TRAPP en el proteoma de *E. coli*..... 101

III.C.2. Expresión de otras secuencias minoritarias en *E. coli*..... 109

III.C.2.A. Inserción de otras secuencias minoritarias en la MBP 109

III.C.2.B. Substitución de otras secuencias minoritarias en la MBP 111

III.D. Construcción de un virus recombinante114

III.D.1. Construcción de un virus BoHV-1 recombinante defectivo para TRAPP 114

III.D.1.A. El virus BoHV-1 gE	115
III.D.1.B. Construcción del plásmido lanzadera	116
III.D.1.C. Co-transfección, selección y enriquecimiento de viriones recombinantes	118
III.D.1.D. Caracterización del virus recombinante	119
III.D.2. Caracterización <i>in vitro</i> del virus BoHV-1 RAPPR	122
III.D.2.A. Cultivo de infección en medio líquido	122
III.D.2.B. Cultivo de infección en medio semisólido	124
III.D.2.C. Determinación del área de calvas en medio semisólido	126
III.E. Obtención de anticuerpos monoclonales anti-gE y diseño de un test ELISA de bloqueo	129
III.E.1. Caracterización de los anticuerpos monoclonales	129
III.E.2. Establecimiento de los umbrales y puntos de corte	132
III.E.3. Especificidad del ELISA gE de bloqueo	133
III.E.4. Sensibilidad del ELISA gE de bloqueo	134
IV. DISCUSIÓN GENERAL	137
IV.A. Precedentes	139
IV.B. Determinación de la secuencia TRAPP	140
IV.C. Mecanismos de toxicidad de la secuencia TRAPP	142
IV.D. Aplicación a la expresión heteróloga en <i>E. coli</i>	147
IV.E. Función de la secuencia TRAPP en la glicoproteína E	150
V. CONCLUSIONES	153
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	157
VI.A. Equipo de laboratorio	159
VI.B. Material biológico	159
VI.B.1. Cepas bacterianas	159
VI.B.1.A.1. XL1-Blue	159
VI.B.1.A.2. BL21 (DE3)	160
VI.B.1.A.3. BL26	160
VI.B.1.A.4. MC4100λHS1	160
VI.B.2. Líneas celulares eucariotas	160
VI.B.2.A.1. Madin Darby Bovine Kidney (MDBK)	160
VI.B.2.A.2. Georgia Bovine Kidney (GBK)	161

VI.B.2.A.3. NSI-D8	161
VI.B.3. Virus	161
VI.B.4. Vectores	161
<i>VI.B.4.A. Vectores de clonación</i>	<i>161</i>
VI.B.4.A.1. pUC18/19 y pUCBM20/21	161
VI.B.4.A.2. pUC118/119	162
VI.B.4.A.3. LITMUS 28	163
<i>VI.B.4.B. Vectores de expresión</i>	<i>164</i>
VI.B.4.B.1. pMAL™-p2/c2	164
VI.B.4.B.2. pET-21a(+)	165
VI.B.4.B.3. pET-22b(+)	166
VI.B.4.B.4. pcDNA3	166
VI.C. Métodos de cultivo	167
VI.C.1. Cultivo de cepas bacterianas y clones transformantes	167
<i>VI.C.1.A. Medios de cultivo</i>	<i>167</i>
VI.C.1.A.1. LB Miller (caldo o agar)	167
VI.C.1.A.2. 2xYT (caldo)	167
VI.C.1.A.3. TYG (caldo)	168
<i>VI.C.1.B. Condiciones de cultivo. Mantenimiento y antibióticos</i>	<i>168</i>
VI.C.1.B.1. Cultivo en medio sólido	168
VI.C.1.B.2. Cultivo en medio líquido	168
VI.C.1.B.3. Tiempo de incubación	169
VI.C.1.B.4. Temperatura de incubación	170
VI.C.1.B.5. Conservación	170
VI.C.1.B.6. Antibióticos	170
VI.C.1.B.6.a. Ampicilina	170
VI.C.1.B.6.b. Tetraciclina	171
VI.C.1.B.6.c. Estreptomicina	171
VI.C.1.B.7. Inductor de expresión y sustrato cromogénico	171
VI.C.1.B.7.a. IPTG	172
VI.C.1.B.7.b. X-Gal	172
<i>VI.C.1.C. Cultivos de expresión de proteínas recombinantes. Fraccionamiento del cultivo</i>	<i>173</i>
VI.C.1.C.1. Cultivo de expresión de proteína recombinante	173
VI.C.1.C.2. Fraccionamiento del cultivo	174
VI.C.2. Cultivo de líneas celulares eucariotas	175
<i>VI.C.2.A. Medios de cultivo</i>	<i>175</i>
VI.C.2.A.1. GMEM completo líquido	175
VI.C.2.A.2. GMEM completo semisólido	176
<i>VI.C.2.B. Condiciones de cultivo. Cultivos de mantenimiento y conservación</i>	<i>177</i>
VI.C.2.B.1. Condiciones de cultivo	177
VI.C.2.B.2. Cultivo de mantenimiento	177
VI.C.2.B.3. Conservación de líneas celulares	178
VI.C.3. Cultivo de virus	179
VI.C.3.A.1. Infección de cultivos celulares	179
VI.C.3.A.2. Titulación de suspensiones víricas	180
VI.C.3.A.3. Purificación de partículas víricas	180
VI.C.3.A.4. Conservación de virus	182
VI.D. Métodos de manipulación de DNA	182

VI.D.1. Métodos de clonación	182
VI.D.1.A.1. Preparación de células competentes	182
VI.D.1.A.2. Transformación de células competentes	184
VI.D.2. Métodos de obtención de DNA	185
VI.D.2.A.1. Extracción de DNA plasmídico	185
VI.D.2.A.2. Extracción del DNA viral	188
VI.D.2.A.3. Recuperación del DNA plasmídico tratado	189
VI.D.2.A.3.a. Recuperación del DNA de geles de agarosa	189
VI.D.2.A.3.b. Recuperación del DNA tratado de la mezcla de reacción	189
VI.D.3. Métodos de modificación de DNA	190
VI.D.3.A.1. Digestión con enzimas de restricción	190
VI.D.3.A.2. Modificación enzimática del DNA	191
VI.D.3.A.2.a. Defosforilación de extremos 5'-fosfato	191
VI.D.3.A.2.b. Ligación de fragmentos de DNA	191
VI.D.3.A.2.c. Conversión de extremos 5' protruyentes a extremos romos (Klenow)	193
VI.D.3.A.2.d. Conversión de extremos 5' protruyentes a extremos romos (Mung Bean)	194
VI.D.3.A.2.e. Marcaje no radiactivo de DNA	195
VI.D.3.A.2.f. Deleciones anidadas de DNA	196
VI.D.3.A.3. Síntesis de adaptadores de DNA	197
VI.D.4. Métodos de análisis de DNA	198
VI.D.4.A.1. Electroforesis horizontal en geles de agarosa	198
VI.D.4.A.2. Cuantificación del DNA	199
VI.D.4.A.2.a. Cuantificación espectrofotométrica	199
VI.D.4.A.2.b. Cuantificación en geles de agarosa	200
VI.D.4.A.3. Transferencia Southern	201
VI.D.4.A.4. Secuenciación del DNA	204
VI.E. Métodos analíticos de proteínas	208
VI.E.1.A.1. SDS-PAGE	208
VI.E.1.A.2. Transferencia 'Western'	212
VI.E.1.A.3. Valoración de la actividad β -galactosidasa	213
VI.F. Métodos de obtención y caracterización de virus recombinantes	215
VI.F.1. Métodos de obtención de virus recombinantes	215
VI.F.1.A.1. Co-transfección de líneas celulares	215
VI.F.1.A.2. Infección de cultivos celulares en medio semisólido	217
VI.F.1.A.3. Hibridación <i>in situ</i> sobre placa de cultivo	218
VI.F.1.A.4. Rescate del virus recombinante del medio semisólido	222
VI.F.2. Métodos de caracterización de virus recombinantes	223
VI.F.2.A.1. Cinética de crecimiento	223
VI.F.2.A.2. Determinación del área de calva	224
VI.F.2.A.2.a. Análisis descriptivo de valores	224
VI.F.2.A.2.b. Análisis estadístico	225
VI.G. Método de obtención de anticuerpos monoclonales	226

RESUMEN

El herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) es un alphaherpesvirus que está considerado el agente etiológico más importante del cuadro de enfermedades respiratorias bovinas responsables de elevadas pérdidas económicas en la industria ganadera. La vacunación contra el BoHV-1, aunque reduce la infección y los signos clínicos derivados de la misma, no evita la infección post-vacunación por BoHV-1 del animal. En consecuencia, estos animales pueden convertirse en un foco latente de infección. El control del BoHV-1 pasa por el desarrollo de programas de erradicación basados en la identificación serológica y el sacrificio de los animales infectados. Para llevar a cabo estos programas se administran vacunas marcadoras defectivas en uno o más genes que generan una respuesta inmunitaria distinta a la que se produce tras la infección por el BoHV-1 wt. Conjuntamente, se ensaya un test serológico diferencial que detecta la presencia de anticuerpos dirigidos contra la/s glicoproteína/s ausente/s en la vacuna marcadora en aquellos animales que han sido infectados por el BoHV-1 wt.

Nuestro grupo de investigación llevó a cabo el desarrollo de una vacuna viva marcadora contra el BoHV-1 defectiva en la glicoproteína E (gE) (BoHV-1 gE⁻). Paralelamente a la construcción del BoHV-1 gE⁻, se abordó la expresión recombinante en *Escherichia coli* de la gE del BoHV-1. Estos ensayos de expresión eran necesarios tanto para la caracterización definitiva del virus defectivo, como para el futuro desarrollo de un test que permitiera la diferenciación serológica entre los animales vacunados con el virus BoHV-1 gE⁻ y los animales infectados con cepas BoHV-1 wt. Los resultados obtenidos indicaban, no obstante, que la expresión recombinante de la gE del BoHV-1 era tóxica para *E. coli*.

En la presente tesis se ha determinado que la secuencia de aminoácidos TRAPP de la gE del BoHV-1 es la responsable de la toxicidad asociada a la expresión del dominio extracelular de dicha glicoproteína en *E. coli*. La supresión parcial de TRAPP es condición suficiente para restablecer el crecimiento normal del cultivo y la acumulación de la proteína expresada. Se ha determinado, asimismo, que la secuencia TRAPP también es tóxica cuando se expresa integrada en proteínas nativas de *E. coli*. La toxicidad de TRAPP se debe a la propia naturaleza de la secuencia, y no responde a un uso de codón ajeno al de *E. coli* y tampoco a la activación de las principales proteasas de la bacteria. Por otro lado, la toxicidad de la secuencia TRAPP se correlaciona con la ausencia de dicha secuencia en los polipéptidos propios que codifica *E. coli*. La determinación de TRAPP ha llevado a identificar muchos otros péptidos igualmente poco presentes entre las proteínas de *E. coli*, y a considerar este hecho de posible relevancia para la expresión heteróloga de proteínas en dicha bacteria.

Asimismo, mediante técnicas de recombinación homóloga, se ha obtenido una cepa de BoHV-1 defectiva para la secuencia RAPP (BoHV-1 RAPP⁻). Los resultados obtenidos indican que la secuencia TRAPP no es esencial para la función de la gE, esto es, la transmisión directa entre células del BoHV-1. La substitución de la secuencia RAPP, por el contrario, sí conlleva un pequeño cambio supuestamente en el patrón de interacción del virus con componentes de la membrana celular o de la matriz extracelular.

Finalmente, en este trabajo experimental también se ha obtenido un panel de anticuerpos monoclonales contra la gE del BoHV-1 para utilizarlos en un test serológico diferencial de aplicación conjunta a la vacunación con el BoHV-1 gE⁻. El test diseñado, un ELISA de bloqueo, resulta sensible y específico para la detección de anticuerpos contra la gE del BoHV-1, y se revela como un intento prometedor para afrontar el desarrollo de un test definitivo.

ABREVIATURAS

A: absorbancia (1 cm)
aa: aminoácidos
AIHV-1: virus de la fiebre catarral maligna (MCF)
amb: ambiente
Amp: ampicilina
AP: proteína adaptadora ('assembly polypeptide', 'adaptor protein'). En anti-mouse/AP, anti-DIG/AP o anti-BIO/AP significa fosfatasa alcalina ('alkaline phosphatase')
aprox.: aproximadamente
BCIP: sal de toluidina de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BIO: biotina
bl: bloqueo
bla: gen de la β -lactamasa
BoHV-1: herpesvirus bovino tipo 1
BoHV-2: herpesvirus bovino tipo 2
BoHV-5: herpesvirus bovino tipo 5
BRD: enfermedades respiratorias bovinas ('bovine respiratory diseases')
BRSV: virus sincitial respiratorio bovino
BSA: albúmina sérica bovina
CaHV-1: herpesvirus canino tipo 1
CAMs: moléculas de adhesión celular ('cell adhesion molecules')
CeHV-1: herpesvirus de simio, virus B
CeHV-9: virus de la varicela de simio (SVV)
cfu: unidades formadoras de colonias ('colony forming units')
CIAP: fosfatasa alcalina de intestino de ternera
cI857^{ts}: represor termosensible
cm: centímetro(s)
Ct: extremo carboxilo terminal
 Δ : deleción
DE: desviación estándar
DIG: digoxigenina
DMSO: dimetilsulfóxido
dNTP(s): deoxinucleósido(s) 5'-trifosfato
ddNTP(s): dideoxinucleósido(s) 5'-trifosfato
DTE: ditioeritritol
DTT: 1,4-ditiotreititol
EBSS: solución salina ('Earle's Balanced Salt Solution')
EE: error estándar
EHV-1: herpesvirus equino tipo 1
EHV-3: herpesvirus equino tipo 3
EHV-4: herpesvirus equino tipo 4
Fc: fracción constante de la inmunoglobulina
FcR: actividad de unión de la fracción constante de la inmunoglobulina
FCS: suero bovino fetal
FeHV-1: herpesvirus felino tipo 1
Fre_{C_{esp}}: frecuencia esperada
Fre_{C_{obs}}: frecuencia observada
g: gramo(s)
g, gp: seguido de letra mayúscula o número significa glicoproteína, p.e. gE o glicoproteína E, gp42 o glicoproteína 42
GaHV-1: virus de la laringotraqueitis infecciosa (ILTV)
GaHV-2: virus de la enfermedad de Marek (MDV)
GBK: células Georgia Bovine Kidney
GFP: proteína verde fluorescente ('green fluorescent protein')
GST: glutation-S-transferasa
h: hora(s)
HHV-1: virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1)
HHV-2: virus herpes simplex tipo 2 (HSV-2)
HHV-3: virus varicela-zóster (VZV)

HHV-4: virus Epstein-Barr
 HHV-5: citomegalovirus humano (HCMV)
 HHV-6A: virus linfotrópico de células B
 HHV-6B: virus linfotrópico de células B
 HHV-7: herpesvirus humano tipo 7 (virus RK)
 HHV-8: virus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV)
 IBR: síndrome de la rinotraqueítis infecciosa bovina ('infectious bovine rhinotracheitis')
 IC: intervalo de confianza
 IcHV-1: herpesvirus de pez gato
 IG M13: origen de replicación del bacteriófago M13
 IgG, IgM: inmunoglobulina G, inmunoglobulina M
 ind, no ind: inducido, no inducido
 IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
 IPV: síndrome de la vulvovaginitis/balanopostitis pustular infecciosa ('infectious pustular vulvovaginitis')
 IRS: secuencia repetida interna de la región única corta ('internal repeat short')
 kb(s): kilobase(s)
 kDa: kilodalton(s)
 L: litro(s)
 λ : longitud de onda
lacI, *lacI^q*: gen del represor del operón *lac*
 LacZ: β -galactosidasa, proteína LacZ
lacZ: gen de la β -galactosidasa
lacZ α , *lacZalpha*: fragmento de α -complementación del gen de la β -galactosidasa
 LAT, LR: transcrito asociado a latencia ('latency-associated transcript', 'latency-related')
 LB Miller: medio de cultivo Luria Bertani modificado según Miller
 M: precedido de número significa molar
 mA: miliamperio(s)
 MAb(s): anticuerpo(s) monoclonal(es)
malE: gen de la proteína de unión a maltosa
 MBP: proteína de unión a maltosa ('maltose binding protein')
 MCS: secuencia de inserción múltiple o 'polylinker' ('multiple cloning site')
 MDBK: células Madin Darby Bovine Kidney
 MeHV-1: herpesvirus de pavo tipo 1
 mg: miligramo(s)
 MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
 min: minuto(s)
 ml: mililitro(s)
 mm: milímetro(s)
 mM: milimolar
 MM, mwm: marcador de peso molecular
 m.o.i.: multiplicidad de infección ('multiplicity of infection')
 μ g: microgramo(s)
 μ l: microlitro(s)
 μ m: micra(s)
 μ M: micromolar
 NBT: cloruro de azul de *p*-nitrotetrazolio
 Neo: neomicina
 nm: nanómetro(s)
 Nt: extremo amino terminal
 o/n: durante 12-15 horas ('overnight')
 ONPG: *orto*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
 ori: origen de replicación
 ORF(s): marco(s) abierto(s) de lectura ('open reading frame(s)')
 OvHV-2: herpesvirus ovino tipo 2
 pb: par(es) de base(s)
P_{bla}, *P_{lac}*, *P_{lac}*, *P_L*, *P_R*, *P_{RM}*, *P_{T7}*, *P_{T7lac}*, *P_{CMV}*, *P_{Sp6}*, *P_{SV40}*: promotores de expresión
 PBS: tampón salino fosfato
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa ('polymerase chain reaction')
 p.e.: por ejemplo
 PEG: polietilenglicol
 pfu: unidades formadoras de calvas ('plaque forming units')
 PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
 PO: peroxidasa

PS: péptido señal
 (p/v): relación peso/volumen
 RBS: secuencia de unión de ribosoma ('ribosome binding site')
 RNAasa: ribonucleasa
 rpm: revoluciones por minuto
 seg: segundo(s)
 sol., insol.: fracción soluble, fracción insoluble
 sp: suero problema
 Str: estreptomicina
 SuHV-1: herpesvirus porcino tipo 1 (ADV, PrV)
 T°: temperatura
 TBE: Tris-borato-EDTA
 TE: Tris-EDTA
 TEMED: N,N,N,N'-tetrametiltilendiamina
 Tet: tetraciclina
 TGN: red de secreción del complejo de Golgi ('trans-Golgi network')
 TM: dominio transmembrana
 TNF: factor de necrosis tumoral
 TRS, TRs: secuencia repetida terminal de la región única corta ('terminal repeat short')
 UL: secuencia única larga ('unique long'). Seguido de número significa el gen que ocupa dicha posición en la secuencia única larga
 US: secuencia única corta ('unique short'). Seguido de número significa el gen que ocupa dicha posición en la secuencia única corta
 V: voltio(s)
 VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
 VP: seguido de número significa proteína del virus ('virus protein'), p.e. VP5 o proteína 5 del virus
 (v/v), (v/v/v): relación volumen/volumen
 W: vatios
 wt: cepa silvestre o 'wild type'
 X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-tiogalactopiranosido

Asimismo, también se muestran abreviados los nombres de los distintos **aminoácidos**. Para ello ha adoptado indistintamente el código de 1 letra o el código de 3 letras, si bien se ha preferido adoptar el código de 1 letra en los casos en los que se describe una secuencia de aminoácidos, p.e. TRAPP. En ocasiones el nombre del aminoácido va acompañado de un número o subíndice numérico que indica la posición que ocupa dicho aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la proteína de origen, p.e. V₄₀ o Val₄₀ se refiere al aminoácido valina que ocupa la posición 40 en la secuencia lineal de aminoácidos de la gE del BoHV-1.

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

I. INTRODUCCIÓN

I.A. Los Herpesvirus

El 'International Committee on Taxonomy of Viruses' (ICTV) reconoce actualmente la existencia de más de 3600 especies de virus que se agrupan en más de 50 familias distintas (Büchen-Osmond *et al.*, 2000). Los virus se clasifican en familias y géneros según la morfología del virión (la partícula vírica totalmente ensamblada e infectiva), la organización de su genoma, el modo de replicación y el número y tamaño de proteínas víricas estructurales y no-estructurales (van Regenmortel, 2000). A su vez, las diferentes especies de virus pertenecientes a una familia y género particulares se distinguen y definen en función de la divergencia genética, el rango de hospedador natural, el tropismo tisular y celular, la patogenicidad y citopatología, el modo de transmisión, las propiedades físico-químicas del virión o las propiedades antigénicas de las proteínas virales.

La familia *Herpesviridae* agrupa un extenso conjunto de más de 130 especies de virus que comparten un conjunto de características y que infectan un rango muy amplio de especies animales (Roizman & Pellett, 2001). Moluscos, peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, incluido el hombre, son susceptibles a la infección por herpesvirus. Los herpesvirus tienen un especial interés debido a su elevada incidencia de infección, su diversidad evolutiva y su implicación en importantes enfermedades en humanos y en animales. En humanos hay actualmente descritas 9 especies de herpesvirus, y son el origen de enfermedades como la varicela o el herpes (del griego *herpein*, y que da el nombre a esta familia de virus) o están implicados en afecciones menos frecuentes como la ceguera o el cáncer (Minson *et al.*, 1998; Arvin *et al.*, 1999; Prescott *et al.*, 2004) (Tabla I). En animales, los herpesvirus causan infecciones respiratorias, infecciones en genitales y mamas, conjuntivitis, abortos, enfermedades neurológicas y encefalitis (Fenner *et al.*, 1992; Quinn *et al.*, 2002b) (Tabla II). Los herpesvirus constituyen una de las 22 familias de virus que tienen relevancia en clínica veterinaria (Quinn *et al.*, 2002a).

TABLA I. Herpesvirus que afectan a la especie humana

Virus	Afección
Virus Herpes simplex tipo 1 (HHV-1) (HSV-1)	Herpes en orificios nasales, labial y genital. Gingivostomatitis. Conjuntivitis. Queratitis herpética. Proctitis. Esofagitis. Encefalitis. Posible relación con enfermedad de Alzheimer. Sueroprevalencia superior al 80% en algunas poblaciones.
Virus Herpes simplex tipo 2 (HHV-2) (HSV-2)	Herpes genital y anal. Herpes congénito (neonatal). Meningitis. Proctitis. Encefalitis. Asociado a cáncer de cérvix y abortos.
Virus Varicela-zóster (HHV-3) (VZV)	Varicela (exantema vesicular generalizado, fiebre). Síndrome de neuralgia posherpética (Herpes-zóster) en individuos adultos o inmunodeprimidos.
Virus Epstein-Barr (HHV-4)	Mononucleosis infecciosa o "enfermedad del beso" (fiebre, faringitis, linfadenopatía). Infecta el 80-90% de la población adulta mundial (infección benigna en condiciones normales). Contribuye a la tumorigénesis del linfoma de Burkitt y del carcinoma nasofaríngeo. Asociado a algunos linfomas de Hodgkin, carcinomas gástricos, pulmonares y de glándulas salivares.
Citomegalovirus humano (HHV-5) (HCMV)	Enfermedad de inclusión citomegálica. Primera causa de infección viral congénita: <5% de casos presenta hepatosplenomegalia, trombocitopenia, microcefalia, retraso mental, coriorretinitis. Infección posnatal generalmente asintomática, o bien síntomas parecidos a los de la mononucleosis infecciosa. Morbilidad (fiebre, leucopenia, disfunción hepática) y mortalidad (neumonía) de pacientes receptores de trasplantes e individuos inmunodeprimidos.
Virus linfotrópico de células B (HHV-6A) (HHV-6B)	Exantema súbito en niños (<i>roseola infantum</i> o "sexta enfermedad"). Asociado a linfadenitis, hepatitis, esclerosis múltiple y síndrome de fatiga crónica en individuos adultos inmunocompetentes. Encefalitis y neumonitis en individuos inmunosuprimidos. Sueroprevalencia de 60-80% en la mayoría de poblaciones.

TABLA I. (cont.)

Virus	Afección
Herpesvirus humano tipo 7 (HHV-7) (Virus RK)	Exantema y fiebre alta en niños. Infección y síntomas parecidos a los de la mononucleosis infecciosa en adultos. Sueroprevalencia de 60-80% en la mayoría de poblaciones.
Virus asociado al sarcoma de Kaposi (HHV-8) (KSHV)	Sarcoma de Kaposi. Linfoma primario de efusión o derrame. Enfermedad de Castleman.

TABLA II. Herpesvirus que afectan a especies animales

Virus	Afección
Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1)	Síndrome de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), síndrome de la vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV), balanopostitis, conjuntivitis y enfermedad generalizada en terneros.
Herpesvirus bovino tipo 2 (BoHV-2)	Síndrome de la mamilitis bovina (BHM) (ulceración de ubres). Síndrome pseudo-lumpyskin (PLSD) o nodulación de la piel.
Herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5)	Encefalitis y leptomeningitis en terneros.
Herpesvirus porcino tipo 1 (SuHV-1) o Virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV) (PrV)	Enfermedad de Aujeszky (aborto, 100% de mortalidad en lechones, estornudo, tos, vómito, temblor, convulsión, descoordinación). Encefalitis fatal en lechones. Prurito (hasta automutilación) y pseudorabia en hospedadores secundarios.
Herpesvirus alcelaphine tipo 1 (AIHV-1) o Virus de la fiebre catarral maligna (MCF) y Herpesvirus ovino tipo 2 (OvHV-2)	Síndrome de la fiebre catarral maligna (MCF) en ñus, ciervos o ganado (descarga nasal, conjuntivitis, ulceración de mucosa del tracto respiratorio superior, daños neurológicos, diarrea o disentería). Con frecuencia resulta fatal.
Herpesvirus equino tipo 1 (EHV-1)	Aborto. Rinoneumonía equina en potros. Encefalomiелitis. Enfermedad generalizada en potros.
Herpesvirus equino tipo 4 (EHV-4)	Rinoneumonía equina en potros (fiebre, anorexia, flujo nasal seroso o mucopurulento). Bronconeumonía. Aborto.
Herpesvirus equino tipo 3 (EHV-3)	Exantema coital equino (lesiones vesiculares y ulcerativas en vagina, piel del pene, prepucio y región perineal). Proceso generalmente benigno.
Herpesvirus canino tipo 1 (CaHV-1)	Dolor abdominal, anorexia, disnea, flujo vaginal o prepuccial. Lesiones vesiculares en genitales externos, vaginitis o balanopostitis. En cachorros, hemorragia equimótica en riñones, glándulas adrenales y tracto intestinal. Alta mortalidad en cachorros.
Herpesvirus felino tipo 1 (FeHV-1)	Rinotraqueítis felina (fiebre, estornudo, tos, salivación espumosa, descarga oculonasal, disnea, anorexia). Bronconeumonía. Ulceración y queratitis.
Herpesvirus aviar tipo 1 (GaHV-1) o Virus de la laringotraqueítis infecciosa (ILTV)	Laringotraqueítis infecciosa (tos, jadeo, flujo oculonasal, conjuntivitis, expectoración hemorrágica). Alta mortalidad.
Herpesvirus aviar tipo 2 (GaHV-2) o Virus de la enfermedad de Marek (MDV)	Neurolinfomatosis o enfermedad de Marek (parálisis parcial o completa de patas y alas). Linfomatosis ocular. Enfermedad de Marek cutánea.

I.A.1. Características de los herpesvirus

Los virus Herpes simplex (HSV) o *Human herpesvirus 1* y *2* (HHV-1, HHV-2) fueron los primeros herpesvirus humanos descubiertos y actualmente son considerados los virus más estudiados (Roizman & Knipe, 2001). Los HSV son un modelo para el estudio de la translocación de proteínas, de las conexiones sinápticas en el sistema nervioso, de la estructura de las membranas, de la regulación génica, de la terapia génica y de un gran número de problemas asociados a la infección vírica en general. El HHV-1 está considerado la especie tipo de la familia *Herpesviridae* (Minson *et al.*, 2000), y sus características son compartidas por la mayoría de los virus miembros de esta familia. El HHV-1 es el virus de referencia para el estudio de la estructura del virión, la función y nomenclatura de los genes o la transmisión de la infección típicas de todos los herpesvirus (Roizman & Knipe, 2001).

La arquitectura de un virión de herpesvirus es probablemente el rasgo más característico de este conjunto de virus y uno de los primeros tenidos en cuenta a la hora de considerar un virus como miembro de

la familia *Herpesviridae*. La estructura de un virión de herpesvirus es de las mayores y más complejas estudiadas. Un virión de herpesvirus presenta cuatro estructuras morfológicas bien diferenciadas (Fig. 1) (Roizman & Pellett, 2001):

- i) el núcleo o core, de naturaleza nucleoproteica, incluye una molécula de DNA,
- ii) la cápside, o estructura formada por cuatro proteínas dispuestas en un patrón icosaédrico y que encierra el core,
- iii) el tegumento, o conjunto de proteínas de origen vírico que se disponen de manera aparentemente desordenada envolviendo la cápside, y
- iv) la envoltura, o membrana lipídica que envuelve el tegumento y en la que se hallan embebidas diferentes proteínas víricas en su mayoría glicosiladas.

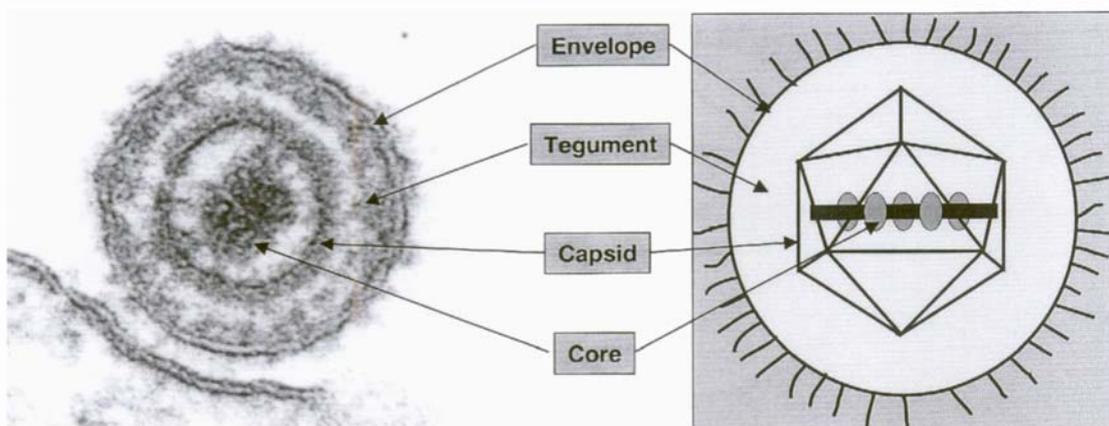


Figura 1. Morfología de un virión de herpesvirus. Los viriones de herpesvirus presentan cuatro estructuras morfológicas diferenciadas. El core interno, compuesto por una molécula lineal de DNA doble-hebra, permanece encerrado en una cápside icosaédrica la cual, a su vez, está rodeada por una capa formada por más de 15 proteínas distintas llamada tegumento. La partícula vírica está rodeada por una envoltura lipídica que contiene proteínas víricas en su mayoría glicosiladas. El virión del herpes está compuesto por más de 30 proteínas distintas. [Imagen y texto tomados de Mettenleiter, 2003]

Todos los herpesvirus comparten además las siguientes características (Roizman & Pellett, 2001):

- v) Codifican enzimas y factores relacionados con la síntesis y el metabolismo de ácidos nucleicos (DNA polimerasa, helicasa, primasa, proteínas de unión al origen de replicación, timidín quinasa, timidilato sintetasa, dUTPasa, ribonucleótido reductasa, etc). Asimismo, todos los herpesvirus codifican al menos una proteasa y un número variable de proteínas quinasas.
- vi) La síntesis de DNA viral y el ensamblaje de la cápside ocurre en el núcleo celular. A su paso por la membrana nuclear interna, la cápside de los herpesvirus adquiere una primera envoltura lipídica que pierde al llegar al citoplasma.
- vii) La producción de la progenie viral va acompañada de la destrucción irreversible de la célula infectada.
- viii) Tras la infección primaria, los herpesvirus establecen una infección latente de por vida en el hospedador natural pudiendo reactivarse periódicamente y dar lugar a brotes clínicos de la enfermedad. Durante esta fase de latencia el DNA viral se encuentra circularizado y la expresión génica está limitada a unos pocos genes.

I.A.1.A. Genoma

Los herpesvirus son virus DNA. Los viriones de herpesvirus contienen una molécula de 100-250 kb de DNA doble hebra lineal. Esta molécula de DNA circulariza tras abandonar la cápside y ser liberada al interior del núcleo de la célula infectada. El contenido en bases G+C (%G+C) del genoma de los herpesvirus oscila entre 32% y 75% (Roizman & Pellett, 2001).

Los herpesvirus codifican entre 70 y 200 genes (Roizman & Pellett, 2001). La mayoría de los genes no requiere 'splicing' de manera que el transcrito primario deviene directamente la molécula de mRNA. Salvo algunas excepciones, cada transcrito viral codifica para una sola proteína. En los herpesvirus es frecuente el solapamiento de genes de modo que la secuencia promotora-reguladora de un gen se halla dentro de la secuencia codificante del gen adyacente en posición 5'. También es frecuente hallar grupos de transcritos (mRNA) co-terminales en 3' que comparten una misma señal de poliadenilación y que no obstante codifican para proteínas distintas. A menudo, las proteínas que codifican los herpesvirus son multifuncionales y las funciones que realiza una misma proteína pueden o no estar relacionadas entre sí. La función que realiza una proteína en un determinado momento puede depender del grado y naturaleza de las modificaciones post-traduccionales, y con frecuencia está condicionada a la interacción con otras proteínas víricas (Roizman & Pellett, 2001).

Actualmente se conoce la secuencia genómica completa de 32 especies de herpesvirus. El análisis comparativo del genoma de las diferentes especies refleja que todos los herpesvirus conservan un grupo de 25-40 genes comunes (Minson *et al.*, 2000; Roizman & Pellett, 2001). Estos genes se denominan genes 'core' y codifican para proteínas de regulación génica, enzimas de metabolismo de nucleótidos, componentes del complejo de replicación del DNA, proteínas de maduración del virión, proteínas de la cápside y algunas proteínas del tegumento y de la envoltura del virión. Los genes 'core' se agrupan en 7 bloques de genes conservados (bloque I a VII), manteniendo un orden y una orientación transcripcional dentro de cada bloque. Por otro lado, estos bloques presentan un orden y una orientación diferente en cada una de las subfamilias que componen la familia *Herpesviridae* (Fig. 2).

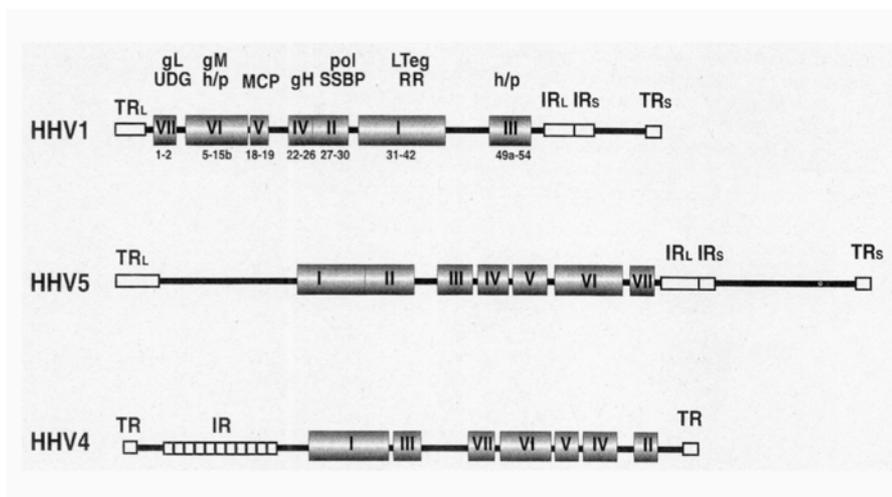


Figura 2. Organización de los bloques de genes conservados en miembros de diferentes subfamilias de herpesvirus. Distribución prototipo del HHV-1 (*Alphaherpesvirinae*), HHV-5 (*Betaherpesvirinae*) y HHV-4 (*Gammapherpesvirinae*). Representación de siete bloques de genes conservados que se identifican por sus números de ORF en la región UL del HHV-1. Se muestran ejemplos de genes en cada bloque. UDG = uracil-DNA glicosilasa; gL, gM, gH = glicoproteínas L, M, H; h/p = subunidad del complejo helicasa-primasa; MCP = proteína principal de la cápside; RR = ribonucleótido reductasa. [Imagen y texto tomados de Minson *et al.*, 2000]

La infección productiva o lítica del HHV-1 conlleva la producción de progenie viral e implica la expresión coordinada de más de 80 genes. Estos genes se expresan en una cascada de regulación altamente

conservada en la familia *Herpesviridae*. Atendiendo al momento y al mecanismo de expresión, los genes del ciclo lítico de los herpesvirus se clasifican en cuatro grupos distintos (Fig. 3) (Roizman & Pellett, 2001):

- i) genes α o inmediatamente-tempranos: se expresan inmediatamente después de la entrada del DNA viral en el núcleo celular, su transcripción no requiere la síntesis *de novo* de proteínas víricas, regulan la expresión génica mediante mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales, y no se conservan en las diferentes subfamilias de herpesvirus.
- ii) genes β (β_1 y β_2) o tempranos: se expresan a continuación de los genes α , su expresión es totalmente independiente de la síntesis de DNA viral, y son los principales responsables de la síntesis de DNA viral y del metabolismo de ácidos nucleicos.
- iii) genes γ_1 o parcialmente tardíos: su expresión aumenta tras la síntesis del DNA viral y codifican para proteínas estructurales del virus.
- iv) genes γ_2 o tardíos: su expresión depende enteramente de la síntesis del DNA viral y también codifican para proteínas estructurales del virus.

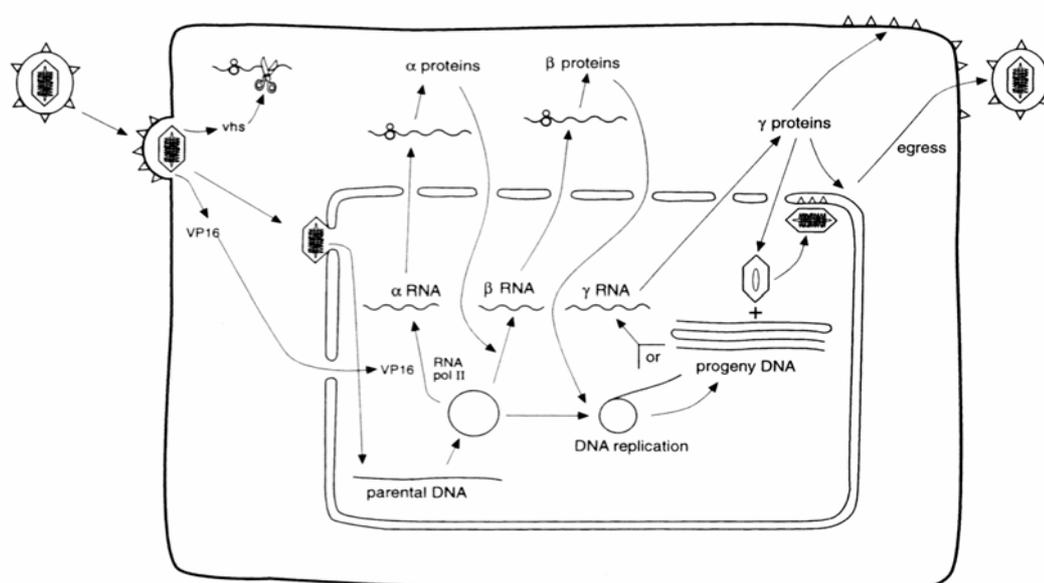


Figura 3. Diagrama del ciclo de replicación del HHV-1. En el extremo superior izquierdo, el virión se une a la membrana plasmática de la célula. Posteriormente, la fusión de la envoltura del virión con la membrana plasmática libera la cápside y las proteínas del tegumento en el citoplasma. La proteína vhs induce la degradación de las moléculas de mRNA celular. La cápside es transportada a los poros nucleares, desde donde inyecta el DNA viral al interior del núcleo. El DNA viral circulariza y es transcrito por la RNA polimerasa II. Esta transcripción, inducida por la proteína del tegumento VP16, conlleva la síntesis de moléculas de mRNA α . Cinco proteínas α , de un total de seis, regulan la expresión de genes víricos en el núcleo. Estas proteínas activan en 'trans' la transcripción de genes β . Las proteínas β están implicadas en la replicación del DNA viral. La síntesis de DNA viral induce la expresión de genes γ . Las proteínas γ están implicadas en el ensamblaje de la cápside en el interior del núcleo y en la modificación de las membranas para la formación de los viriones. Las cápsides formadas alcanzan el espacio perinuclear y pasan al citoplasma. Las cápsides adquieren la envoltura en la red de secreción del complejo de Golgi. Los viriones salen de la célula infectada. [Imagen y texto tomados de Roizman & Knipe, 2001]

Aparte de la infección lítica o productiva, los herpesvirus también pueden desarrollar una infección no productiva o de latencia en el organismo hospedador (Roizman & Knipe, 2001). Durante esta fase se da la expresión de un tipo de genes diferentes que regulan a la baja ('down regulate') la expresión de los genes del ciclo lítico y evitan la entrada en apoptosis de la célula infectada. El producto de los genes de latencia son transcritos de RNA (LAT, de 'latency-associated transcript' o LR, de 'latency-related') que actúan bien como mRNA antisentido de genes α o tienen una función estructural similar a la del rRNA (Jones, 2003; Ciacci-

Zanella *et al.*, 1999; Geiser *et al.*, 2002; Ahmed & Fraser, 2001). Una parte de los transcritos LR son además traducidos a proteínas que interfieren con los componentes reguladores del ciclo celular (Jiang *et al.*, 1998). Por otro lado, los genes LAT y LR también son necesarios para la reactivación de los herpesvirus de la fase de latencia.

Los genes de los herpesvirus también han sido clasificados como 'esenciales' o 'no esenciales' (Post & Roizman, 1981; Longnecker & Roizman, 1986; Longnecker *et al.*, 1987). Tradicionalmente, un gen 'esencial' era aquél que resultaba imprescindible para la proliferación efectiva del virus en un cultivo celular. Por el contrario, un gen 'no esencial' era aquél que era prescindible para la producción del virus en un cultivo celular. El concepto de esencialidad de un gen surgió durante el cartografiado de los genes del HHV-1 y la identificación de sus funciones (Stow *et al.*, 1978; Ruyechan *et al.*, 1979). Esta tarea se basó en la obtención de virus HHV-1 mutantes para cada uno de los genes, y en la caracterización fenotípica de estos virus en cultivos celulares. El genoma del HHV-1 contiene como mínimo 86 genes de los cuales 47 han resultado ser prescindibles, no esenciales, para la producción del virus *in vitro* (Roizman & Knipe, 2001). Los genes no esenciales de los herpesvirus pertenecen a distintos grupos funcionales y están implicados en la entrada del virus en la célula, en la regulación de la expresión génica, en la modificación post-traducciona de proteínas, en la exocitosis, en la inhibición de la respuesta del organismo infectado frente a la infección y en la transmisión del virus 'célula-a-célula' (la que se da a través de la superficie de contacto entre dos células). La identificación de genes en un número cada vez mayor de herpesvirus ha constatado, sin embargo, que los genes esenciales y no esenciales no lo son en todos los contextos posibles. Así pues, el término 'esencial' es ante todo arbitrario y debe ser referido siempre al virus origen del gen y al tipo celular infectado. Cabe subrayar que el término gen 'esencial' o 'no esencial' nace del cultivo *in vitro* del virus, y nada tiene que ver con la necesidad real del gen para la replicación del virus en el hospedador natural infectado *in vivo*. De hecho, la mayoría de los genes no esenciales de los herpesvirus codifican funciones indispensables para la replicación *in vivo* y la reactivación del estado de latencia en el hospedador natural. Prueba de ello es que salvo pocas excepciones, nunca se ha podido aislar un virus mutante en un gen no esencial a partir de un hospedador natural infectado. Actualmente se dice que un gen es 'esencial' cuando es necesario para el crecimiento/producción en unas condiciones particulares, mientras que aquéllos que no son necesarios se dice que son 'no esenciales' (Condit, 2001).

El genoma de los herpesvirus se caracteriza por la presencia de secuencias de DNA repetidas (Roizman & Pellett, 2001). El tamaño y la ordenación de estas secuencias a lo largo de la molécula de DNA permite clasificar las especies de herpesvirus en 6 grupos distintos (tipo A a F) (Fig. 4). La presencia de secuencias repetidas conlleva además la aparición de isómeros genómicos por la recombinación entre sí de estas secuencias. Por otro lado, el número de repeticiones de una misma secuencia puede variar entre dos herpesvirus miembros de una misma especie contribuyendo así al polimorfismo del tamaño de la molécula de DNA de la especie.

La replicación del genoma de los herpesvirus tiene lugar por el mecanismo del círculo rodante ('rolling-circle'). Este mecanismo conlleva la síntesis de moléculas de DNA concataméricas en las que se suceden múltiples copias del genoma del virus. Posteriormente, cada copia formada se escinde del concatámero y se empaqueta en cápsides víricas formadas *de novo* gracias a la presencia de señales de empaquetamiento en los extremos de cada molécula escindida. Inicialmente, se propuso que la disposición del DNA dentro del core de los herpesvirus seguía un modelo de toroide alrededor de una estructura cilíndrica posiblemente

proteica (Furlong *et al.*, 1972). Posteriormente, se ha postulado que el DNA de los herpesvirus se empaqueta en el interior de la cápside según el modelo del “carrete” (Catalano *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1999b) —similar a como se halla en bacteriófagos de DNA doble hebra (Earnshaw & Harrison, 1977; Earnshaw *et al.*, 1978)—, y probablemente en un estado de cristal líquido (Booy *et al.*, 1991; Cerritelli *et al.*, 1997). Este modelo coincide en varios aspectos con el modelo de organización toroidal propuesto inicialmente pero, a diferencia de los bacteriófagos, los herpesvirus no parecen tener ninguna estructura proteica central alrededor de la cual se dispone el genoma (Rixon, 1993; Zhou *et al.*, 1999b).

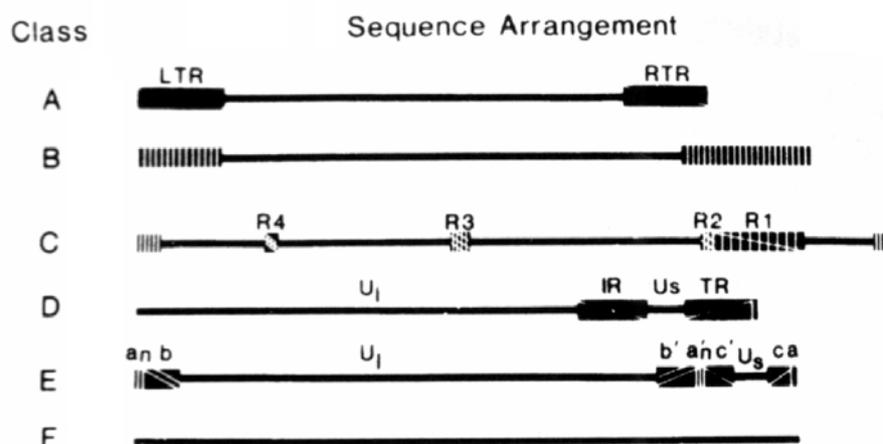


Figura 4. Diagrama esquemático de la distribución de secuencias en los seis tipos de genomas de los herpesvirus. Los genomas A, B, C, D, E y F están representados por el IçHV-1, SaHV-2, HHV-4, HHV-3, HHV-1 y TuHV-1, respectivamente. Las líneas horizontales representan regiones únicas o casi únicas. Los rectángulos representan regiones repetidas. Las regiones únicas UL y US de los tipos D y E pueden invertir su orientación. [Imagen y texto tomados de Roizman & Pellet, 2001]

I.A.1.B. Cápside

La cápside de los herpesvirus es una estructura proteica de 100-125 nm de diámetro que encierra el genoma del virus. La estructura que forman la cápside y el genoma recibe el nombre de nucleocápside. La cápside de los herpesvirus se ensambla en el núcleo de la célula infectada, donde también tiene lugar el empaquetamiento de la molécula de DNA (Rixon, 1993; Steven & Spear, 1997). Los genes que codifican para las proteínas de la cápside son genes γ_1 y γ_2 y constituyen un grupo de genes muy conservado en la familia *Herpesviridae* (Hannenhalli *et al.*, 1995; Montague & Hutchison, 2000; Roizman & Pellett, 2001).

En una célula infectada por HHV-1 se han descrito hasta 3 tipos de cápside: A, B y C (Gibson & Roizman, 1972; Rixon, 1993). La cápside A corresponde a una cápside ensamblada que no contiene DNA. La cápside B equivale a la cápside A con dos proteínas adicionales (VP22a y VP21) que forman parte del esqueleto interno durante el ensamblaje de la cápside (Prevelige Jr. & King, 1993; Prevelige Jr. *et al.*, 1993; Thomsen *et al.*, 1995). La cápside C presenta la composición de proteínas de la cápside A y contiene además el DNA viral. Se cree que la cápside A es una partícula abortiva (Sherman & Bachenheimer, 1988) que se forma a partir de una cápside B por pérdida de las proteínas VP22a y VP21 o bien a partir de una cápside C por pérdida prematura del DNA viral (Perdue *et al.*, 1976; Newcomb & Brown, 1994).

Recientemente se ha resuelto la estructura tridimensional del virión intacto de HHV-1 mediante criomicroscopía electrónica y reconstrucción de imágenes por ordenador a una resolución de 8.5 Å (Zhou *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 2000). La cápside de HHV-1 muestra un patrón icosaédrico T=16 (Fig. 5A), y está formada por 150 capsómeros hexaméricos (hexones) que forman las caras y bordes de cada uno de los 20

triángulos del icosaedro, 12 capsómeros pentaméricos (pentones) dispuestos en los vértices y 320 complejos heterotriméricos (triplexes) que forman las uniones intercapsoméricas. La cápside del HHV-1 está formada por cuatro proteínas principales (VP5, VP26, VP23 y VP19C) que se ensamblan gracias a un esqueleto interno formado por VP22a, VP21 y VP24 (Thomsen *et al.*, 1995). VP5 (UL19) es la proteína mayor de la cápside (149 kDa) y forma complejos cilíndricos de 5 y 6 monómeros dando lugar a pentones y hexones, respectivamente (Newcomb & Brown, 1991; Newcomb *et al.*, 1993). VP26 (UL35) es la proteína menor de la cápside (12 kDa) y se dispone en grupos de 6 coronando los hexones. Los pentones, por el contrario, unen la proteína del tegumento VP1-3 (UL36) de 336 kDa (McNabb & Courtney, 1992; Zhou *et al.*, 1999b; Ojala *et al.*, 2000; Desai, 2000; Bowman *et al.*, 2003). Los triplexes están formados por 2 unidades de VP23 (UL18) de 34 kDa y 1 unidad de VP19C (UL38) de 50 kDa (Spencer *et al.*, 1998). Recientemente se ha resuelto la estructura de VP5 y se ha observado que tiene una disposición distinta según si forma pentones o hexones (Bowman *et al.*, 2003). Unos y otros ocupan un volumen casi equivalente y abren en su interior un poro o canal transcapsomérico. La disposición diferente de VP5 en pentones y hexones habilita la unión de VP1-3 o VP26, respectivamente, e implica una distribución de carga desigual que confiere un carácter muy ácido al canal del hexón y básico al canal del pentón (Fig. 5B,C). La función que se reserva al canal transcapsomérico del pentón es la de puerta de salida de las proteínas VP22a y VP21 durante el empaquetamiento del DNA en la morfogénesis de la cápside C de la progenie viral (Bowman *et al.*, 2003; Rixon, 1993). Por otro lado, estudios recientes indican que el DNA viral no entra en la cápside a través de los canales transcapsoméricos sino a través de un complejo portal formado por la proteína UL6 y situado en un vértice único de la cápside (Newcomb & Brown, 1994; Newcomb *et al.*, 2001). La existencia de un complejo portal en la cápside de los herpesvirus similar al que existe en la cápside de los bacteriófagos de DNA doble hebra constituye un nuevo paralelismo entre los dos tipos de virus (Simpson *et al.*, 2000; Tao *et al.*, 1998; Valpuesta & Carrascosa, 1994).

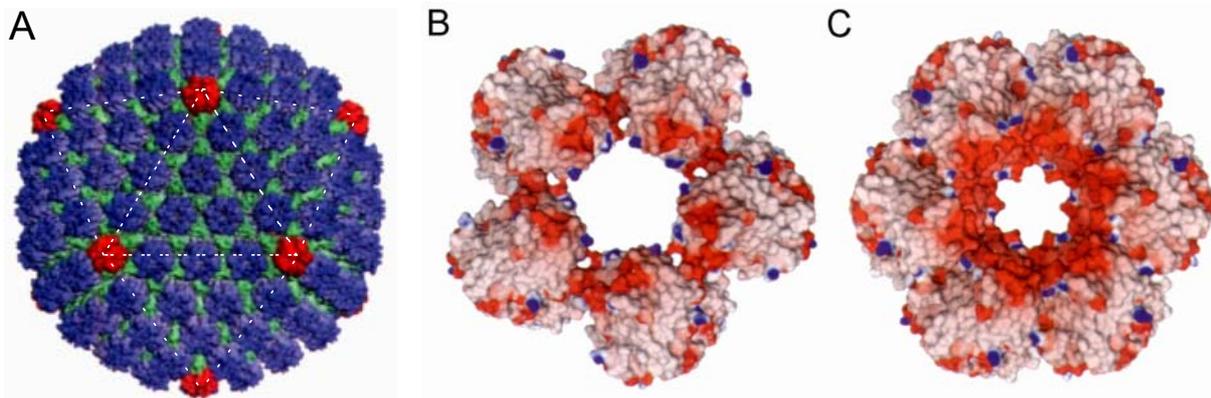


Figura 5. (A) Modelo de la cápside T=16 de un virión de HHV-1 formada por 12 pentones (rojo), 150 hexones (azul) y 320 triplexes (verde). Las líneas de puntos blancas dibujan cuatro triángulos del icosaedro. (B y C) Potencial electrostático de superficie de VP5 en un pentón y un hexón, respectivamente. La coloración azul indica carácter básico mientras que la coloración roja representa un carácter ácido. [A, imagen tomada de Zhou *et al.*, 2000; B y C, imágenes tomadas de Bowman *et al.*, 2003]

I.A.1.C. Tegumento

El tegumento es el elemento estructural más complejo de un virión de herpesvirus. Está formado por un conjunto muy heterogéneo de proteínas tanto por su composición como por las funciones que realizan. En

general, las proteínas que forman el tegumento están codificadas por genes α y genes γ , y están poco conservadas entre las diferentes especies de herpesvirus (Montague & Hutchison, 2000; Mettenleiter, 2002).

La función del tegumento propiamente dicho es doble. La primera función es aportar una serie de factores o proteínas al citosol de la célula infectada para facilitar el inicio y desarrollo del ciclo de infección. Las funciones de estas proteínas pueden ser:

- i) regular la expresión de genes virales y de la célula hospedadora en las distintas etapas de la infección (Batterson & Roizman, 1983; van Drunen Littel-van den Hurk *et al.*, 1995; Ren *et al.*, 2001; Roller & Roizman, 1992; Gopinath *et al.*, 2002; Koppers-Lalic *et al.*, 2001),
- ii) participar en el transporte de la cápside a través de la célula (Sodeik *et al.*, 1997),
- iii) intervenir en la inserción del DNA viral en el núcleo celular (Batterson *et al.*, 1983; Zhou *et al.*, 1999b),
- iv) contribuir al encapsidamiento del DNA viral de la progenie (Chou & Roizman, 1989; Salmon *et al.*, 1998) o
- v) participar en la salida del virión de la célula huésped (Baines & Roizman, 1992; Cunningham *et al.*, 2000; Desai, 2000).

La segunda función del tegumento es estructural, pues mantiene unidos estos factores y constituye la base para la formación de la envoltura en los viriones producidos *de novo* (Desai, 2000; Fuchs *et al.*, 2002b).

El tegumento del virión de HHV-1 contiene como mínimo 17 proteínas: UL11, UL13, UL14, UL21, VP1-3, UL37, vhs ('virion host shut-off' o UL41), UL46, UL47, α -TIF (UL48), VP22 (UL49), UL51, ICP0, ICP4, US3, US10 y US11 (Mettenleiter, 2002). Estas proteínas se disponen interaccionando unas con otras formando un intrincado complejo que une la cápside con los dominios citoplasmáticos de las glicoproteínas de la envoltura. Se ha observado que la proteína α -TIF interacciona con VP22 (Elliott *et al.*, 1995) y vhs (Smibert *et al.*, 1994), y quizás también con UL46 y UL47 (Zhang *et al.*, 1991) y con las glicoproteínas B, D y H de la envoltura (Zhu & Courtney, 1994). Las proteínas mayoritarias del tegumento (UL46, UL47, α -TIF y VP22) muestran además una cierta flexibilidad en su proporción relativa individual de manera que la deficiencia de una se suple con un exceso de otra (Leslie *et al.*, 1996; Zhang & McKnight, 1993; Pomeranz & Blaho, 2000). Por otro lado, no todas las proteínas del tegumento son necesarias por igual para una correcta morfogénesis de los herpesvirus. Así, mientras que las proteínas VP1-3, UL37 y α -TIF son imprescindibles para la morfogénesis de viriones HHV-1 y SuHV-1 (Desai, 2000; Desai *et al.*, 2001; Mossman *et al.*, 2000; Fuchs *et al.*, 2002a), otras como US3, UL13, vhs, UL46, UL47 y VP22 pueden faltar sin por ello verse afectada sensiblemente la estructura del virión (Purves *et al.*, 1987; Pomeranz & Blaho, 2000; Roizman & Knipe, 2001), dando a entender que muchas de las interacciones que se dan entre ellas son redundantes. Tradicionalmente, y como consecuencia de esta heterogeneidad de proteínas e interacciones, el tegumento de los herpesvirus se ha descrito como un componente amorfo y en ocasiones asimétrico que se dispone sin estructura aparente envolviendo la nucleocápside vírica (Roizman & Furlong, 1974). Recientes estudios indican sin embargo que al menos la proteína VP1-3 exhibe cierta simetría icosaédrica debido a su interacción con VP5 en los pentones de la cápside (Zhou *et al.*, 1999b). También se ha observado que la proteína UL37 del SuHV-1 interacciona con VP1-3 pudiendo llegar a constituir una segunda capa de recubrimiento de la cápside en el tegumento del virión (Klupp *et al.*, 2002).

I.A.1.D. Envoltura

La envoltura de un virión de herpesvirus es una bicapa lipídica que deriva del aparato de secreción celular y en la que se hallan integradas distintas proteínas, en su mayoría glicoproteínas, de origen vírico (Spear, 1993b; Steven & Spear, 1997). Estas glicoproteínas son con toda probabilidad las proteínas más estudiadas de los herpesvirus y constituyen un elemento fundamental de la envoltura, pues desempeñan funciones básicas de interacción entre el virus y el organismo hospedador. Las glicoproteínas son necesarias en el reconocimiento, unión, penetración, salida y transmisión ‘célula-a-célula’ del virión en células susceptibles a la infección (Spear, 1993b; Mettenleiter, 2003), en la modulación de la respuesta inmune celular (Dubin *et al.*, 1991; Favoreel *et al.*, 1997; Lubinski *et al.*, 2002; Bryant *et al.*, 2003) o en la adhesión de células entre sí (Spear, 1993a; Dingwell & Johnson, 1998; Nakamichi *et al.*, 2002). Por otro lado, las glicoproteínas de la envoltura constituyen la diana de la respuesta inmune innata y adquirida (humoral y celular) del organismo infectado frente al herpesvirus.

La envoltura de un virión de HHV-1 contiene un mínimo de 14 proteínas, 12 de las cuales son glicoproteínas (Roizman & Knipe, 2001; Mettenleiter, 2002). Las glicoproteínas B, C, D, E, G, H, I, J y N son proteínas de membrana tipo I, mientras que las glicoproteínas K y M son proteínas integrales de membrana. A diferencia de las anteriores, la glicoproteína L no presenta ningún dominio de asociación a membrana (Hutchinson *et al.*, 1992a). Algunas glicoproteínas forman complejos heterodiméricos (H/L, E/I y M/N), homodiméricos (B/B o N/N) o heterotriméricos (M/N/N). Paradójicamente, no todas las glicoproteínas presentan glicosilaciones. La glicoproteína N, p.e., sí está glicosilada en el SuHV-1 –especie en la que fue descrita por primera vez– pero no así en el BoHV-1. Algunas glicoproteínas se caracterizan además por presentar fosforilaciones. La envoltura de los herpesvirus también contiene proteínas integrales de membrana no glicosiladas tales como UL20, UL45 y US9. Éstas están implicadas respectivamente en la ubicación de la glicoproteína K en la envoltura vírica (Foster *et al.*, 2003), en la fusión de membranas y en la localización axonal de las glicoproteínas víricas para su transporte a las sinapsis neuronales (Tomishima & Enquist, 2001; Enquist *et al.*, 2002).

Las glicoproteínas de la envoltura de los herpesvirus están codificadas por genes γ , y entre ellos podemos distinguir algunos genes ‘esenciales’ y otros ‘no esenciales’. Las glicoproteínas B, D, H, L y K están codificadas por genes esenciales, y son por tanto proteínas esenciales, en todos los herpesvirus. Éstas participan básicamente en la unión y fusión de los herpesvirus con la célula diana. Por el contrario, las glicoproteínas C, E, G, I, J, M y N son no esenciales y participan en la unión de los herpesvirus con la célula diana, en la modulación de la respuesta inmunitaria del hospedador, en la morfogénesis de los viriones o en la señalización de la ruta celular de transmisión de la infección. Las glicoproteínas no esenciales son, por otro lado, el mejor ejemplo de cuán impreciso es calificar como no esenciales un conjunto de genes y de proteínas a partir de un estudio de cultivo *in vitro* en el que las células utilizadas no son representativas de aquéllas que el herpesvirus infecta *in vivo*. La glicoproteína E, por ejemplo, es no esencial para la transmisión ‘célula-a-célula’ de un virus mutante HHV-1 gE⁻ cuando éste infecta un cultivo de células no polarizadas HeLa o HEP-2, y en cambio sí es esencial cuando el virus infecta un cultivo de células polarizadas altamente comunicadas entre sí, tales como las neuronas o queratinocitos humanos HaCaT (Wisner *et al.*, 2000). Cabe señalar también que las glicoproteínas no esenciales no lo son para todos los herpesvirus por igual, y así la glicoproteína E es no esencial para el crecimiento *in vitro* del HHV-1 (Longnecker & Roizman, 1986;

Neidhardt *et al.*, 1987) o del BoHV-1 (Rebordosa *et al.*, 1996), y en cambio sí es esencial para el crecimiento del GaHV-2 (Schumacher *et al.*, 2001).

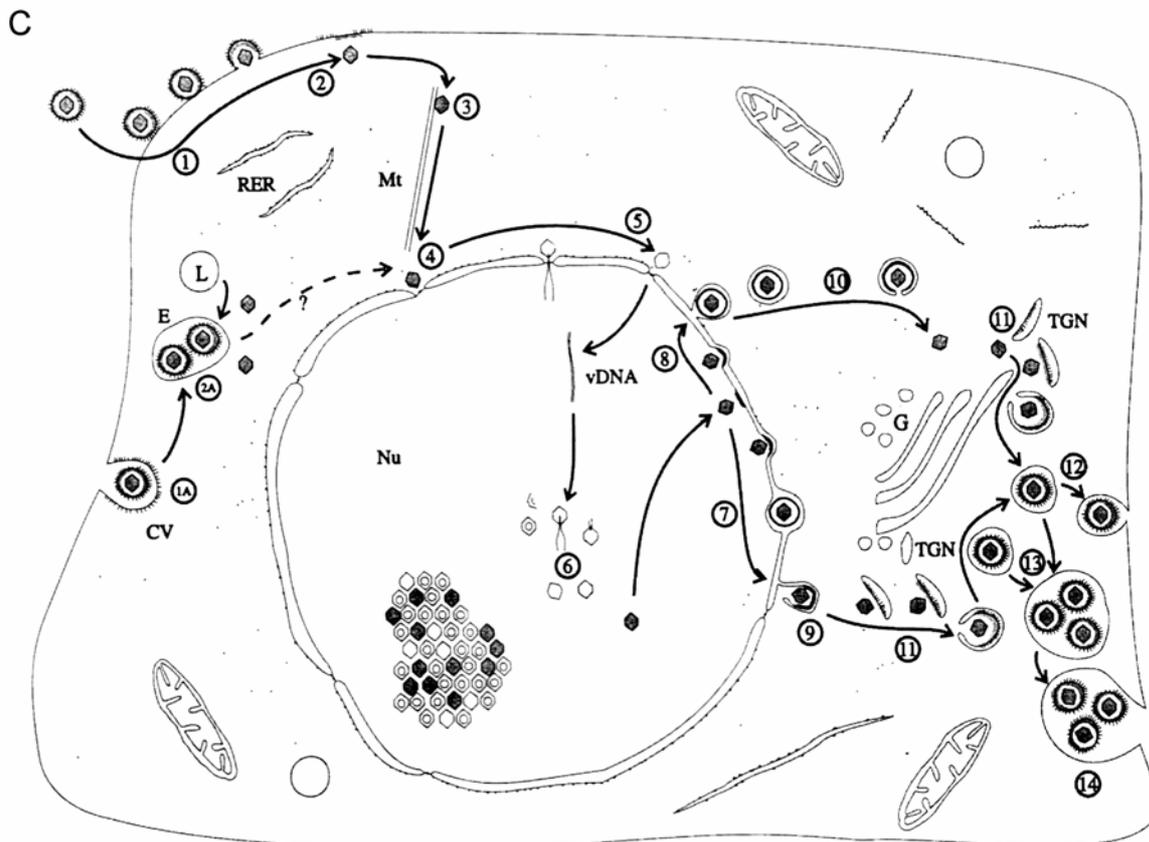
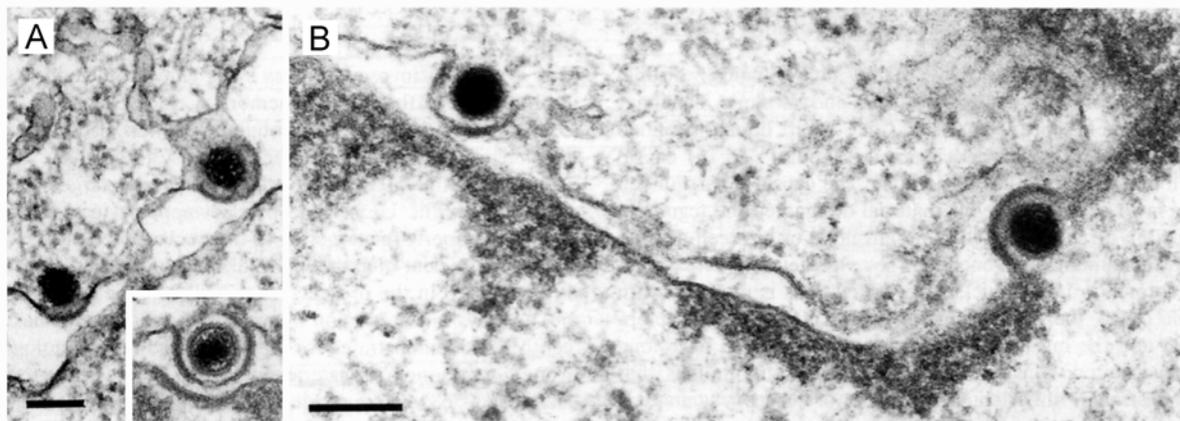
I.A.2. Morfogénesis de los herpesvirus

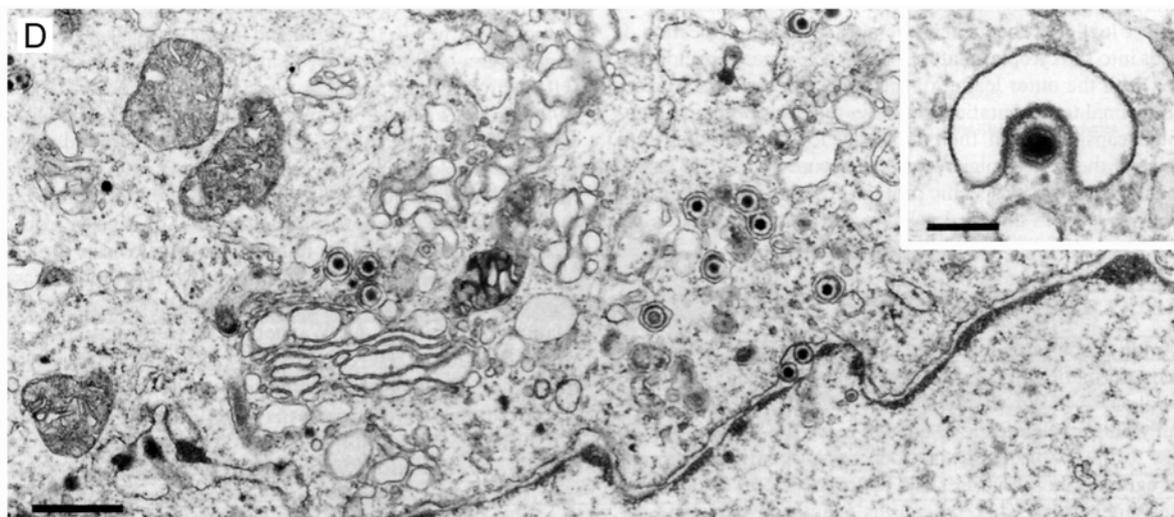
La replicación de todo virus consiste en la síntesis de nuevas partículas víricas y, en el caso de los herpesvirus, implica la síntesis y ensamblaje de los cuatro elementos estructurales que componen un virión: core, cápside, tegumento y envoltura.

El ensamblaje y salida de un virión de herpesvirus de la célula es un proceso que se da en varias etapas, estudiadas desde hace mucho tiempo y revisadas recientemente por algunos autores (Rixon, 1993; Mettenleiter, 2002). En el núcleo de la célula infectada se da la transcripción del genoma del virus, la replicación de su DNA, el ensamblaje de cápsides nuevas y el empaquetamiento del DNA viral en las cápsides sintetizadas *de novo*. Las nucleocápsides formadas en el núcleo celular salen mediante vesiculación de la membrana nuclear interna y se sitúan en el espacio perinuclear (Fig. 6A). En esta etapa la nucleocápside adquiere una estructura de virión perinuclear con un tegumento y una envoltura que contienen, respectivamente, la fosfoproteína nuclear UL31 (Chang & Roizman, 1993) y la proteína de membrana UL34 (Klupp *et al.*, 2000; Shiba *et al.*, 2000). Ambas proteínas interactúan formando un complejo indispensable para la salida de las nucleocápsides del HHV-1 y SuHV-1 del núcleo de la célula infectada (Klupp *et al.*, 2000; Fuchs *et al.*, 2002c; Reynolds *et al.*, 2001).

A partir del estado de virión perinuclear existen diferentes modelos que tratan de explicar cómo la nucleocápside vírica gana el medio extracelular. Un primer modelo sostiene que el virión perinuclear es el definitivo y que es transportado en el interior de vesículas hacia la superficie celular, siguiendo una ruta de secreción similar a la de las enzimas lisosómicas (Darlington & Moss, 1968; Johnson & Spear, 1982; Torrisi *et al.*, 1992; Wild *et al.*, 2002). Por el contrario, el modelo más reciente sostiene que el virión perinuclear es un virión 'primario' inmaduro que acaba fusionando su envoltura con la membrana nuclear externa, volcando así la nucleocápside vírica en el citoplasma celular (Fig. 6B) (Whealy *et al.*, 1991; Whiteley *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Enquist *et al.*, 1998; Mettenleiter, 2002). Según este segundo modelo, la nucleocápside pierde el tegumento y la envoltura nucleares al salir del núcleo, y adquiere un tegumento y una envoltura nuevos en su tránsito hacia la membrana plasmática (Fig. 6C,D). Sucede, sin embargo, que el virión perinuclear se puede hallar libre en el citoplasma en el interior de vesículas derivadas de la membrana nuclear externa (Fig. 6C) (Granzow *et al.*, 1997). Muy probablemente, este hecho llevó a interpretar que estas vesículas eran de transporte y, en consecuencia, que el virión ensamblado perinuclear era ya maduro y definitivo. Algunos estudios prueban directamente la participación de las proteínas UL34 y US3 en la fusión de la envoltura primaria del virión perinuclear y la membrana nuclear externa (Wagenaar *et al.*, 1995; Klupp *et al.*, 2001a). Otros resultados obtenidos mediante microscopía electrónica (Gershon *et al.*, 1994; Granzow *et al.*, 1997; Granzow *et al.*, 2001; Roffman *et al.*, 1990; Browne *et al.*, 1996; Skepper *et al.*, 2001), inmunomicroscopía electrónica (Klupp *et al.*, 2000; Kopp *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 1999), microscopía inmunofluorescente (Alconada *et al.*, 1999) y análisis bioquímico de las membranas nuclear y vírica (van Genderen *et al.*, 1994) aportan pruebas muy convincentes de que la morfogénesis de los herpesvirus implica la adquisición de un tegumento y una envoltura de origen citoplasmático.

El tegumento de los herpesvirus se construye de manera progresiva en diferentes etapas de la morfogénesis del virión. Algunas proteínas se asocian sobre la nucleocápside cuando todavía está en el núcleo de la célula (Ward *et al.*, 1996; Morrison *et al.*, 1998), cuando sale del núcleo celular (Ward *et al.*, 1996), o mientras transita desde el núcleo hasta la membrana plasmática (Mettenleiter, 2002). Otras proteínas, como por ejemplo la UL49 del SuHV-1, interaccionan con los dominios citoplasmáticos de las glicoproteínas E/I y M localizadas en las vesículas de la red de secreción del complejo de Golgi más distal (TGN, de 'trans-Golgi network') (Fuchs *et al.*, 2002b). La acumulación de proteínas en ambas partes sugiere que el tegumento de los herpesvirus se construye en realidad en dos frentes distintos: uno sobre las proteínas del tegumento UL36 y UL37 que interaccionan más directamente con la nucleocápside, y otro en la membrana que acabará formando la envoltura del virión (Wang *et al.*, 2001; Mettenleiter, 2002).





▲
 ◀ **Figura 6.** (Páginas 20-21) **(A)** Imagen de microscopía electrónica que refleja la vesiculación de nucleocápsides del HHV-1 en la membrana nuclear interna durante su salida del núcleo. **(B)** Vesiculación en la membrana nuclear interna y fusión con la membrana nuclear externa durante la salida del núcleo de dos nucleocápsides del HHV-1. **(C)** Diagrama de las etapas de replicación del SuHV-1 en un cultivo celular. Están representados la vesícula de entrada (CV), endosoma (E), complejo de Golgi (G), lisosoma (L), microtúbulo (Mt), núcleo (Nu), retículo endoplasmático rugoso (RER), complejo de Golgi distal (TGN) y DNA viral (vDNA). Las flechas indican la ruta de los viriones que se deduce de las observaciones hechas mediante microscopía electrónica. **(D)** Visión general de la morfogénesis del HHV-1 en el citoplasma. La vesiculación de las nucleocápsides en el citoplasma conlleva la formación de viriones maduros en el interior de vesículas de exocitosis. (Barras, 150 nm en **A**, **B** y detalle de **D**, 750 nm en **D**). [**A** y **D**, imágenes y texto tomados de [Mettenleiter, 2002](#); **B**, imagen tomada de [Granzow et al., 2001](#); **C**, imagen y texto tomados de [Granzow et al., 1997](#)]

La formación de la envoltura es la etapa final en el ensamblaje del virión y consiste en combinar nucleocápside, tegumento y envoltura en el TGN (Fig. 6D) ([Whiteley et al., 1999](#); [Wang et al., 2001](#); [Enquist et al., 1998](#); [Mettenleiter, 2002](#)). Las vesículas del TGN adquieren una forma de “C” en la que se distingue una superficie cóncava y otra convexa debido a la acumulación de proteínas del tegumento en la cara citosólica de la superficie cóncava ([Wang et al., 2001](#)). En esta superficie, las proteínas interactúan por un lado con los dominios citoplasmáticos de las glicoproteínas víricas situadas en la membrana de la vesícula ([Zhu & Courtney, 1994](#); [Fuchs et al., 2002b](#); [Wang et al., 2001](#)) y por otro con las proteínas del tegumento que rodean la nucleocápside ([Klupp et al., 2001b](#); [Elliott et al., 1995](#); [Fuchs et al., 2002a](#); [Kopp et al., 2002](#); [Bechtel & Shenk, 2002](#)). Los “brazos” de la vesícula envuelven la nucleocápside y finalmente se fusionan dando lugar a dos estructuras membranosas cerradas. La estructura interna constituye el virión de herpesvirus ensamblado mientras que la externa corresponde a una vesícula de transporte ([Wang et al., 2001](#); [Mettenleiter, 2002](#)). Posteriormente, esta vesícula de transporte se fusionará con la membrana plasmática y liberará el virión maduro de herpesvirus en el medio extracelular.

I.A.3. Clasificación de los herpesvirus

En 1981 el ‘Herpesvirus Study Group’ de la ICTV propuso la subdivisión de la familia *Herpesviridae* en subfamilias basándose en los siguientes criterios: el rango de hospedador, la duración del ciclo de reproducción, la citopatología y las características de la infección latente. En la actualidad la familia *Herpesviridae* está subdividida en tres subfamilias (*Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y

Gammaherpesvirinae) que agrupan un total de 9 géneros distintos (Minson *et al.*, 2000) (Tabla III). Existe un décimo género de herpesvirus que afecta a peces y que todavía no ha sido asignado a ninguna de las tres subfamilias reconocidas por la ICTV. Esta división taxonómica ha sido validada mediante estudios filogenéticos moleculares y de patología de las diferentes especies virales en los huéspedes naturales (McGeoch *et al.*, 1995; McGeoch & Davison, 1999; McGeoch *et al.*, 2000).

TABLA III. Subfamilias de la familia *Herpesviridae*

Subfamilia	Género	Especie (hospedador)
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Varicellovirus</i>	HHV-3 (humano) BoHV-1, BoHV-5, SuHV-1, EHV-1, EHV-3, EHV-4, CaHV-1, FeHV-1 (animal)
	<i>Simplexvirus</i>	HHV-1, HHV-2 (humano) BoHV-2 (animal)
	<i>Marek's disease-like viruses</i>	GaHV-2 (animal)
	<i>Infectious laryngotracheitis-like viruses</i>	GaHV-1 (animal)
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	HHV-5 (humano)
	<i>Muromegalovirus</i>	
	<i>Roseolovirus</i>	HHV-6A, HHV-6B, HHV-7 (humano)
<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Rhadinovirus</i>	HHV-8 (humano) OvHV-2, AIHV-1 (animal)
	<i>Lymphocryptovirus</i>	HHV-4 (humano)
	<i>Ictalurid herpes-like viruses</i>	IcHV-1 (animal)

Las especies que pertenecen a cada una de las subfamilias de herpesvirus presentan las siguientes características (Roizman & Pellett, 2001; Quinn *et al.*, 2002b):

Subfamilia *Alphaherpesvirinae*,

- i) presentan un rango de especificidad de hospedador (principalmente especies de mamíferos y aves) variable,
- ii) infectan células epiteliales *in vivo* e *in vitro*,
- iii) infectan fibroblastos *in vitro*,
- iv) tienen un ciclo de infección productivo corto y citolítico, y
- v) son neurotrópicos, pues establecen infecciones latentes en ganglios sensoriales y neuronas.

Subfamilia *Betaherpesvirinae*,

- i) tienen un rango de especificidad de hospedador (principalmente especies de mamíferos) estrecho,
- ii) muestran especificidad por un tipo celular *in vitro*,
- iii) tienen un ciclo de infección lento,
- iv) inducen citomegalia y permanecen asociados a las células, y
- v) establecen latencia en células linforeticulares (monocitos), linfocitos T y en glándulas secretoras como el riñón u otros tejidos.

Subfamilia *Gammaherpesvirinae*,

- i) presentan un rango de hospedador restringido a la familia u orden al que pertenece el hospedador natural,
- ii) son específicos de linfocitos B o T,
- iii) infectan células linfoblastoides *in vitro* y algunos incluso causan infecciones líticas en ciertas células epiteliales y fibroblásticas,
- iv) establecen cultivos portadores en los que sólo una parte de células muestran una infección productiva,
- v) inducen la transformación neoplásica de linfocitos que no llegan a producir progenie infectiva, y
- vi) establecen latencia en tejidos linfoides.

I.B. El herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1)

El BoHV-1 es un virus que pertenece al género *Varicellovirus* dentro de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* (Minson *et al.*, 2000). El BoHV-1 tiene una distribución mundial con excepción de algunos países europeos donde se han iniciado programas de erradicación. Comparado con otros alphaherpesvirus, el BoHV-1 presenta un rango de hospedador específico particularmente estrecho: el ganado vacuno. El BoHV-1 también puede infectar cabras, cerdos, conejos y búfalos de río, pero se desconoce el significado epidemiológico de estas especies (Kahrs, 2001c). El BoHV-1 no resulta patógeno para el hombre.

El BoHV-1 está considerado el agente etiológico más importante del cuadro de enfermedades respiratorias bovinas o BRD ('bovine respiratory diseases') (Kahrs, 2001a). Únicamente en los EEUU el BRD supone un coste de más de 600 millones de dólares anuales (Bowland & Shewen, 2000). El BoHV-1 es el responsable del síndrome IBR, el síndrome IPV, la infección sistémica en terneros recién nacidos, conjuntivitis, enteritis, abortos, encefalitis, neumonía e inmunosupresión (Kahrs, 2001c; Fenner *et al.*, 1992). La infección por BoHV-1 conlleva la represión de la expresión de las proteínas del complejo de histocompatibilidad MHC I y del mecanismo de transporte asociado a la presentación de antígeno evitando así el reconocimiento por parte de los linfocitos citotóxicos CD8+ y células NK de las células infectadas (Gopinath *et al.*, 2002; Orange *et al.*, 2002; Nataraj *et al.*, 1997; Hinkley *et al.*, 1998). Asimismo, el BoHV-1 infecta e induce la apoptosis de los linfocitos CD4+ durante la infección aguda en terneros (Winkler *et al.*, 1999). Esta inmunosupresión inducida por la infección de BoHV-1 predispone a infecciones secundarias bacterianas (por ejemplo de *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*, *Actinomyces pyogenes* y *Mycoplasma bovis*) que generan un cuadro de pasteurelosis neumónica ('shipping fever') que puede causar la muerte del animal (Yates, 1982; Tikoo *et al.*, 1995; Kahrs, 2001b).

Las diferentes cepas del BoHV-1 se pueden clasificar en grupos distintos atendiendo al patrón de restricción de DNA y a sus propiedades patogénicas (Engels *et al.*, 1981). El grupo de cepas respiratorio/abortogénicas pertenece al subtipo 1 (BoHV-1.1) y se asocia a infecciones del tracto respiratorio (IBR) y abortos. A este grupo pertenecen las cepas BoHV-1 Cooper, Lam y FM (Mayfield *et al.*, 1983; Rijsewijk *et al.*, 2000). El grupo de cepas genital no abortogénicas corresponde al subtipo 2 (BoHV-1.2) y reúne las cepas asociadas a infecciones genitales (IPV) y en menor medida a afecciones respiratorias. A este segundo grupo pertenecen las cepas BoHV-1 K-22 y ST (Mayfield *et al.*, 1983; Rijsewijk *et al.*, 2000). Se estima que la diferencia total entre los subtipos BoHV-1.1 y BoHV-1.2 en base al patrón de restricción de DNA es un 5% (Mayfield *et al.*, 1983). Existe un tercer subtipo de BoHV-1 (BoHV-1.3) que es neurovirulento y

que causa encefalitis fatal en terneros (Belknap *et al.*, 1994). En un análisis de homología este tercer subtipo difiere un 15% respecto de los subtipos 1 y 2 (Engels *et al.*, 1986; Bulach & Studdert, 1990). Aunque escasa, esta diferencia genética queda reflejada en las propiedades antigénicas de las principales glicoproteínas del virus y le confieren un tropismo celular bien diferenciado (Collins *et al.*, 1993; Abdelmagid *et al.*, 1995; Wellenberg *et al.*, 2001; Chowdhury, 1995). Esta diferenciación ha llevado a reclasificar el subtipo BoHV-1.3 como una nueva especie de herpesvirus bovino: el BoHV-5 (Roizman *et al.*, 1992; Minson *et al.*, 2000).

I.B.1. Características del BoHV-1

El BoHV-1 comparte muchas de sus características con el HHV-1 que es considerado el virus prototipo de la familia *Herpesviridae*. La mayoría de los genes del BoHV-1 tienen su homólogo en el HHV-1 y se denominan según la nomenclatura existente para el mismo (McGeoch *et al.*, 1988; Schwyzer & Ackermann, 1996). La cápside, el tegumento y muchas proteínas de la envoltura del HHV-1 sirven de modelo para explicar lo propio del BoHV-1.

I.B.1.A. Genoma

El genoma de BoHV-1 está formado por una molécula lineal de DNA doble hebra de 135301 pb (GenBank NC_001847). La secuenciación del genoma de BoHV-1 se realizó entre 1991 y 1997 dentro del proyecto "The BHV-1 Genome Project", enmarcado en un programa de cooperación internacional entre diferentes laboratorios (Schwyzer, 1995). El genoma de BoHV-1 presenta un %G+C muy elevado, 72.4% (Roizman & Pellett, 2001), que coincide con predicciones hechas anteriormente (Roizman & Furlong, 1974) y que dificultó mucho su secuenciación.

El genoma del BoHV-1, como el de todos los miembros del género *Varicellovirus*, presenta una ordenación del tipo D que se caracteriza por la repetición interna y en orientación invertida de la secuencia de uno de los extremos de la molécula de DNA (Fig. 4) (Roizman & Pellett, 2001). Esta distribución divide el genoma del BoHV-1 en dos regiones únicas de 102.9 kb y 9.7 kb que se denominan UL ('unique long') y US ('unique short'), respectivamente (Mayfield *et al.*, 1983). Las secuencias repetidas se denominan TRS ('terminal repeat short') e IRS ('internal repeat short'), comprenden 11.3 kb y flanquean la región US. La ordenación del genoma tipo D no contempla en principio la presencia de secuencias repetidas en los extremos de la región UL. No obstante, la región UL del genoma de HHV-3, BoHV-1 y EHV-1 sí está flanqueada por pequeñas secuencias repetidas de 88, 24 y 32 pb, respectivamente, y en ocasiones sólo parcialmente homólogas como es el caso del SuHV-1 (Schynts *et al.*, 2003).

Las secuencias TRS e IRS pueden recombinar entre sí durante la replicación del genoma. Esta recombinación conlleva un cambio de orientación de la región US con respecto a la región UL, y comporta la existencia de 2 isoformas posibles del genoma del BoHV-1: P ('prototype') e IS ('inverted US'). Estudios recientes indican sin embargo que la región UL del BoHV-1 también puede invertir su orientación y que en realidad son 4 las isoformas presentes en la molécula de DNA concatamérica (Schynts *et al.*, 2003). De estas 4 isoformas, casi exclusivamente se escinden y empaquetan las 2 que presentan la región UL en la

orientación P (no invertida). La formación de progenie viral de la isoforma UL invertida representa niveles muy bajos (<5%) y se debe a una escisión alternativa de la copia del genoma de la molécula concatamérica. Las dos isoformas mayoritarias del BoHV-1, P e IS, son funcionalmente equivalentes y se hallan en cantidades equimolares en toda extracción de DNA vírico. La presencia de estas isoformas es independiente del subtipo del BoHV-1 (BoHV-1.1 o BoHV-1.2). El genoma del BoHV-1 comprende 69 genes únicos repartidos entre US y UL, y otros 2 (ICP4 e ICP22), ambos duplicados, en TRS e IRS (Schwyzer & Ackermann, 1996).

I.B.1.B. Tegumento

El tegumento de un virión maduro de BoHV-1 contiene como mínimo 8 proteínas (VP1-3, UL37, vhs, UL46, UL47, α -TIF, VP22 y UL11) (Schwyzer & Ackermann, 1996), todas ellas presentes también en el tegumento del HHV-1. De este conjunto de proteínas únicamente VP1-3, UL37 y UL11 están codificadas en genes conservados de los herpesvirus. El tegumento del BoHV-1 podría contener además la proteína UL3.5 (Schikora *et al.*, 1998), la cual podría participar en el ensamblaje final del virión en el TGN (Fuchs *et al.*, 1996). La proteína UL3.5 tiene homólogos secuenciales en el SuHV-1, EHV-1, GaHV-1 y HHV-3 (Dean & Cheung, 1993; Telford *et al.*, 1992; Fuchs & Mettenleiter, 1996; Davison & Scott, 1986), pero no así en el HHV-1 ni HHV-2 (McGeoch *et al.*, 1988; Schwyzer & Ackermann, 1996).

I.B.1.C. Glicoproteínas de la envoltura

En la envoltura del BoHV-1 se hallan 11 glicoproteínas víricas: gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM y gN (Schwyzer & Ackermann, 1996; Liang *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1996). Cada una de ellas se nombra según su homóloga en el virión del HHV-1 (18th International Herpesvirus Workshop, Pittsburgh, 1993).

I.B.1.C.1. *Glicoproteína B (gB)*

La gB del BoHV-1 es la proteína producto del gen *UL27* que codifica para una secuencia de 932 aa (Misra *et al.*, 1988). La gB del BoHV-1 se presenta bajo tres formas de peso molecular distinto: 130, 74 y 55 kDa (van Drunen Littel-van den Hurk & Babiuk, 1986). La gB se sintetiza como un polipéptido de 105 kDa que dimeriza en el retículo endoplasmático. En el aparato de Golgi cada subunidad del dímero gB/B se modifica a una forma de 130 kDa y posteriormente se proteoliza dando lugar a las formas de 74 y 55 kDa (van Drunen Littel-van den Hurk & Babiuk, 1986). Estas formas, no obstante, permanecen unidas por puentes disulfuro e interacciones hidrofóbicas. La gB participa en la fusión de la envoltura vírica y la membrana celular, en la penetración del virus y en su transmisión 'célula-a-célula' (Spear, 1993b; Fitzpatrick *et al.*, 1990; Turner *et al.*, 1998). A pesar de que la gB aislada del BoHV-1 sí presenta actividad de unión a heparina (Byrne *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996), la gB en el virión de BoHV-1 no une los proteoglicanos de heparán-sulfato (HS) de la superficie celular *in vivo*. Estos resultados indican que la gB no participa de forma activa en el reconocimiento virus-célula con el que se inicia la infección (Klupp *et al.*, 1997).

La gB es una de las glicoproteínas más conservadas en el conjunto de los herpesvirus (Kopp & Mettenleiter, 1992; Spear, 1993b; Hannenhalli *et al.*, 1995; McGeoch *et al.*, 1995), y en todos ellos resulta

esencial para la infección celular. A pesar del grado de conservación, se ha probado que la complementación con gB homólogas en algunos casos es sólo unidireccional (Mettenleiter & Spear, 1994; Miethke *et al.*, 1995). Este hecho indica que la gB determina a su vez el tropismo del virus y por consiguiente la ruta de invasión neuronal (Mettenleiter, 2003). Por otro lado, la gB estimula eficazmente la respuesta inmune humoral y celular del hospedador (Gao *et al.*, 1999). En el SuHV-1 se ha observado que la gB colabora también en la evasión del sistema inmunológico en tanto que puede ser internalizada cuando es reconocida por un anticuerpo evitando así la activación del sistema del complemento (Favoreel *et al.*, 1999a; Van de Walle *et al.*, 2001; Favoreel *et al.*, 2002; Favoreel *et al.*, 2003).

I.B.1.C.2. Glicoproteína C (gC)

La gC del BoHV-1 es una proteína de 91 kDa, producto del gen *UL44* que codifica para una secuencia de 508 aa (Fitzpatrick *et al.*, 1989). La gC participa esencialmente en la unión inicial del virus sobre la célula que infecta, pues reconoce los proteoglicanos de HS de la superficie celular (Okazaki *et al.*, 1991; Liang *et al.*, 1991; Spear, 1993b). En la gC del SuHV-1, el dominio de unión de HS se localiza en el primer tercio Nt de la glicoproteína y está formado por 3 dominios funcionalmente independientes de aminoácidos cargados positivamente (Flynn & Ryan, 1996). Recientemente se ha comprobado que algunos de los proteoglicanos que une la gC del SuHV-1 podrían ser de la familia 'syndecan' (Rue & Ryan, 2002). Éstos, tras ser reconocidos por la gC, interaccionarían con los filamentos de actina del citoesqueleto y provocarían una respuesta celular. En este sentido, diferentes autores han propuesto un modelo de unión bifásica del virus a la célula según el cual la gC no sólo une el virus al HS de la superficie celular, sino que induce la formación de un complejo estable de los receptores proteoglicano para promover la interacción de otra glicoproteína, la gD, con un receptor secundario (Karger & Mettenleiter, 1993; Spear, 1993b; McClain & Fuller, 1994; Rue & Ryan, 2003). Tras la unión de gC y gD se daría la fusión entre la envoltura vírica y la membrana celular con la participación de gB y gH/L (Spear, 1993b).

La gC es no esencial para la producción *in vitro* del BoHV-1 (Liang *et al.*, 1991; Liang *et al.*, 1992) ni de ningún otro herpesvirus. Sin embargo, la gC de los herpesvirus juega un papel fundamental en la estrategia de evasión del sistema inmunológico del organismo hospedador (Huemer *et al.*, 1993; Favoreel *et al.*, 2003). La gC del HHV cuenta como una de las moléculas de evasión del sistema de complemento mejor caracterizadas. La gC une el factor C3 y sus productos de activación C3b, iC3b y C3c, acelera la regulación de la vía alternativa del complemento C3 convertasa que da lugar a estos productos, e inhibe la unión a C3b de los factores del complemento properdina y C5 (Friedman *et al.*, 1984; Kostavasili *et al.*, 1997). Con esto la gC inhibe la activación del complemento, protege los virus libres de la neutralización mediada por complemento, inhibe la lisis mediada por complemento de las células infectadas y protege al virus del ataque del complemento *in vivo* (Fries *et al.*, 1986; Hidaka *et al.*, 1991; Friedman *et al.*, 1996; Lubinski *et al.*, 1999; Lubinski *et al.*, 2002).

I.B.1.C.3. Glicoproteína D (gD)

La gD del BoHV-1 es una proteína de 71 kDa, producto del gen *US6* que codifica para una secuencia de 417 aa (Tikoo *et al.*, 1990). La gD participa en la unión del virus sobre la superficie celular (Karger & Mettenleiter, 1993; Spear, 1993b). Esta unión es más estable que la de la gC y da pie a la fusión entre la

envuelta vírica y la membrana plasmática que conlleva la entrada del virus en el citoplasma celular. Existen diferentes receptores de superficie celular que interactúan con la gD de los alphaherpesvirus (Spear *et al.*, 2000): i) el HVEM ('herpesvirus entry mediator') o HveA ('herpesvirus entry mediator A') que pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (Montgomery *et al.*, 1996), ii) las moléculas de adhesión nectina-1 (isoformas α o HveC y β) y nectina-2 (isoformas α o HveB y δ) y el receptor de poliovirus CD155 que pertenecen a la superfamilia de receptores de inmunoglobulinas (Geraghty *et al.*, 1998; Cocchi *et al.*, 1998; Warner *et al.*, 1998; Mendelsohn *et al.*, 1989), y iii) las cadenas de HS modificadas por la acción de determinadas isoformas de enzimas 3-O-sulfotransferasas (Shukla *et al.*, 1999). La gD del BoHV-1 interactúa con la nectina-1 α y -1 β humanas, la nectina-1 α de ratón y el receptor CD155 humano y de rata (Tage4) (Geraghty *et al.*, 1998; Spear *et al.*, 2000; Martínez & Spear, 2002) y es probable que también reconozca las proteínas homólogas de origen bovino.

Está descrito que un virión de BoHV-1, HHV-1, HHV-2 o SuHV-1 puede utilizar distintos receptores de la gD, y que un mismo receptor de la gD puede ser utilizado por diferentes virus (Spear, 1993b; Geraghty *et al.*, 1998; Shukla *et al.*, 2000). Esta redundancia en el uso de los receptores de la gD, por un lado determina el rango de hospedador de un determinado virus (Mettenleiter, 2003), y por otro puede ser la base del mecanismo de interferencia homóloga y heteróloga asociado a la gD y que evita la superinfección de la célula (Chase *et al.*, 1990; Dasika & Letchworth, 2000). La redundancia asociada a la gD atañe también a su propia funcionalidad. Las glicoproteínas D, E, G e I pertenecen a un conjunto de glicoproteínas que parece haberse formado por duplicación y divergencia de un mismo gen ancestral (McGeoch, 1990). En consecuencia, la gD de algunos alphaherpesvirus habría conservado parte de su función primitiva mientras que en otros alphaherpesvirus dicha función estaría asociada a otras glicoproteínas. Así se explica en parte cómo la gD, i) resulta esencial para la entrada de viriones libres de HHV, SuHV-1 y BoHV-1 y para la transmisión 'célula-a-célula' del HHV-1 y BoHV-1, ii) es no esencial para la transmisión 'célula-a-célula' del SuHV-1, y iii) es del todo prescindible para el HHV-3 hasta el punto de no estar codificada en su genoma (Ligas & Johnson, 1988; Fehler *et al.*, 1992; Peeters *et al.*, 1992b; Rauh & Mettenleiter, 1991; Davison & Scott, 1986).

La gD del BoHV-1 es una proteína altamente inmunogénica portadora de epítomos que no ceden a la presión selectiva y que estimulan una fuerte respuesta inmunitaria neutralizante (Shen *et al.*, 1991). En el SuHV-1, la gD internaliza el complejo antígeno-anticuerpo y participa así también en la estrategia de evasión del sistema inmunológico del organismo hospedador (Van de Walle *et al.*, 2001).

I.B.1.C.4. Glicoproteína E (gE) y glicoproteína I (gI)

La gE del BoHV-1 es una proteína de 92-94 kDa, producto del gen *US8* que codifica para una secuencia de 575 aa (Rebordosa *et al.*, 1994; Leung-Tack *et al.*, 1994). La gI del BoHV-1 es una proteína de 61.5 kDa, producto del gen *US7* que codifica para una secuencia de 382 aa (Leung-Tack *et al.*, 1994). La gE y la gI del BoHV-1 se procesan a partir de precursores N-glicosilados, y quizás también O-glicosilados, de 84 y 39.5 kDa, respectivamente (Whitbeck *et al.*, 1996; Yoshitake *et al.*, 1997). Estos precursores se unen entre sí no covalentemente por sus respectivos dominios extracelulares y forman el complejo gE/I. La maduración de la gE y gI ocurre tras formarse el dímero y, a diferencia del resto de los alphaherpesvirus, parte de la gI sintetizada se proteoliza de modo que sólo su porción extracelular de 45 kDa permanece acomplejada a la gE (Whitbeck *et al.*, 1996). La gE y gI son glicoproteínas no esenciales, conservadas entre los alphaherpesvirus e implicadas en la transmisión 'célula-a-célula' del virus.

I.B.1.C.5. Glicoproteína G (gG)

La gG del BoHV-1 es la proteína producto del gen *US4* que codifica para una secuencia de 444 aa (Leung-Tack *et al.*, 1994; Keil *et al.*, 1995). La síntesis de la gG del BoHV-1 se inicia como un polipéptido de 51 kDa que da lugar a dos precursores celulares de 61 kDa (N-glicosilado) y 70 kDa (N- y O-glicosilado) (Keil *et al.*, 1996). Junto a éste último también se forman glicoproteoglicanos de la gG (gpgG) de 90-240 kDa por la incorporación de glucosaminoglicanos (GAGs) de condroitín-sulfato. A pesar de que la gG del BoHV-1 es en origen una proteína de membrana tipo I, cuando se expresa de forma natural los precursores celulares son proteolizados en el extremo Ct y la gG se secreta en forma de un polipéptido de 65 kDa N- y O-glicosilado y de gpgG (Keil *et al.*, 1996). Ni la gG ni los gpgG aparecen pues en la envoltura de viriones BoHV-1. También se ha observado secreción de gG y gpgG en los cultivos de infección del BoHV-5, SuHV-1 y GaHV-1 (Engelhardt & Keil, 1996; Rea *et al.*, 1985; Kongsuwan *et al.*, 1993). Por el contrario, en los cultivos de infección del EHV-1, EHV-4 y HHV-2 sólo se detecta secreción de gG (Crabb *et al.*, 1992; Drummer *et al.*, 1998; Su *et al.*, 1987). A diferencia del BoHV-1, los viriones del EHV-1, EHV-4 y HHV-1 conservan además una forma de la gG en su envoltura (Drummer *et al.*, 1998).

Recientemente se ha demostrado que la gG de algunos alphaherpesvirus forma parte de una nueva familia de proteínas virales que unen chemoquinas (vCKBP) (Bryant *et al.*, 2003). La gG del BoHV-1 une un amplio rango de chemoquinas con alta afinidad y bloquea así tanto su unión con los GAGs endoteliales encargados de su presentación *in vivo* como la unión con sus receptores celulares específicos (Bryant *et al.*, 2003). La gG del BoHV-1 puede por tanto modular la respuesta inmune del organismo hospedador. Esta función concuerda con el fenotipo *in vivo* de una cepa BoHV-1 defectiva en el gen *US4* que implica la atenuación viral y una mayor inmunogenicidad del virus (Kaashoek *et al.*, 1998). Por otro lado, también se ha relacionado la gG del BoHV-1 con el mantenimiento de uniones celulares entre células infectadas y en consecuencia con la transmisión 'célula-a-célula' del virus (Nakamichi *et al.*, 2000; Nakamichi *et al.*, 2002; Trapp *et al.*, 2003). En los trabajos de Nakamichi sin embargo, el método de obtención del mutante BoHV-1 gG⁻ podría haber interferido con la expresión de la proteína quinasa US3 (Demmin *et al.*, 2001). En tal caso, la desorganización del citoesqueleto y de las uniones intercelulares no serían atribuibles a la no expresión de la gG sino a una falta de expresión de US3.

La gG está considerada una proteína única de la subfamilia *Alphaherpesvirinae*. No obstante, ni el virus HHV-3 (Gomi *et al.*, 2002) ni el virus GaHV-2 la requieren para llevar a cabo una replicación efectiva en el organismo hospedador. A su vez, el virus GaHV-2 puede haber encontrado en la síntesis de un homólogo activo de la interleuquina 8 un mecanismo propio de modulación del sistema inmunitario que asegura su replicación (Parcells *et al.*, 2001).

I.B.1.C.6. Glicoproteína H (gH) y glicoproteína L (gL)

La gH del BoHV-1 es una proteína de 108 kDa, producto del gen *UL22* que codifica para una secuencia de 842 aa (Meyer *et al.*, 1991; Baranowski *et al.*, 1995). La gL del BoHV-1 es una proteína de 16-17 kDa, producto del gen *UL1* que codifica para una secuencia de 158 aa (Khattar *et al.*, 1995; Khattar *et al.*, 1996). La gH del BoHV-1 se procesa a partir de un precursor de 100 kDa y presenta únicamente N-glicosilaciones.

La gL del BoHV-1, por el contrario, presenta exclusivamente O-glicosilaciones (Khattar *et al.*, 1996). Ambas proteínas se hallan en la envoltura del virión y se unen no covalentemente formando el complejo gH/L. La formación de este complejo es necesaria para el plegamiento, procesamiento y transporte a membrana correctos de la gH, así como para el anclaje de la gL en la membrana plasmática de la célula infectada (Khattar *et al.*, 1996).

La gH es esencial en el ciclo de infección del BoHV-1 pues participa junto con la gB y la gD en la entrada y en la transmisión 'célula-a-célula' del virus, y en particular en la fusión de la envoltura del virión y la membrana plasmática (van Drunen Littel-van den Hurk *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1998; Schröder & Keil, 1999). La gH está presente en la envoltura de alphaherpesvirus (Meyer *et al.*, 1999; Fuller *et al.*, 1989; Forrester *et al.*, 1992; Peeters *et al.*, 1992a; McGeoch & Davison, 1986), betaherpesvirus (Kaye *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1993) y gammaherpesvirus (Yaswen *et al.*, 1993; Lomonte *et al.*, 1997), y es después de la gB la segunda glicoproteína más conservada de la familia *Herpesviridae* (Spear, 1993b). La gL, por el contrario, presenta poca homología de secuencia dentro del conjunto de los herpesvirus (Khattar *et al.*, 1995). A pesar del elevado grado de conservación, las gH heterólogas no complementan sus funciones (Schröder & Keil, 1999). Tampoco se conserva el tipo de unión entre la gH y la gL de una especie de herpesvirus a otra. Estas uniones pueden ser no covalentes como en el BoHV-1 y HHV-1 (Khattar *et al.*, 1996; Hutchinson *et al.*, 1992a) o bien covalentes por puentes disulfuro como en el HHV-5 (Kaye *et al.*, 1992). Por otro lado cabe señalar que en los herpesvirus humanos 4, 5, 6 y 7 el complejo gH/L es en realidad un complejo heterotrimérico que incorpora una tercera glicoproteína de membrana gp42, gO, gQ y gp65, respectivamente (Li *et al.*, 1995; Huber & Compton, 1998; Mori *et al.*, 2003; Skrincoosky *et al.*, 2000). En conjunto, estas diferencias sugieren que la gH de cada especie de herpesvirus participa en un mecanismo distinto de fusión de membranas y entrada del virus. Estos mecanismos, y por consiguiente el complejo gH/L dimérico o trimérico, guardarían relación con el tropismo celular de cada especie de herpesvirus *in vivo* (Meyer *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2003).

I.B.1.C.7. Glicoproteína K (gK)

La gK del BoHV-1 es una proteína de 38-42 kDa producto del gen *UL53* que codifica para una secuencia de 338 aa (Khadr *et al.*, 1996; Baranowski *et al.*, 1996). La gK, conservada en todos los alphaherpesvirus, tiene un marcado carácter hidrofóbico, una inmunogenicidad reducida y una menor presencia en relación a las demás glicoproteínas de la envoltura del virus, y todo ello ha contribuido negativamente a su estudio y caracterización. Así por ejemplo, desde la secuenciación del gen *UL53* de HHV-1 (Debroy *et al.*, 1985) diferentes estudios se han hecho eco de la presencia de la gK exclusivamente en las membranas nuclear y del retículo endoplasmático de las células infectadas (Hutchinson *et al.*, 1995; Avitabile *et al.*, 2003), pero sólo recientemente se ha detectado la gK también en la membrana plasmática de las células infectadas y en la envoltura de viriones HHV-1 (Foster *et al.*, 2001).

La gK es una glicoproteína con dominios topológica y funcionalmente diferentes, presente en la envoltura de los alphaherpesvirus y en la superficie de las células infectadas (Klupp *et al.*, 1998; Mo *et al.*, 1999; Foster *et al.*, 2001). Las predicciones de estructura secundaria de la gK sugieren la existencia de 4 dominios transmembrana (Debroy *et al.*, 1985). Estas predicciones han sido corroboradas recientemente mediante la inserción y detección inmunológica de péptidos específicos (Foster *et al.*, 2003). Otros estudios, por el contrario, se basan en la traducción *in vitro* de la gK en presencia de membranas microsomales y

concluyen que la gK sólo presenta 3 dominios transmembrana (Mo & Holland, 1997; Foster & Kousoulas, 1999). La gK tiene 2 dianas de N-glicosilación en el dominio extracelular que corresponde a su extremo Nt. El dominio citoplasmático de la gK de todos los alphaherpesvirus contiene las secuencias consenso de aminoácidos YXXØ y CXXCC (donde X significa cualquier aminoácido y Ø un aminoácido hidrofóbico voluminoso) (Foster & Kousoulas, 1999). La secuencia YXXØ en particular está implicada en el transporte de proteínas entre diferentes compartimentos celulares membranosos. Por otro lado, estudios recientes indican que la también proteína de membrana UL20 es necesaria para el procesamiento correcto de la gK y/o su localización en la envoltura de viriones SuHV-1 y HHV-1 (Dietz *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 2003).

La gK es una glicoproteína esencial, indispensable en la replicación productiva de los alphaherpesvirus (Hutchinson & Johnson, 1995), y sin embargo se desconoce su función. La expresión de gK mutantes en las membranas de las células infectadas conlleva la acumulación intracelular de los viriones (Hutchinson & Johnson, 1995; Jayachandra *et al.*, 1997) y la formación de sincitios celulares (Debroy *et al.*, 1985; Hutchinson *et al.*, 1995; Rajcáni & Kúdelová, 1999). El denominador común de estos fenotipos es la unión de compartimentos membranosos entre sí. Se postula que la gK regula la formación del complejo de fusión de membranas gD-gB-gH/L en los diferentes estadios de la morfogénesis de los viriones y durante la translocación de éstos del citoplasma al espacio extracelular (Hutchinson & Johnson, 1995; Jayachandra *et al.*, 1997; Avitabile *et al.*, 2003). La gK parece evitar también la reinfección de la célula de origen (Klupp *et al.*, 1998) e incluso participar en la entrada del virión en nuevos episodios de infección celular (Klupp *et al.*, 1998; Foster *et al.*, 2001).

I.B.1.C.8. Glicoproteína M (gM) y glicoproteína N (gN)

La gM del BoHV-1 es el producto del gen *UL10* que codifica para una secuencia de 438 aa (Vlcek *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1998). La gN del BoHV-1 es una proteína de 7-9 kDa, producto del gen *UL49.5* que codifica para una secuencia de 96 aa (Liang *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1996). La gM del BoHV-1 es una proteína de membrana de tipo III de 43 kDa, muy hidrofóbica, carente de péptido señal y que presenta 8 dominios transmembrana y una única diana de N-glicosilación. El tamaño de la gM podría ser no obstante 10-15 kDa mayor ya que el patrón de migración de proteínas con múltiples dominios transmembrana en geles de SDS-PAGE es anormalmente rápido, tal y como ocurre con la gM del SuHV-1 o la gK del HHV-1 (Dijkstra *et al.*, 1996; Hutchinson *et al.*, 1992b). La gN del BoHV-1 es una proteína de membrana de tipo I no glicosilada. Las glicoproteínas M y N aparecen en la envoltura de viriones BoHV-1 y en la superficie de células infectadas, unidas covalentemente formando el complejo gM/N de 48kDa (Wu *et al.*, 1998). Ambas proteínas también forman homodímeros gM/M y gN/N y complejos gM/N/N en la superficie de las células infectadas. Se cree que la maduración del complejo gM/N/N conlleva finalmente la formación del complejo gM/N. En la envoltura de viriones BoHV-1 también se detecta la presencia de dímeros del complejo gM/N. En el SuHV-1, la formación del complejo gM/N asegura la presencia de la gN en la envoltura del virión (Jöns *et al.*, 1998).

Atendiendo a su perfil de hidrofobicidad, la gM y la gN son proteínas conservadas dentro de la familia *Herpesviridae* (Lehner *et al.*, 1989; Hannenhalli *et al.*, 1995; Barnett *et al.*, 1992; Riggio & Onions, 1993; Yanagida *et al.*, 1993). A pesar de su conservación, la gM y la gN son proteínas no esenciales para la proliferación *in vitro* de los herpesvirus (Baines & Roizman, 1991; Osterrieder *et al.*, 1996; Dijkstra *et al.*, 1996; Liang *et al.*, 1993; Jöns *et al.*, 1998). Los herpesvirus defectivos en el complejo gM/N presentan una cinética de entrada en la célula más lenta de lo normal y replican con una menor eficiencia *in vivo* e *in vitro*

(MacLean *et al.*, 1993; Pyles *et al.*, 1992; Dijkstra *et al.*, 1996; Dijkstra *et al.*, 1997; Jöns *et al.*, 1998). Se ha comprobado que el complejo gM/N del SuHV-1, y en particular la gN, modula la fusión de la envoltura vírica y la membrana celular durante el inicio de la infección (Jöns *et al.*, 1998). La gM del SuHV-1 participa en cambio en la formación de la envoltura en la etapa final de morfogénesis del virión (Brack *et al.*, 2000; Mettenleiter, 2002). La interacción de los dominios citoplasmáticos de la gM y la gE con la proteína UL49 del tegumento que rodea las nucleocápsides víricas, orienta y facilita la formación de la envoltura (Fuchs *et al.*, 2002b). La ausencia de la gM, y en menor medida la de la gE, incide negativamente en la maduración de los viriones del SuHV-1 (Brack *et al.*, 1999; Brack *et al.*, 2000). Por otro lado, la aparente redundancia de las funciones de la gM y la gE explica en parte la naturaleza no esencial de ambas.

I.B.2. Ciclo de infección, patogénesis y lesiones

El BoHV-1, igual que muchos alphaherpesvirus, ha desarrollado un ciclo vital muy complejo que incluye la infección de por vida del sistema nervioso periférico del organismo hospedador. El BoHV-1 infecta y replica en las mucosas del tracto respiratorio superior o de los genitales (según sea el subtipo del virus) antes de entrar en el sistema nervioso o de infectar otros órganos que alcanza mediante viremia.



Figura 7. Signos clínicos en animales afectados por IBR. **(A)** Bovino en fase aguda con secreción nasal cristalina. **(B)** Bovino con congestión hemorrágica en el morro y salivación profusa. **(C)** Bovino con conjuntivitis. [Imágenes tomadas de Fonaiap Divulga nº45 Enero-Junio 1994; <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd45>]

La rinitis infecciosa bovina (IBR) suele cursar de forma subclínica, benigna o grave (Fenner *et al.*, 1992; Kahrs, 2001c). Los animales afectados presentan fiebre, depresión, inapetencia y un abundante flujo nasal (Fig. 7A). La mucosa nasal se muestra hiperémica ('red nose') y en ella se forman pequeñas pústulas necróticas (Fig. 7B). También se puede detectar conjuntivitis unilateral o bilateral (Fig. 7C), abundante lacrimación y opacidad corneal. Los animales con una infección subclínica o benigna desarrollan una fuerte respuesta inmunitaria y se recuperan al cabo de 5-10 días. En los casos de infección más grave, la necrosis evoluciona y forma grandes zonas de mucosa hemorrágica y ulcerada que puede facilitar la infección bacteriana secundaria. En estos casos, las lesiones de la cavidad nasal se recubren de una membrana diftérica de color cremoso y el flujo nasal, ahora mucopurulento, se acumula en vías respiratorias. El animal padece entonces disnea, respiración por boca, salivación y una tos bronquial profunda. En los casos de infección más grave, la IBR presenta una morbilidad del 100% y una mortalidad del 10%.

La vulvovaginitis y balanopostitis pustular infecciosa (IPV) se dio a conocer en Europa como 'bläschenausschlag' antes de que se identificara el síndrome IBR y se aislara el virus en 1956 (Madin *et al.*, 1956). Muchos casos son subclínicos o pasan desapercibidos. En las vacas afectadas se detecta la IPV cuando, debido al dolor, el animal no coloca la cola en la posición normal tras defecar u orinar (Fenner *et al.*, 1992; Kahrs, 2001c). Los animales con IPV presentan fiebre, depresión, anorexia y micciones frecuentes y dolorosas. La mucosa genital muestra pequeñas pústulas de necrosis que pueden evolucionar y formar grandes úlceras (Fig. 8A-C). En los casos más graves, la ulceración va acompañada de infecciones bacterianas secundarias, flujo mucopurulento, inflamación intensa del tracto reproductivo de las vacas, endometritis e infertilidad transitoria. Cuando las lesiones son extensas y del tipo agudo los animales rehúyen o rechazan totalmente la cópula.

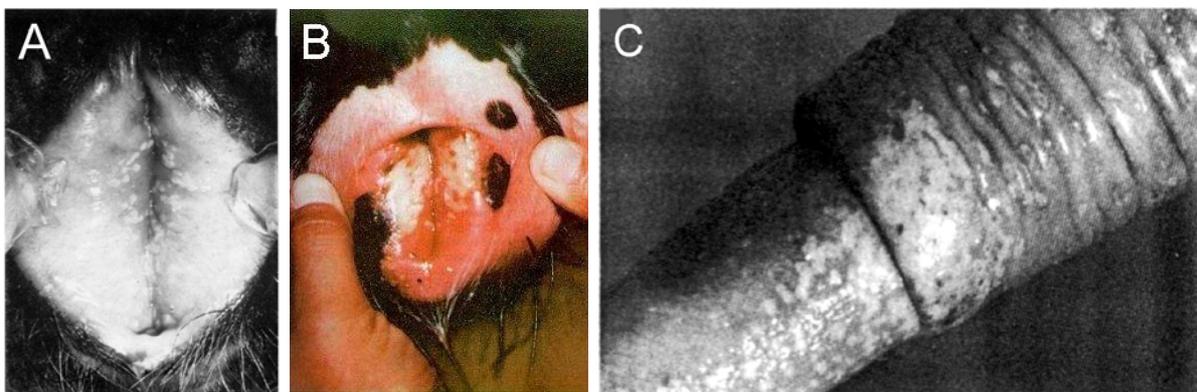


Figura 8. Proceso genital (IPV) producido por BoHV-1. (A y B) Vulvovaginitis pustular infecciosa. (C) Balanopostitis pustular infecciosa. [A y C, imágenes tomadas de Fenner *et al.*, 1992; B, imagen original del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pesqueras de México]

La infección por BoHV-1 puede inducir el aborto en vacas gestantes y susceptibles de desarrollar el síndrome IBR. La infección por BoHV-1 también afecta a terneros durante la gestación o al poco de nacer. Los terneros desarrollan una infección sistémica con fiebre, descarga óculo-nasal, insuficiencia respiratoria, lesiones necróticas en la mucosa del aparato digestivo, peritonitis difusa, diarrea, descoordinación y convulsiones, que generalmente conllevan su muerte (Kahrs, 2001c).

Las descargas serosas nasales y genitales transportan viriones BoHV-1 producidos *de novo* que pueden transmitir la enfermedad a otros animales. Los viriones también pueden invadir nódulos y vasos linfáticos e inducir una viremia asociada a linfocitos que da pie a la infección sistémica del animal (Engels & Ackermann, 1996). Los viriones pueden entrar en el sistema nervioso fusionando su envoltura con la membrana plasmática de las neuronas que inervan el tejido infectado. Dentro de la neurona, la nucleocápside y parte del tegumento se desplazan a través de los axones mediante transporte retrógrado hasta alcanzar el soma. En el soma de la neurona, la nucleocápside inyecta el genoma viral en el núcleo y el BoHV-1 establece entonces una infección latente de por vida en el organismo hospedador. Los ganglios trigémino y ciático son los focos latentes que resultan de la enfermedad respiratoria y genital, respectivamente (Fenner *et al.*, 1992). En condiciones de estrés, el genoma viral latente se reactiva y sintetiza nuevos viriones que mediante transporte anterógrado alcanzan y reinfectan las células epiteliales periféricas. La replicación del virus en estas células inicia un nuevo episodio de enfermedad clínica o bien transmite la enfermedad a un nuevo hospedador y completa así el ciclo vital del virus.

I.B.3. Diagnóstico y control

El rasgo clínico más relevante de la infección por BoHV-1 es la formación de pequeñas lesiones necróticas blanquecinas en las mucosas nasal, conjuntiva-ocular o vulvar. La infección por BoHV-1 puede contribuir e incluso coincidir con un cuadro de pasteurelisis neumónica que en realidad es el resultado de la combinación de tres factores: infección vírica, estrés y crecimiento bacteriano (Kahrs, 2001b). La pasteurelisis también puede surgir por la complicación de otras infecciones víricas a cargo del virus bovino parainfluenza tipo 3 (PI-3), virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), coronavirus respiratorios y adenovirus. Es por ello que un diagnóstico etiológico específico del BoHV-1 requiere, además del examen e historial veterinarios, el aislamiento del virus y el resultado confirmatorio de pruebas de laboratorio. Habitualmente, estas pruebas son serológicas y analizan la posible seroconversión de negativo a positivo del animal infectado. Un ejemplo de estas pruebas es el test ELISA para la detección de inmunoglobulinas M (IgM) — presentes únicamente en las etapas iniciales de la infección— a partir de muestras de suero (Graham *et al.*, 1999). Un segundo tipo de pruebas utiliza técnicas de PCR ('polymerase chain reaction') para amplificar e identificar el DNA viral de la muestra extraída (de Gee *et al.*, 1996; Fuchs *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2000). Otras pruebas amplifican secuencias específicas de DNA que son transcritas y traducidas *in vitro* para, a continuación, proceder a la inmunodetección de la proteína mediante ELISA (Zhou *et al.*, 1999a; Joseph *et al.*, 2002).

Aparte de los procedimientos habituales de higiene, organización y aislamiento de los animales infectados, la vacunación es el método de control frente al BoHV-1 al que se ha dedicado más esfuerzo. Las vacunas que se están utilizando para combatir la infección por BoHV-1 entran dentro de tres categorías: vacunas vivas atenuadas, vacunas inactivadas y vacunas de ingeniería genética (vacunas por subunidad, vacunas marcadoras y vacunas de DNA) (Kahrs, 2001d; Babiuk, 1999; van Oirschot *et al.*, 1996). La utilización de vacunas vivas atenuadas y vacunas inactivadas ha contribuido a reducir de manera significativa los signos clínicos derivados de la infección, pero en cambio no ha reducido la prevalencia de la infección, es decir, no evita una futura infección por BoHV-1 (Kaashoek *et al.*, 1996). Así pues, los animales infectados post-vacunación se pueden convertir en un foco de infección latente o reservorio del BoHV-1. Actualmente, el control del BoHV-1 y de otros alphaherpesvirus pasa por llevar a cabo programas de erradicación basados en la identificación serológica y el sacrificio de los animales infectados (Stegeman *et al.*, 1994). La identificación serológica de estos animales resulta sin embargo imposible cuando se utiliza vacunas convencionales del BoHV-1, ya que inducen una respuesta inmunitaria muy parecida a la que se produce debido a la infección por BoHV-1. Para llevar a cabo los programas de control y erradicación del BoHV-1 se utilizan vacunas marcadoras defectivas en uno o más genes, codificantes generalmente para las glicoproteínas de la envoltura, o vacunas por subunidad preparadas a partir de una o más glicoproteínas (Babiuk, 1999; Ellis, 1999; van Oirschot *et al.*, 1996; Egyed *et al.*, 2000). Estas vacunas sí generan una respuesta inmunitaria diferente a la que se produce tras la infección por BoHV-1, y su aplicación se complementa con un test serológico diferencial —generalmente un ELISA de bloqueo— que detecta la presencia de anticuerpos anti-BoHV-1 dirigidos contra la/s glicoproteína/s ausente/s en la vacuna administrada (Kaashoek *et al.*, 1995; Letellier *et al.*, 2001).

I.C. La glicoproteína E

La gE y gI son mayoritariamente proteínas 'no esenciales' que se conservan en el conjunto de los alphaherpesvirus (Jacobs, 1994; Knapp & Enquist, 1997). La gE y gI de los alphaherpesvirus siempre son proteínas de membrana tipo I, forman un complejo gE/I (Johnson & Feenstra, 1987; Zuckermann *et al.*, 1988; Whitbeck *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1997; Nishikawa *et al.*, 1999; Mijnes & de Groot, 1999; Damiani *et al.*, 2000a), se procesan y maduran conjuntamente (Whealy *et al.*, 1993; Mijnes *et al.*, 1996; Whitbeck *et al.*, 1996; Yoshitake *et al.*, 1997; Knapp & Enquist, 1997; Alconada *et al.*, 1998), y participan en una misma función.

I.C.1. Función de la gE y gI

El fenotipo que ha caracterizado a casi todos los alphaherpesvirus mutantes para el complejo gE/I es una disminución de la virulencia del virus (Card *et al.*, 1992; van Engelenburg *et al.*, 1995; Kruger *et al.*, 1996; Matsumura *et al.*, 1998), y de su capacidad de transmisión 'célula-a-célula' tanto en modelos animales *in vivo* como en cultivos celulares *in vitro* (Zsak *et al.*, 1992; Dingwell *et al.*, 1994; Damiani *et al.*, 2000b). Por ello, se ha afirmado tradicionalmente que el complejo gE/I de los alphaherpesvirus representa un factor de virulencia importante que promueve la fusión celular y la transmisión 'célula-a-célula' del virus (Jacobs, 1994; Knapp & Enquist, 1997; Tirabassi *et al.*, 1998; Dingwell *et al.*, 1995; Rebordosa *et al.*, 1996). A pesar de pertenecer a virus con rangos de hospedador y nichos patogénicos en ocasiones muy distintos, las gE y gI homólogas desempeñan las mismas funciones (Knapp *et al.*, 1997), en las que se sospecha subyace un mecanismo común. La función del complejo gE/I ha sido objeto de debate durante muchos años en base a estudios de infección *in vivo* e *in vitro* con diferentes alphaherpesvirus, así como a partir de ensayos de transfección y expresión de genes *gE* y *gI*. Los resultados obtenidos han sido con frecuencia confusos y contradictorios debido en parte a los diferentes tipos celulares utilizados (células polarizadas o células no-polarizadas) (Dingwell & Johnson, 1998; Alconada *et al.*, 1999), la diferente estrategia de expresión ensayada (infección o transfección) (Mo *et al.*, 2000; Mo *et al.*, 2002) y al hecho de que en ocasiones se ha expresado la gE en ausencia de gI, y viceversa. Actualmente se sabe que la función del complejo gE/I de los alphaherpesvirus es la transmisión directa 'célula-a-célula' de la progenie viral (Johnson & Huber, 2002). También se sabe que el complejo gE/I utiliza para ello la maquinaria celular de transporte de proteínas específico hacia las regiones de contacto de la membrana plasmática con las células adyacentes.

Desde un principio se consideró que los complejos de unión celular podrían ser una vía de transmisión directa 'célula-a-célula' de los alphaherpesvirus. La implicación del complejo gE/I en esta vía ganó peso tras comprobar que el fenotipo mutante gE^- y/o gI^- es más acusado en células polarizadas ricas en uniones o contactos celulares (células epiteliales, fibroblastos y neuronas) que en células no-polarizadas o altamente transformadas (Vero, HeLa, HEp-2, R-970) (Dingwell & Johnson, 1998; Wisner *et al.*, 2000). En el cultivo de células polarizadas, el complejo gE/I muestra dos localizaciones celulares diferentes: una perinuclear que coincide con el TGN (Zhu *et al.*, 1995; Alconada *et al.*, 1998), y otra coincidente con los complejos de unión celular que se forman en la membrana plasmática (Dingwell & Johnson, 1998; Nakamichi *et al.*, 2002). El

complejo gE/I situado en la membrana de las vesículas del TGN realiza dos funciones distintas, no excluyentes entre sí, y para las que resulta esencial el dominio citoplasmático de la gE y/o gI: i) colabora en la incorporación de la envoltura durante el ensamblaje de viriones producidos *de novo* (Brack *et al.*, 2000; Fuchs *et al.*, 2002b; Wang *et al.*, 2001), y ii) selecciona y dirige las vesículas portadoras de viriones maduros a las regiones de la membrana plasmática donde se forman uniones celulares (Johnson *et al.*, 2001; McMillan & Johnson, 2001). Los dominios citoplasmáticos de la gE o gI de todos los alpha herpesvirus contienen secuencias específicas de aminoácidos tales como YXXØ, LL (dileucina) y SDDE (grupos de aminoácidos ácidos y aminoácidos fosforilables) que son compartidas con muchos receptores de superficie celular (Zhu *et al.*, 1996; Alconada *et al.*, 1996; Alconada *et al.*, 1999; Tirabassi & Enquist, 1999; Shaw *et al.*, 2000). La maquinaria celular utiliza este tipo de señales para seleccionar y transportar proteínas entre los diferentes compartimentos celulares (membrana plasmática, endosomas, TGN, lisosomas, etc.) (Trowbridge *et al.*, 1993). Generalmente, en este transporte median vesículas recubiertas de COPI, COPII o clatrina. En éstas últimas, los llamados adaptadores o complejos AP ('assembly polypeptide') hacen de nexo entre el entramado de clatrina y la membrana (Hirst & Robinson, 1998). Actualmente hay descritos cuatro complejos AP distintos, y cada uno de ellos está formado por cuatro subunidades: 2 adaptinas ($\gamma/\alpha/\delta/\epsilon$ y β 1-4) de aprox. 100 kDa cada una, 1 subunidad μ (μ 1-4) de aprox. 50 kDa y 1 subunidad σ (σ 1-4) de aprox. 20 kDa. La subunidad β de los complejos AP interacciona con el entramado de clatrina, mientras que la subunidad μ reconoce las secuencias YXXØ de las proteínas de membrana (Hirst & Robinson, 1998; Bonifacino & Dell'Angelica, 1999). Esta interacción de los complejos AP con las secuencias YXXØ es la que permite incorporar las proteínas de membrana a las vesículas de clatrina. La selección y transporte de proteínas desde el TGN están asociados al complejo AP-1 que contiene la subunidad μ 1A. No obstante, en las células epiteliales polarizadas, el transporte desde el TGN a los dominios basolaterales de la membrana plasmática está asociado a un complejo AP-1 portador de una subunidad μ diferente: la μ 1B (Ohno *et al.*, 1999; Folsch *et al.*, 1999; Mostov *et al.*, 1999). Recientemente se ha demostrado que la acumulación de viriones HHV-1 y SuHV-1 en los espacios intercelulares laterales de células epiteliales depende del dominio citoplasmático de la gE y de la expresión de la subunidad μ 1B (Fig. 9). En ausencia de la gE, los viriones se acumulan en el citoplasma o bien son transportados a la superficie apical y excretados al medio extracelular (Johnson *et al.*, 2001).

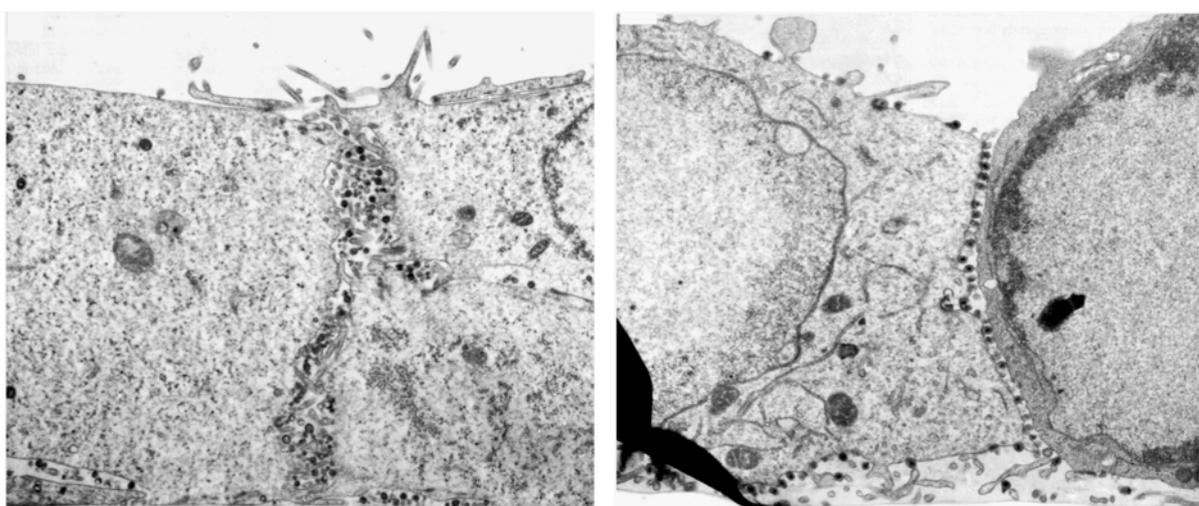


Figura 9. Imágenes de microscopía electrónica de células MDBK infectadas con virus HHV-1 wt. A las 17 h post-infección, las células fueron fijadas y procesadas para la microscopía electrónica. Se aprecia claramente la acumulación de viriones sobre la superficie lateral de contacto entre dos células. [Imágenes y texto tomados de Johnson *et al.*, 2001]

Aparte del dominio citoplasmático del complejo gE/I, también el dominio extracelular del complejo resulta ser esencial para la transmisión directa 'célula-a-célula' de los viriones. Buena prueba de ello es que el dominio extracelular de la gE es suficiente para su co-localización con los complejos de unión celular (Wisner *et al.*, 2000). Se postula que en este entorno, el complejo gE/I pudiera unir ligandos celulares tales como las moléculas de adhesión celular (CAMs, de 'cell adhesion molecules') concentrados en los complejos de unión y facilitar así la salida o circulación del virión por el espacio intercelular (Dingwell & Johnson, 1998; Alconada *et al.*, 1998). Así, la gE de HHV-3 parece promover un mayor contacto entre células epiteliales polarizadas toda vez que ciertas regiones de su dominio extracelular presentan homología de secuencia con las CAMs E-cadherina y desmocolina (Mo *et al.*, 2000). Por otro lado, algunas proteínas de la superficie celular que pertenecen a la superfamilia de las IgG podrían funcionar como receptores para el complejo gE/I de los alphaherpesvirus (Dingwell *et al.*, 1994). Este mecanismo se teoriza a partir de la capacidad del complejo gE/I de HHV-1, HHV-3 y SuHV-1 de poder unir la fracción constante (Fc) de inmunoglobulinas G (IgG) (Baucke & Spear, 1979; Johnson *et al.*, 1988; Litwin *et al.*, 1992; Favoreel *et al.*, 1997). Si bien el reconocimiento de las IgG por parte del complejo gE/I de estos virus realmente parece evadir el sistema inmunológico del organismo hospedador (Frank & Friedman, 1989; Dubin *et al.*, 1991; Favoreel *et al.*, 1997; Lubinski *et al.*, 2002), el hecho de que no se haya descrito lo mismo para otros alphaherpesvirus permite especular que la función verdadera del dominio extracelular del complejo gE/I sea el reconocimiento de receptores celulares. Este reconocimiento daría pie a su vez a la fusión de la envoltura vírica con la membrana plasmática de la célula adyacente y la consecuente infección.

Probablemente, los alphaherpesvirus infectan y replican en las mucosas *in vivo* tal y como lo hacen en el cultivo de células polarizadas *in vitro*. Sin embargo, la acumulación basolateral de viriones *in vitro* no tiene porqué darse *in vivo*. Esta acumulación se debe a las condiciones particulares del ensayo *in vitro* y es tan sólo un reflejo del sentido de transmisión del virus. Los alphaherpesvirus infectan los ganglios periféricos del sistema nervioso por la transmisión directa entre neuronas. El ensamblaje final del virión se inicia en el TGN y concluye en la región presináptica del axón. A esta región llegan por separado y mediante transporte axonal las cápsides tegumentadas y las vesículas portadoras de las glicoproteínas de la envoltura (Penfold *et al.*, 1994; Tomishima & Enquist, 2002). La gE integrada en una vesícula del TGN habría sido reconocida y seleccionada por la maquinaria celular para dirigir el transporte de dicha vesícula hasta la región presináptica. Por homología al modelo de transmisión directa 'célula-a-célula' del virus *in vitro*, la gE de los alphaherpesvirus se localizaría en esta región promoviendo el ensamblaje de los viriones y con ello la infección de la neurona postsináptica (Enquist *et al.*, 2002). Por otro lado, cabe señalar que las vesículas sinápticas de neurotransmisores también son vesículas de clatrina y que son objeto de un reciclaje continuo (Takei *et al.*, 1996). En este entorno, la gE podría entrar fácilmente en un programa de reciclaje y promover el ensamblaje y la excreción de nuevos viriones.

I.C.2. Interés de la gE del BoHV-1

Los programas que se llevan a cabo para el control y erradicación del BoHV-1 se basan en la diferenciación serológica entre los animales vacunados contra el BoHV-1 y los animales que, vacunados o no, han sido infectados por el BoHV-1. Únicamente la utilización conjunta de vacunas marcadoras, vivas o inactivadas, y de un test serológico apropiado permite esta diferenciación (van Oirschot *et al.*, 1996; Babiuk,

1999). Las vacunas marcadoras desarrolladas contra el BoHV-1 son por lo general defectivas en una glicoproteína 'no-esencial' de la envoltura del virus (gC, gE, gI, gG, gM y gN). Las vacunas marcadoras del BoHV-1 tienen pues una capacidad limitada de replicar en el hospedador natural, pero no ven comprometidas sus funciones básicas para infectar la célula diana. La gE, y en parte también la gC (Liang *et al.*, 1992; Furtado Flores *et al.*, 1993; Denis *et al.*, 1996), han sido las glicoproteínas 'no-esenciales' del BoHV-1 que más aceptación han tenido para el diseño de vacunas marcadoras contra el BoHV-1 (Kaashoek *et al.*, 1994; Kaashoek *et al.*, 1995; Kaashoek & van Oirschot, 1996; Rebordosa, 1996; Strube *et al.*, 1996; Bosch *et al.*, 1998; Egyed *et al.*, 2000; Lemaire *et al.*, 2001; Mars *et al.*, 2001; Dispas *et al.*, 2003). Los animales vacunados con un BoHV-1 defectivo para la gE desarrollan pues una respuesta inmunitaria contra el BoHV-1 pero sin formar anticuerpos anti-gE. Por el contrario, los animales infectados con el BoHV-1 desarrollan una respuesta inmune específica contra el BoHV-1 íntegro incluida la gE. El test serológico que diferencia unos animales de otros es aquél que detecta los anticuerpos anti-gE en los animales infectados con el BoHV-1.

El test serológico más comúnmente utilizado para diferenciar los animales vacunados de los animales infectados por el BoHV-1 es el 'blocking gE ELISA' o ELISA gE de bloqueo. Este test identifica el suero de un animal infectado por BoHV-1 como aquél que es capaz de inhibir o bloquear de manera específica la interacción de un anticuerpo anti-gE de BoHV-1 con la gE del BoHV-1. Los anticuerpos anti-gE presentes en el suero de un animal infectado reconocen la gE del virus adsorbida en un pocillo de ELISA, evitando así la unión posterior de un anticuerpo caracterizado anti-gE de BoHV-1. Para la detección de animales infectados por BoHV-1, el ELISA gE de bloqueo precisa por tanto de un anticuerpo caracterizado anti-gE del BoHV-1 y de la gE del BoHV-1. Actualmente, no obstante, algunos de los tests disponibles en el mercado para el control del BoHV-1 utilizan anticuerpos anti-gE/I en detrimento de los exclusivamente anti-gE (Rijsewijk *et al.*, 2000). La gE, o gE/I, del ELISA gE de bloqueo puede ser el virión íntegro inactivado y purificado del BoHV-1, mientras que el anticuerpo utilizado suele tener un origen monoclonal (Letellier *et al.*, 2001).

El BoHV-1 que se utiliza en el ELISA gE de bloqueo se obtiene a partir de la infección de cultivos celulares. Esta práctica, sin embargo, resulta muy costosa pues precisa de la utilización de suero bovino fetal para el mantenimiento de las células, y no está exenta de riesgos ya que utiliza cepas infectivas del virus. Por otro lado, el rendimiento productivo de la gE mediante la producción del virión íntegro del BoHV-1 está limitado a la estequiometría de la gE en la envoltura del virión. Estas circunstancias han llevado a desarrollar estrategias de producción de la gE, o gE/I, más económicas y productivas. Estas estrategias se fundamentan en la tecnología del DNA recombinante y utilizan sistemas eucariotas y procariotas de expresión de proteínas.

I.C.3. Estructura de la gE del BoHV-1

La gE del BoHV-1 es una proteína de 575 aminoácidos con las características propias de una glicoproteína de membrana tipo 1. La gE del BoHV-1 presenta un péptido señal, un dominio extracelular amino terminal, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático carboxilo terminal (Rebordosa *et al.*, 1994; Leung-Tack *et al.*, 1994).

El péptido señal de la gE del BoHV-1 se extiende desde el aminoácido metionina que ocupa la posición 1 (M₁) hasta la A₂₆ (Fig. 10). El perfil hidropático de la secuencia de aminoácidos de la gE apunta la presencia de un dominio hidrofóbico con estructura hélice- α entre los aminoácidos L₁₁ y A₃₁. Este dominio incorpora el punto de corte del péptido señal entre los aminoácidos A₂₆ y E₂₇ (Rebordosa, 1996).

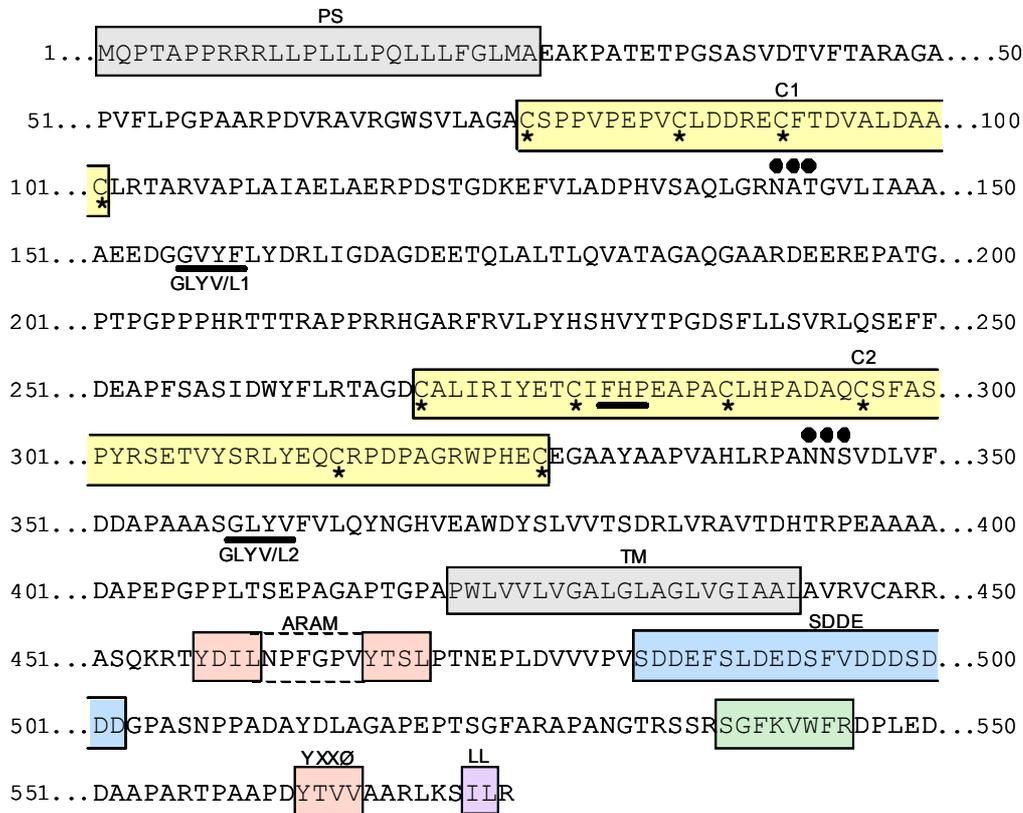


Figura 10. Diagrama de la secuencia de aminoácidos y dominios más relevantes de la gE del BoHV-1. La gE está formada por 575 aminoácidos. Los números determinan la posición del primer y último aminoácido de cada línea en la secuencia. Las cajas grises representan los dominios hidrofóbicos PS (péptido señal) y TM (dominio transmembrana) de la gE. El dominio extracelular de la gE se extiende entre PS y TM. En él se dibujan dos cajas amarillas (C1 y C2) que representan sendos dominios ricos en el aminoácido cisteína (*) altamente conservados en todos los alphaherpesvirus. En el dominio extracelular se localizan además otras secuencias muy conservadas (—) en el conjunto de los alphaherpesvirus: GLYV/L1 entre C1 y C2, GLYV/L2 entre C2 y TM, y FHP dentro de C2. Asimismo, se indican dos posibles dianas de N-glicosilación (●●●) (Rebordosa *et al.*, 1994; Rebordosa 1996). El dominio intracelular de la gE se extiende desde TM hasta el aminoácido R575 en el extremo Ct de la proteína. En él se localizan tres secuencias consenso YXXØ (cajas rojas). Las dos secuencias YXXØ más próximas a TM forman el dominio ARAM, altamente conservado entre los alphaherpesvirus. También se localiza una posible diana de fosforilación de la casein quinasa II (SDDE, caja azul), una o posible secuencia dileucina (LL, caja magenta) y una secuencia conservada formada por residuos aromáticos e hidrofóbicos (caja verde).

Figura 11. (Páginas 39-40) Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos global de la gE de diferentes virus de la familia *Herpesviridae*: BoHV-1 FM (Rebordosa *et al.*, 1994; gb U06934), BoHV-5 (NP_954961.1), SuHV-1 (gb AAP04400.1), EHV-1 (sp P18552), EHV-4 (NP_045291.1), HHV-3 (pir VGBE68), CeHV-9 (NP_077482.1), FeHV-1 (gb AAB30982.2), CaHV-1 (gb AAC67214.1), GaHV-2 (gb AAA64969.1), GaHV-3 (NP_066914.1), MeHV-1 (NP_073378.1), HHV-1 (pir VGBE18), HHV-2 (sp P13289) y CeHV-1 (NP_851927.1). El alineamiento se ha realizado mediante el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Los números indican la posición del último aminoácido de cada línea desde el aminoácido M inicial de la proteína. El código de colores utilizado refleja la clasificación de los aminoácidos según los siguientes criterios físico-químicos: rojo para aminoácidos pequeños, hidrofóbicos y aromáticos (excepto Y) (A, V, F, P, M, I, L, W), azul para aminoácidos ácidos (D, E), magenta para aminoácidos básicos (R, H, K), y verde para aminoácidos con radicales hidroxilo, amino o el aminoácido Q (S, T, Y, H, C, N, G, Q). Los guiones de color gris reflejan espacios ('gaps') de no alineamiento entre secuencias. En la línea inferior de consenso, '*' significa que los aminoácidos de la columna de alineamiento son idénticos (máxima conservación), ':' refleja cambios conservativos de aminoácidos atendiendo al código de colores aplicado, y '.' significa que se identifican cambios semiconservativos en la columna de alineamiento.

BoHV-1	---	MQTAPPRRLLPILLFQLL---	LFG	23	LMAEA	---KPATET---	PGS-ASYDTVFTARAGAPVFLPG-PAARDVRAVGM SVL	72		
BoHV-5	---	MRA TAPP RRL PILLLELPSP LIG		26	LFV GAG LGP SFS PEA	---DTGAKAPA GAV FARV G APVFLPG-PPRRET RAVGM SVL	81			
SuHV-1	---	MRPF LLRAAQ LLALLALAL STEAPS	LSAETT	59	DLDGDDRRAGFGSAL	---ASLREAPPALHVNVS EGNF TLDA	---RGDGA VLAGI W TFL	112		
EHV-1	---	M-ELLAASRA	---CIFF	13	GLVTV	---LDANG---	VQQVELSE GAWAMI D-GRDVLTP	---TNTTTRVT KAW TFL	59	
EHV-4	---	M-ELLDSRRA	---FFFF	13	VLI TV	---LDANG---	VQRVELTE GAWAMI D-GRDVLTP	---TNTTTRVT KAW TFL	59	
HHV-3	---	MSAQEDLGDDTGI HVIPTINGD	---DRH	144	KIVNVDQ	---RQXGDFVKGNDFKQGRKQRLIEVS	VEENHPFTLRAPTQRIYGVRYTETW SFL	203		
CeHV-9	---	NEHVDLVNR TMTKNVIMKHG	---HRN	132	FMDAS	---ILYKSVH G-IHLH AHQR PTEVS	EAENQQLLKHVLPQENEHYTTW SFL	187		
FeHV-1	---	M-GILLVT	---ILV	9	ILLIV	---TSSSST	IHOVTMTEGAA LIVD-GDI DPP	---LNKTS HFLRGM TFL	56	
CaHV-1	---	MFR LFL	---IAS	10	TLC SV	---RFGFST	IRNVIVSE KSGFVID-GYSTNPP	---FNE TKKFT RGM VFL	57	
GaHV-2	---	M-CVFO	---ILI	8	IVT TK	---VAGTAN	INHLDVPAGHSATT-IPR YPP	---VVDGT LYETW TMI	55	
GaHV-3	---	MLDIFGLRG IMS-CPRM	---PLF	19	LM AAMM	---CSATT	VNRLLPQNSATLK-ISR YPP	---VVDGT PYETW TMI	65	
MeHV-1	---	MRACRLS	---ILI	10	LLLQT	---ISAMV	IQHLDLLEQGSVAVD-IPR YPP	---LITNGT IYETW TMI	55	
HHV-1	---	M---DRGA	---VVG	8	FLLGV	---CVV	SCLAGTPK TSMRRVSVGEDV SLLP	---APGPTGRGFTQKLIWA	56	
HHV-2	---	M---ARGAG	---IV	8	FVGVG	---WVV	SCLAAAPR TSMRRVTSGEDV VLLP	---APAERTR--AHKLIMA	54	
CeHV-1	---	MRPVRAS LG-LLVA		14	WAI GA	---CV	C-AAAIBTTMKHASAGDEVRLFA	---LPAARPGAPPVME	59	
BoHV-1	---	AGA---CS	---PVVPEP-VCLDDRECFTDVAL	125	EFVLAD	PHVSAQLGRN	---ATG-VLIIAAAABEDGGVYFLYDR	LIGDA-GDEETQ-LALT	178	
BoHV-5	---	ASD---CP	---PBPPTP-VCLDDREC FADVAL	134	EFVVPD	PRVSARLGRN	---ATG-VQIADVTBEDGGVYFLYDR	AAGDA-GDEETQ-SLTL	187	
SuHV-1	---	PVRG-C	---DAVSVTTCFETA-CHPDI	159	RLR-RE	PIVTPERMS	---PH-LSYLRA TFDITQIYTL LHD	---ASGP	---RAV--FVVA	205
EHV-1	---	ETPPG-CA	---GDI SVKKVCVSHSICEDN	116	DYVYNGT	VVPI LAET	---RSV-LQI HRA TFS	IAGVYTL HV	---SIDG-IMKHSV-VLLT	167
EHV-4	---	ETPPG-CA	---GDI TVKTVCVSA S ICEDN	116	DYVYNGT	VVPI LAET	---RSV-LQI QRA TFS	IAGVYTL HV	---SMNG-QI KHSV-VLLT	167
HHV-3	---	P SLT	---CTGDAAEAIQHICLKH TTC	261	WLVVNT	STLDELELDPPEIEPGV	LVKLVRT EKQYLGVYIWNMR	---GSDG-TSYYA T-FLVT	318	
CeHV-9	---	PAAP	---CK-LTPPSIQOVCIKHGAC	244	WTVVNT	TEDFANYGFTDPDKPGV	LVEHMHNAHAGVYIWNLQ	---GTHG-ENMVVT-FLVK	301	
FeHV-1	---	ETPKG CT	---GEVSVLKVICIDRGVCPD	113	DYVYNN	KTVPPI LAPE	---KSG-LGI QTN INNS	IYTL LYE	---HGDNGM SHOST-FVVT	166
CaHV-1	---	PNH-C	---NETATGYVCLSAHCFTD	109	SLSLNG	VNPI FLSTKA	---SNK-LEI INA SIQNAQ	IYI RYSRNGTRT	---AKLDV-VV-VG	161
GaHV-3	---	SNR-C	---NETATGYVCLDS VNC	119	TAKLRN	APR VLI VDNV	---DTQ-WTVLNASQNAQ	IYI RYSRNGTRT	---AHVDA-IV-LA	171
MeHV-1	---	SSI-C	---NDTSMGYICLDRATC	109	SSQFH	IPNVI GTGR	---GKE-LTI FNA TSO	IAGVYTYRNDRSR	---AVMDVLLVWVS	163
EHV-1	---	VEPLDGC	---GPLHPSWWSLMP	108	GLR-TD	FVQBRVAVV	---NRS-LVI HGVRET	DGSLYTL SVGGLKDP	---ARQVASVIV	160
HHV-2	---	AEP L DAC	---GPLRPSWVALMP	106	GLY-SB	LAWDRVAVV	---NES-LVI YGALRET	DGSLYTL SVVGLSDE	---ARQVASVIV	158
CeHV-1	---	LDPMAAC	---GSLRPSWWSLRP	113	PFWGP	DGAPQRGNVT	---NGT-LVL REARV	DGSGMHVLSVFFHPNATAARHV	---VFLK	166
BoHV-1	---	LQVATAGA	---QGAARDEE	216	RRHGAR	FRVL PY HSHVY	TFGDSFLLSRLQSEFFDEAP	---FSASIDWYFLRTA-GDCALIR	274	
BoHV-5	---	LRVEPADAWDPACQEGEGEGEGK	---GRGAAKTPTPTP	242	RRHGAR	FRVQFYRSHVY	TFGDSTLSVRLQSEFFDEAP	---FSASIDWYFLRPA-GDCALIVR	300	
SuHV-1	---	VGD R PPA P	---ADPVG-PA	220	RHEPR	EHALGFHSQ LFS	FGDITDLMR RVSDMGDS	RENTATL DWIYARA P-PRCLLYY	278	
EHV-1	---	VKPPPKQPQ	---PRLRVTIP	195	THTD	-FWHGYHRSRYADGSE	FELSVNLESHI VEP	---FSAEIQWYMNMTSSSSCDLFR	251	
EHV-4	---	VKKPPTLP	---RVHKTP	193	AHTD	-FVIRGYHRSRYAVGSE	FELSVHLESHI QES	---FNAEIQWYMNMTSSSSCDLFR	249	
HHV-3	---	WKGD BKT RN	---PTPAVTP-QP	336	RGAB	FHMVYGHSHVFS	VGDTFESLAWHLQYKIH EAP	---FDLLEWLYVPI D-PTCO LFR	391	
CeHV-9	---	LNNS IENHI	---DLPVAVTP-KP	319	KGAB	FHTWHYHSHVFS	VGDTFESLPMHLQYKHDT P	---FDLLEWLYVPI N-PTCO PMR	374	
FeHV-1	---	VKA-KHP	---GPSLTP-APVHL-ITPH	186	RHGAH	FHV RMYHSHVYI	EGDKFELLEMHLKSDI YDP E	---FSATIDWYFMETD-IKCP VFR	242	
CaHV-1	---	IKK-KE	---TVITK-PKVY-IK	182	KHGGF	FHV RMYHSHVFN	DESEK IELNLESEI YDSE	---FSASIDWYMNMTS-SECS VFH	238	
GaHV-2	---	VLGQARDRLP	---QMSSPFMISS	180	HADIK	LSLKNFKALVHY	GDITINVTAVI LGSPEI	---FTLEFRVFLRYN-PTCK VFT	236	
GaHV-3	---	VSGRRGRV P	---PTVYVPGFP	190	LHKFO	LSLKNFKALVHY	GDITINVTAVI LGSPEI	---FKLEFRVFLRYN-PTCK SFT	246	
MeHV-1	---	VHGQAPDR	---MNIY-ITP	180	STRVD	LTFKNFNAFLNAGD	TVADASYTAHLINWAGA	---FSLEFKLIFLYN-SKCL YLT	236	
HHV-1	---	VQP-APVPTP	---PADYEDDN DEG	217	HVRGVT	VRMETPEALF	ESGETESTNY SIHAHDDQT	---YSMDVVWMLRFDVP-TSCAEMR	275	
HHV-2	---	VEP-APVPTP	---TPDDYDEED-DAGVTN	212	HVRGVT	VHMETLEAILLAF	ESGETESTNY SIHAHDDGP	---YAMDVVVMMRFDVP-SSCADMR	270	
CeHV-1	---	VAPRPEPAGG-TPPRRDEE	---GG-TEE	208	HVRGVT	VSLRTOITAILFA	EGDITVHTDYSVMPITADDDP	---YMEVVVWVRFDVP-ECCGEMR	266	

BoHV-1 390 APVAH--LR-PANNNSVDLVEDDAPAAA SGLYVFVLIQNGHYEAMDYSLVVTSDRLVRAVT
BoHV-5 416 APVAH--LR-PANNNSVDLVEDDAPAAA SGLYVFVLIQNGHYEAMDYSLVVTSDRLVRAVT
SuHV-1 381 GEEVH-----TNTADESGLYVLMVTHNGHVA TWDYTLVATAAEYVTVIK
EHV-1 366 GNRLY-FIQPAQNRVDLDFKDTASA TGLYVFVLLXNGHPEAMT YTLVATAAEYVTVIK
EHV-4 364 GDRPH-FIQAPAPNRVDLDFKDTASA TGLYVFVLLXNGHPEAMT YTLVATAAEYVTVIK
HHV-3 505 LYSTCLYHNAPQCLS-HMNSGCTFTSPLAQRVASTVQNCETHADNY-TAYCLGISHM
CeHV-9 487 LYSACVYHETVPSCLS-PENPECTFASFHARRAVANTVQNCHEV-NY-TADCLAVSHV
FeHV-1 357 IYETCLFHFAASCLH-PEDPSCFTSPLRAVSLNRFYKCDHRYAD-WTRDCINPFSI
CaHV-1 353 IYETCLFHFAASCLH-PINPLSCFTSPLRAVSLNRFYKCDHRYAD-WTRDCINPFSI
GaHV-2 351 IYEPCLFHKEPECIITAEQSVCHFASNIDLIQAAARSENCS-TGY-RRCIYDTAI
GaHV-3 360 IYEPCLFHKEPECISPELSECRFASNAQVLEIAAARSVNC-A-RACHYDAEV
MeHV-1 351 IYEPCLFHESSECOMVPEHAECRFAANMQLASARTDGR-VDV-PRGCTFQTSV
HHV-1 386 IYESCLYHQLEPCLS-PADAPCAAST-WTMSRLAVRSYAGCS-RTNP-PPRCSFAAHM
HHV-2 381 IYEACLYHQLEPCLS-PADAPCAVSS-WAYRLAVRSYAGCS-RTNP-PPRCSFAAHM
CeHV-1 377 IYEPCLYHQLEPCLS-PADAPCAASV-WTERLAVRRYVPCS-RGVP-PPRCPSSDAAH
* * * * *

BoHV-1 488 DHTRPEAAAADAPBEGP-PLTSEPAGAP-TG-PAPMLVVLVYAL-GLA
BoHV-5 515 DHTRP-AAAADAPBEP-PPADGAPDAPGRGARG-PAPMLVVLVYAL-GLA
SuHV-1 494 ELTAPARAGTPWEGGGDDAIYVDGVTTPAPPARWNPYGRTPGRFLVLAGSF-VMT
EHV-1 469 DTRRPLGHEFYTDIGH-KIITPHPSVAITEELG-AWTRHYLAFLVII-CTC
EHV-4 467 DTRRPLGHEFYTDIGH-QLTFPHPSVAITEELG-AWTRHYLAFLVII-CTC
HHV-3 588 ERGFPPTAQPPATKP-KELTPVN-PGTS-PLLRYAAMTGGLA-AV
CeHV-9 574 BHGFPEIHNVPSFSS-N-VTANNVDISETNIF-PFKTAGITGGFA-VL
FeHV-1 459 DLTRRPLGSHQIET-DI-STSSESPTEPTRNIIH-TWARRYLKVIIGII-CVA
CaHV-1 456 NYHKPFGYKSFLONSI-VDNEASD-WSSSSKRNNCTI-IYDILTSLS-IG
GaHV-2 449 IAHKPGFDR-VL-SS-NDDAARGVRPGAIEK-ESGRRLRSALIASIYIVA
GaHV-3 454 DVHKPFGYNVAVSADTP-GNFTAAPT-HISAFKE-GFTV-IYSLIVSSMA-AG
MeHV-1 450 EQLLPQRGADLAEPTH-HVGAHPHAPPTH-G-ALRIGAVNGAAL-LL
HHV-1 481 EQLLPQRQPEVPEPTH-HVRAPHPAPSAR-G-PLRIGAVLGAAL-LL
HHV-2 476 ERSPPRYRPPVPEPT-P-SAQPTGPRPAAP-R-AARLVGVLGAAV-GL
* * * * *

BoHV-1 575 L--DEDS-FVDDSD-DDGPAANPPAD-AYDLAAGAPETSGFARAAPANGTRSSRG-F
BoHV-5 599 P--DEDS-SFAEDGSDA-DDELADEPPATAAYDIAG-FAQG-AGGPA-RPSRG-F
SuHV-1 577 E--EAGVIRRPA-SFGSDSGYE-GFASLDPEDEFSS-DEDDGLYRPE-EAPRSG-F
EHV-1 550 D--SDDSEF-SDS-DEELEYPPEKPAQLP-YQFVDDGDA-P-SGRSG-F
EHV-4 548 D--SDDSEF-SSS-DEELELPQPP-PAQQLP-YSSLESADA-SRSG-F
HHV-3 623 D--FEDSEST-DT-EEFEGNA-IGSHGG-SS-Y
CeHV-9 604 D--FED--DT-EVEVDE-GAECGG-SS-Y
FeHV-1 532 DEESADDSFDE-SDE-EEPLN-NHHI-STTQHTDI-NPEKSGSGY
CaHV-1 522 D--YSSDESF-SDS-EE-LN-QRG-ETIQGG-KKEQSG-Y
GaHV-2 497 V--PYDNTECSG-NO-VE-YIQQG-YYQKSA-FMKRMSGSGY
GaHV-3 488 S--PLSNTCEGL-SRGLA-G-NSKR-TPKQSGRY
MeHV-1 498 E--RQGVPM-LAPP-ER-PDS-PSTN-GSGFELISP-TAFSVY-P-R
HHV-1 550 E--RDGSLMQ-DPP-ER-PDS-PSTN-GSGFELISP-TAFSVY-P-H
HHV-2 545 D--SDDSEXD-SDS-DRLPGTD-PAPKR-GSGFQILS-GAKADP-W
CeHV-1 539 * * * * *

El dominio extracelular de la gE del BoHV-1 se extiende desde el E₂₇ hasta la A₄₂₁. El rasgo más característico de este dominio, y en general del dominio extracelular de la gE de todos los alphaherpesvirus, es la presencia de dos regiones ricas en residuos cisteína (C1 y C2) (Fig. 10, 11) (McGeoch, 1990; Rebordosa, 1996). La región C1 de la gE del BoHV-1 (C₇₆-C₁₀₁) contiene 4 residuos cisteína espaciados de forma regular en un patrón común para la mayoría de alphaherpesvirus con la excepción del HHV-1, HHV-2 y CeHV-1 (Fig. 11). La región C2 de la gE del BoHV-1 (C₂₇₀-C₃₂₇) muestra 6 residuos cisteína distribuidos de forma regular y en un patrón común para casi todos los alphaherpesvirus (Fig. 11). Además de C1 y C2, en este dominio extracelular también se hallan muy conservadas las secuencias GLYV/L y F/YHP. En el BoHV-1 se halla una primera secuencia GLYV/L parcialmente conservada (GLYV/L1) a aproximadamente 50 aminoácidos del extremo carboxilo de la región C1, y una segunda secuencia GLYV/L altamente conservada (GLYV/L2) a aproximadamente 30 aminoácidos de la región C2. La secuencia F/YHP se halla contenida dentro de la región C2 en la gE de todos los alphaherpesvirus (Fig. 11). La secuencia de aminoácidos que separa las regiones C1 y C2 en la gE de todos los alphaherpesvirus es siempre menos conservada y de longitud variable. En algunos alphaherpesvirus, esta región espaciadora es, además, rica en aminoácidos ácidos (D o E) o en el aminoácido prolina (P) que se halla en secuencias repetidas del tipo PTPGPPP (BoHV-1), PPPVTVP (EHV-1), PPAPLAP (SuHV-1) o PPPPAPP (HHV-1) (Rebordosa, 1996) (Fig. 11). Recientes estudios indican que los primeros 246 aminoácidos del dominio extracelular de la gE del BoHV-1 —esto es, la región C1, la secuencia GLYV/L1 y buena parte de la secuencia espaciadora rica en P— son suficientes para interactuar y formar el complejo con la gI (Tyborowska *et al.*, 2000). La región C2 y la secuencia GLYV/L2, por el contrario, no son necesarias para la interacción de la gE con la gI aunque tampoco se descarta que contribuyan de alguna manera a la formación del complejo. En el HHV-1, la región C2 y la secuencia GLYV/L2 sí parecen participar en cambio en la unión de la Fc de IgG (Dubin *et al.*, 1994; Basu *et al.*, 1995), mientras que en el BoHV-1 se estima que puedan interactuar con un receptor de membrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

El dominio transmembrana de la gE del BoHV-1 está contenido en el dominio hidrofóbico que se extiende entre los aminoácidos P₄₁₃ y A₄₄₃, y está formado por una única secuencia de aminoácidos (P₄₂₂-L₄₄₂) cuya predicción de estructura adopta una forma de hélice- α transmembrana (Rebordosa, 1996) (Fig. 10).

El dominio citoplasmático de la gE del BoHV-1 está formado por los 133 aminoácidos del extremo carboxilo de la proteína, desde la A₄₄₃ hasta la R₅₇₅. Esta región contiene un dominio de activación por reconocimiento de antígeno (ARAM, de 'antigen recognition activation motif' o ITAM, de 'immunoreceptor tyrosine-based motif') que incluye dos secuencias YXX \emptyset separadas por 6 aminoácidos y que se extiende del aminoácido Y₄₅₇ al L₄₇₀ (Fig. 10). Los dominios ARAM se hallan en las regiones citoplasmáticas de proteínas transmembrana como la proteína 2A del HHV-4 (Rowe *et al.*, 1990), la glicoproteína 30 del virus de la leucemia bovina o varios componentes de los receptores de linfocitos T y B (Chan *et al.*, 1994), que funcionan como receptores fosforilables. El dominio ARAM se halla altamente conservado en las gE homólogas de los diferentes alphaherpesvirus (Fig. 11), y es esencial tanto para el transporte intracelular de la gE (Alconada *et al.*, 1996; Alconada *et al.*, 1999) como para la transducción de señales en la célula infectada (Favoreel *et al.*, 1999b; Shaw *et al.*, 2000). Aparte del dominio ARAM, en la región citoplasmática de la gE del BoHV-1 también se hallan conservados un dominio SDDE o diana de fosforilación de la casein quinasa II, una secuencia formada por un aminoácido aromático rodeado de aminoácidos hidrofóbicos, una tercera secuencia YXX \emptyset y una posible secuencia LL o dileucina (Alconada *et al.*, 1999). Como los ARAM,

también los dominios SDDE y LL están implicados en la localización y transporte intracelular de proteínas de membrana.

I.C.4. Expresión recombinante en *E. coli*. Expresión de la qE del BoHV-1

La industria biotecnológica ha crecido enormemente en los últimos años, y con ella las expectativas de expresar de forma recombinante y en diferentes sistemas un gran número de proteínas para distintas aplicaciones. Algunas de estas aplicaciones requieren poca cantidad de proteína, mientras que otras, como p.e. algunas terapéuticas, requieren cantidades de proteína enormes que en ocasiones se aproximan a las toneladas (Andersen & Krummen, 2002). La mayoría de las proteínas de uso terapéutico utilizadas hoy en día se obtienen a partir de cultivos microbianos, principalmente de *Escherichia coli*, y a partir del cultivo de líneas celulares de mamífero como p.e. células CHO ('chinese hamster ovary'), NS0 (mieloma de ratón) y BHK ('syrian hamster kidney') (Andersen & Krummen, 2002; Scott, 2004b; Scott, 2004a). Actualmente, también se producen proteínas de aplicación terapéutica a partir de células de levadura (Scott, 2004b), células de insecto (Cox, 2004) y tejidos celulares vegetales. Hoy en día ya son varios los productos de uso terapéutico que se obtienen, incluso, a partir de animales y plantas transgénicos (Montgomery, 2004; Rosin, 2004). De todos estos sistemas de expresión, la bacteria gram negativa *E. coli* es la que resulta más atractiva debido a su elevada tasa de crecimiento y su capacidad de producción (hasta un 25% de la proteína total celular), el coste reducido del medio de crecimiento, su genética profusamente estudiada, y la disponibilidad de una gran variedad de vectores de expresión y de cepas hospedadoras (Makrides, 1996; Baneyx, 1999). La somatostatina, la insulina, la hormona bovina de crecimiento, la antitripsina α -1, la IL-2, el factor de necrosis tumoral, el interferón β y γ , y algunos fragmentos de anticuerpos son algunos de los ejemplos de los productos biofarmacéuticos actualmente en el mercado producidos a partir de cepas recombinantes de *E. coli* (Scott, 2004b).

No obstante, la expresión de proteínas en *E. coli* muestra también una serie de limitaciones. *E. coli*, p.e., no puede llevar a cabo las complejas modificaciones post-traduccionales (p.e. glicosilaciones) que son necesarias en muchas proteínas eucariotas, carece de mecanismos de secreción que liberan de manera eficiente la proteína expresada al medio de cultivo, y se muestra limitada a la hora de formar puentes disulfuro durante el plegamiento de las proteínas expresadas en su citoplasma. Asimismo, los elevados niveles de expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* conllevan, en ocasiones, la formación de cuerpos de inclusión, esto es, formas insolubles agregadas de la proteína expresada (Carrió-Llach, 2002). En estos casos, la obtención de formas biológicamente activas de la proteína requiere la renaturalización de los cuerpos de inclusión mediante procesos que pueden ser muy complejos y costosos. Por último, la presencia de endotoxinas pirogénicas en el producto expresado es también un problema derivado de la utilización de *E. coli* como vehículo de expresión. En este caso, las únicas soluciones posibles son la purificación exhaustiva de la proteína de interés o el cambio del sistema de expresión.

Recientemente, se ha publicado un estudio que abre nuevas expectativas sobre la glicosilación en bacterias (Schaffer & Messner, 2004). Asimismo, existen varias estrategias en la expresión de proteínas en

E. coli encaminadas a evitar la formación de cuerpos inclusión (Makrides, 1996; Baneyx, 1999; Andersen & Krummen, 2002). El cultivo de *E. coli* a 30°C en lugar de 37°C, la co-expresión de chaperonas moleculares y la expresión de proteínas fusionadas a proteínas nativas de *E. coli*, son algunas de las alternativas de expresión que se han mostrado más eficaces a la hora de evitar la agregación de la proteína expresada.

Las chaperonas moleculares forman parte del conjunto de proteínas que surgen –o incrementan su presencia– como respuesta al estrés celular. A este conjunto de proteínas, muy conservadas a lo largo de la evolución (Parsell & Lindquist, 1993), se le denomina proteínas ‘heat-shock’. Los factores de estrés celular — choque térmico, cambios de pH y osmolaridad, radiación UV, etanol, antibióticos, metales pesados, privación de fuentes de C y N, estrés oxidativo o las infecciones víricas— inducen la malformación y desnaturalización de las proteínas, y éstas, a su vez, la síntesis de las proteínas ‘heat-shock’ (Bukau, 1993). También la expresión de proteínas heterólogas, proteínas de fusión, proteínas mutantes o fragmentos de proteínas da lugar a proteínas aberrantes y mal plegadas que conllevan un aumento en la síntesis de las proteínas ‘heat-shock’ (Goff & Goldberg, 1985; Parsell & Sauer, 1989; Ito *et al.*, 1986; Kanemori *et al.*, 1994; Rinas, 1996; Hoffmann & Rinas, 2000). En *E. coli* hay actualmente descritas más de 30 proteínas ‘heat-shock’ entre las que destacan las chaperonas GroES, GroEL, Trigger Factor, DnaK, DnaJ y GrpE, las proteasas Lon, FtsH, ClpAP, ClpXP y ClpYQ, y el factor de transcripción σ^{70} (producto del gen *rpoD*) (Hayes & Dice, 1996; Baneyx, 1999; Gross, 1996). Las funciones de estas proteínas son, principalmente, la renaturalización del polipéptido dañado y la proteólisis (Schröder *et al.*, 1993; Veinger *et al.*, 1998; Hesterkamp & Bukau, 1998; Rockabrand *et al.*, 1998). Así pues, no es de extrañar que la co-expresión de chaperonas durante la expresión de la proteína de interés ayude a evitar la formación de agregados proteicos. Otras líneas de investigación más recientes evalúan estrategias de inducción de respuestas de estrés celular previas a la expresión de la proteína recombinante (Gill *et al.*, 2001). De esta manera se busca adecuar el citoplasma para minimizar una posible acumulación insoluble de la proteína de interés.

La fusión de proteínas se ideó inicialmente para facilitar la purificación e inmovilización de las proteínas así como para acercar la actividad de distintas enzimas que participan en una misma vía metabólica. Sin embargo, pronto se observó que la fusión también mejoraba la solubilidad de algunas proteínas que, de otra manera, se acumulaban formando cuerpos de inclusión. Actualmente son muchas y muy diversas las proteínas para las que se han descrito propiedades solubilizantes (Makrides, 1996), y algunas de ellas como p.e. la proteína de unión a maltosa (MBP, ‘maltose binding protein’), la tioredoxina (Trx), la glutatión-S-transferasa (GST) o la proteína NusA ya forman parte de sistemas de expresión disponibles en el mercado. El mecanismo más probable mediante el cual estas proteínas –denominadas también proteínas ‘carrier’– mejoran el plegamiento y/o reducen la degradación de la proteína fusionada se basa en la consecución rápida y efectiva de su propia conformación nativa. De esta manera, el plegamiento de la proteína ‘carrier’ inicia, y en ocasiones asiste directamente (Kapust & Waugh, 1999), el plegamiento de la proteína fusionada. La utilización de sistemas de fusión para la expresión recombinante de proteínas contempla, asimismo, el diseño de dianas para la separación química o enzimática de las proteínas fusionadas y la posterior purificación de la proteína de interés.

A pesar del enorme potencial que ofrece *E. coli* como sistema de expresión de proteínas recombinantes, su incapacidad para introducir glicosilaciones ha llevado a utilizar sistemas de expresión eucariotas para

producir glicoproteínas de aplicación terapéutica y de diagnóstico. Este es el caso de muchas glicoproteínas víricas que actualmente se expresan en células de levadura, de insecto, de animales y de plantas. La respuesta inmune que induce la gE del BoHV-1 expresada en *E. coli* es muy diferente a la que desencadena la gE nativa del virus en el hospedador natural (Rebordosa, 1996). Por ello, la gE expresada en *E. coli* no podría ser utilizada en una prueba de diagnóstico de infección por BoHV-1 (p.e. ELISA de bloqueo). Esta falta de reactividad nativa, presumiblemente debida a la ausencia de glicosilaciones, ha llevado a expresar la gE del BoHV-1 en células de insecto (Yoshitake *et al.*, 1997; Tyborowska *et al.*, 2000). Asimismo, las glicoproteínas E e I del HHV-1 (Dingwell & Johnson, 1998), del EHV-1 (Damiani *et al.*, 2000a) y del FeHV-1 (Mijnes & de Groot, 1999) se han expresado eficientemente en células de mamífero utilizando vectores víricos del tipo vaccinia y adenovirus. Las células de insecto han servido también para expresar las glicoproteínas E e I del HHV-3 (Kimura *et al.*, 1997) y del SuHV-1 (Gut *et al.*, 1999). En el caso del SuHV-1, la expresión de las glicoproteínas E e I ha permitido el desarrollo de un test ELISA gE/I de bloqueo altamente sensible y específico para el diagnóstico de infección por SuHV-1.

I.C.4.A. Precedente a este trabajo experimental

Entre los años 1991 y 1994, nuestro grupo de investigación llevó a cabo la construcción de un virus defectivo de la cepa FM del BoHV-1 para su posterior aplicación como vacuna marcadora (Rebordosa, 1996). El virus construido se llamó BHV-1 gE⁻ y la 'marca' que lo define es la delección del gen *gE*. La obtención de esta vacuna se completó con un estudio de caracterización de la gE que implicaba la expresión y purificación de formas antigénicas de la misma a partir de *E. coli* (Rebordosa, 1996). Estos ensayos de expresión constituyen los estudios preliminares al diseño de un test ELISA gE de bloqueo –desarrollado en parte en este trabajo experimental– para diferenciar serológicamente los animales vacunados con el BoHV-1 gE⁻ de los animales infectados por el virus wt. Durante esos ensayos de expresión, se comprobó que las formas expresadas de la gE no emulaban la gE nativa del BoHV-1.

El primer paso para la expresión de la gE fue la delección del gen *gE* de las secuencias codificantes para el péptido señal, el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático de la glicoproteína. La sustracción de estas secuencias se explica por la naturaleza *a priori* no inmunogénica del dominio que codifican. Así, mientras el péptido señal deviene inexistente en la forma madura de la gE vírica, el dominio citoplasmático constituye un dominio proteico no expuesto ajeno a los anticuerpos circulantes. Otro argumento esgrimido para la delección de estas secuencias es el carácter marcadamente hidrofóbico del péptido señal y del dominio transmembrana. La presencia de regiones hidrofóbicas ya era considerada por diferentes autores como una posible causa de toxicidad y de bajo rendimiento durante la expresión de proteínas heterólogas, y especialmente de glicoproteínas, en hospedadores procariontes (Sisk *et al.*, 1992). En este sentido, la presencia de estos dominios se había apuntado como la responsable en buena medida de la toxicidad registrada durante la expresión de otra glicoproteína, la gD del HHV-1, en *E. coli* (Steinberg *et al.*, 1986). Con estas modificaciones la expresión de la gE del BoHV-1 en *E. coli* se limitó, en principio, al fragmento *Sall-HindIII* codificante para la secuencia de aminoácidos comprendida entre los aminoácidos V₄₀ y A₃₇₃ del dominio extracelular.

Los primeros intentos de expresión de la secuencia V₄₀-A₃₇₃ de la gE se llevaron a cabo a partir de plásmidos que exportan el producto de expresión al periplasma de *E. coli*. El periplasma resulta ser un entorno menos reductor que el citoplasma y por ello más adecuado para el plegamiento de las proteínas mediado por cisteínas. La gran cantidad de aminoácidos cisteínas presentes en la secuencia V₄₀-A₃₇₃ justificaba el uso de estos sistemas de expresión. El plásmido de expresión escogido inicialmente fue pET-22b(+) (Novagen). No obstante, los rendimientos de expresión obtenidos fueron insuficientes. Se abordó entonces la idea de utilizar sistemas de expresión con proteínas 'carrier' o proteínas de fusión, tal y como se había descrito para la expresión de otras glicoproteínas víricas: la β-galactosidasa para la expresión de la gE del SuHV-1 (Jacobs *et al.*, 1990; Fuchs *et al.*, 1990) y la gD del EHV-1 (Love *et al.*, 1992), la polimerasa MS2 para la expresión de la gE del SuHV-1 (Fuchs *et al.*, 1990) o la GST para la expresión de la gC del EHV-1 (Crabb & Studdert, 1995). En todos estos casos el uso de la proteína de fusión había conllevado mayores niveles de expresión así como la estabilización de la proteína recombinante resultante. Para la expresión de la gE del BoHV-1 se escogió la MBP en el sistema de expresión periplasmático pMAL™-p2 (New England Biolabs). La MBP es una proteína periplasmática de *E. coli* de 42 kDa, que no presenta aminoácidos cisteínas que puedan interferir en el plegamiento de la proteína a expresar, y que se puede purificar en un solo paso mediante geles de amilosa entrecruzada. La expresión de la secuencia V₄₀-A₃₇₃ fusionada a la MBP mostró, sin embargo, cierta toxicidad que se plasmaba en la inhibición del crecimiento del cultivo y en un alto grado de proteólisis de la proteína recombinante. Se ensayó entonces la expresión de formas truncadas de la secuencia V₄₀-A₃₇₃ de la gE fusionadas a la MBP para su exportación al periplasma. Estos fragmentos correspondían a las secuencias V₄₀-Q₁₈₀, L₁₇₉-Q₂₄₆ y L₂₄₅-Q₃₆₆, y se les llamó fragmentos A4, A5 y A1, respectivamente (Fig. 12). El fragmento A4 contiene la región C1 y la secuencia GLYV/L1, el fragmento A5 abarca la región espaciadora rica en P, y el fragmento A1 incluye la región C2 y la secuencia GLYV/L2.

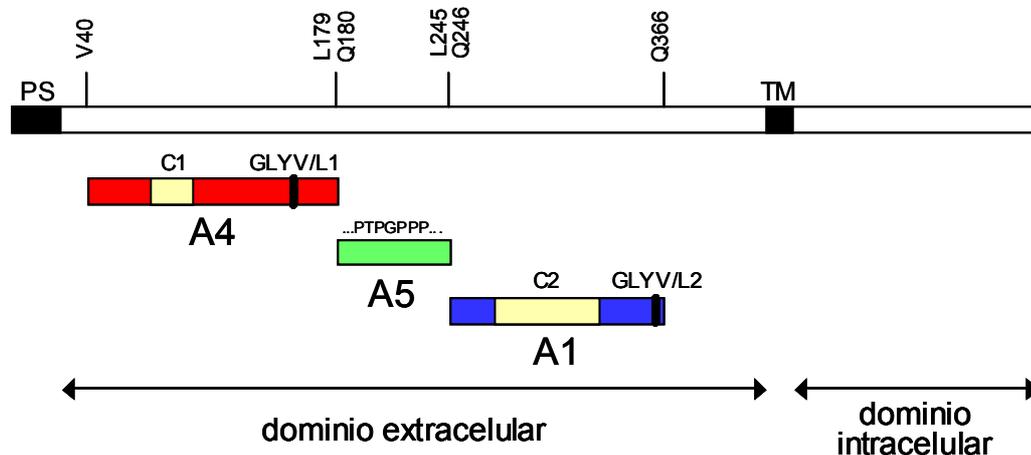


Figura 12. Diagrama de los fragmentos A4, A5 y A1 del dominio extracelular de la gE expresados en *E. coli* (Rebordosa, 1996). La barra superior representa la secuencia lineal de aminoácidos de la gE. En ella se localizan los dominios PS (péptido señal) y TM (transmembrana) que delimitan los dominios extracelular e intracelular de la proteína. Sobre la secuencia de aminoácidos se señalan aquellos que delimitan los fragmentos A4, A5 y A1. Las cajas roja y azul representan los fragmentos A4 y A1, respectivamente. Estos fragmentos contienen sendos dominios C (C1 y C2) ricos en el aminoácido cisteína, y las secuencias consenso conservadas GLYV/L (GLYV/L1 y GLYV/L2). La caja verde representa el fragmento A5 rico en el aminoácido prolina.

Durante la expresión de estos fragmentos se observó que los cultivos de expresión de A5 y A1 presentaban inhibición del crecimiento, y que en el cultivo de A1 se registraba incluso la lisis del cultivo. Por otro lado, en todos estos cultivos se detectó una elevada actividad proteolítica que mermaba la acumulación de la proteína recombinante. Así pues, ni la secuencia de aminoácidos V₄₀-A₃₇₃ de la gE del BoHV-1 ni ninguno de sus fragmentos A4, A5 o A1 exportados al periplasma de *E. coli* resultaron ser lo suficientemente estables como para rendir la cantidad requerida de gE recombinante.

El bajo rendimiento obtenido en la expresión periplasmática de la gE del BoHV-1 invitó a ensayar su expresión en sistemas de expresión citoplasmática. Las propiedades intrínsecas de la MBP, así como los muchos ejemplos de utilización de la MBP como proteína 'carrier' también en la expresión citoplasmática de proteínas, llevaron a probar la expresión de la secuencia V₄₀-A₃₇₃ y de los fragmentos A4, A5 y A1 fusionados a la forma citoplasmática de la MBP en el sistema de expresión pMAL™-c2 (New England Biolabs). Los cultivos de expresión de la secuencia V₄₀-A₃₇₃ y del fragmento A5 mostraron claros efectos de inhibición del crecimiento, y una muy escasa o nula acumulación de proteína recombinante. Por el contrario, los cultivos de expresión de los fragmentos A4 y A1 no mostraron apenas inhibición del crecimiento y las células acumulaban en su citoplasma hasta un 23% y 55%, respectivamente, de proteína recombinante. De estos ensayos de expresión citoplasmática se desprendía que existía una relación entre la inhibición del crecimiento, la no acumulación de la proteína recombinante, y la inducción de expresión del fragmento A5.

El análisis de los ensayos de expresión periplasmática y citoplasmática realizados concluyó que la expresión de estas secuencias podía dar lugar a tres tipos de problemas: i) la no acumulación del producto de expresión, ii) la inhibición del crecimiento celular, y iii) la lisis parcial del cultivo. Ciertamente se había observado que la proteólisis venía siempre asociada a un grado de inhibición del crecimiento. Por otro lado, parecía existir una relación directa entre el direccionamiento al periplasma del producto de expresión A1 y la aparición de lisis celular. En este caso se postuló que el fragmento A1 aún fusionado a la MBP podía adquirir suficiente estructura como para no poder ser translocado al periplasma. El fragmento A1 estructurado podría bloquear los mecanismos de translocación de membrana y ello conllevaría la acumulación de precursores de secreción, la activación de mecanismos 'heat-shock' y el incremento en la producción de proteasas. El resultado final bien podría ser la inhibición del cultivo e incluso la lisis celular. El otro efecto tóxico o de inhibición del crecimiento que se había observado era el relacionado con la presencia del fragmento A5. Este efecto se manifestaba independientemente de si la expresión era periplasmática o citoplasmática. El fragmento A5 tiene una secuencia aminoacídica rica en prolinas (14.7%), argininas (13.2%), treoninas (10.3%) y glicinas (8.8%) que determinan un carácter marcadamente hidrofílico con abundancia de estructuras tipo giro o lazo predichas por ordenador. Esta desestructuración podría ser fácilmente objeto de proteólisis en el citoplasma de *E. coli* y ello explicaría la no acumulación de la proteína, pero... ¿y la toxicidad?, ¿y la inhibición del crecimiento?. ¿Están directamente relacionadas la inhibición del crecimiento y la no acumulación de proteína, o son independientes?.

Estos interrogantes son los que constituyen el punto de partida del presente trabajo experimental.

II. OBJETIVOS

Los principales objetivos que se plantean al inicio de este trabajo experimental son:

1. Determinar el origen de la toxicidad asociada a la expresión de la gE del BoHV-1 en *E. coli*, y los mecanismos mediante los cuales se desarrolla dicha toxicidad.
2. Aplicar los conocimientos adquiridos durante la expresión de TRAPP a la expresión heteróloga de otras proteínas en *E. coli*.
3. Determinar la función de la secuencia TRAPP en la gE del BoHV-1.
4. Obtener un conjunto de anticuerpos monoclonales contra la gE con el objeto de desarrollar un test ELISA gE de bloqueo para el diagnóstico diferencial de infección por BoHV-1.

III. RESULTADOS y DISCUSIÓN

III.A. Acotación de una secuencia citotóxica en el fragmento A5 de la gE

Los precedentes en la expresión de la gE del BoHV-1 dejaban entrever que la expresión del fragmento A5 fusionado a la MBP resultaba ser tóxica para la célula de *E. coli* hospedadora (Rebordosa, 1996). En este apartado se exponen los resultados obtenidos en la determinación de la secuencia aminoacídica mínima responsable de dicha toxicidad. Para ello se ha obtenido delecciones anidadas de la secuencia de DNA codificante para el fragmento A5 por sus extremos 3' y 5', y se ha analizado la expresión de los distintos productos de delección fusionados al extremo Ct de la MBP. El análisis conjunto de la expresión de los productos de delección ha permitido acotar la toxicidad observada a la secuencia de aminoácidos TRAPP. La delección de esta secuencia de la gE del BoHV-1 FM ha hecho posible que por vez primera se haya expresado con éxito la secuencia casi íntegra del dominio extracelular de la gE en *E. coli*.

III.A.1. Delecciones Ct del fragmento A5. Análisis de expresión

III.A.1.A.1.a. Construcción

El plásmido de partida utilizado para subclonar la secuencia codificante del fragmento A5 ha sido el plásmido pXJ (Fig. 13A). Este plásmido es el resultado de la inserción del fragmento *Sall-EcoNI* de 1610 pb de la región US del genoma del BoHV-1 FM en el plásmido pUC119, y codifica para la secuencia de aminoácidos V₄₀-R₅₇₅ de la gE (Rebordosa, 1996). La digestión de pXJ con *SmaI* elimina un fragmento de 1033 pb codificante para la secuencia G₂₃₆-R₅₇₅ de la gE, que incluye 11 aminoácidos del extremo Ct del fragmento A5, todo el fragmento A1, el dominio transmembrana y el dominio intracelular de la proteína. El plásmido resultante se ha llamado pXJΔ*SmaI* y contiene un fragmento de 585 pb codificante para el fragmento A4 y para 55 aminoácidos del extremo Nt del fragmento A5 (Fig. 13B).

La restricción de pXJΔ*SmaI* con *SmaI* lineariza el plásmido y deja el extremo 3' de la secuencia codificante para el fragmento A5 accesible a la actividad exonucleásica de la nucleasa BAL-31 (Fig. 13C). Las digestiones llevadas a cabo con BAL-31 han tenido lugar pues en el sentido 3'→5' de la cadena de DNA codificante de dicho fragmento o, si se refiere sobre la secuencia de aminoácidos, desde la P₂₃₅ hacia la V₄₀. La digestión con *SaII* del DNA tratado con BAL-31 libera fragmentos que difieren de tamaño en función del alcance de la delección por su extremo 3'. Estos fragmentos, una vez resueltos por electroforesis horizontal en geles de agarosa y purificados, han sido insertados entre las dianas *SaII-EcoRV* del plásmido pUCBM20. Los plásmidos resultantes constituyen la serie pUΔCt (Fig. 13D), y con ellos se ha transformado células competentes XL1-Blue de *E. coli*. En el conjunto de plásmidos pUΔ4* han quedado representadas delecciones de entre 0 y 100 pb por el extremo 3' de la secuencia de DNA codificante para el fragmento A5.

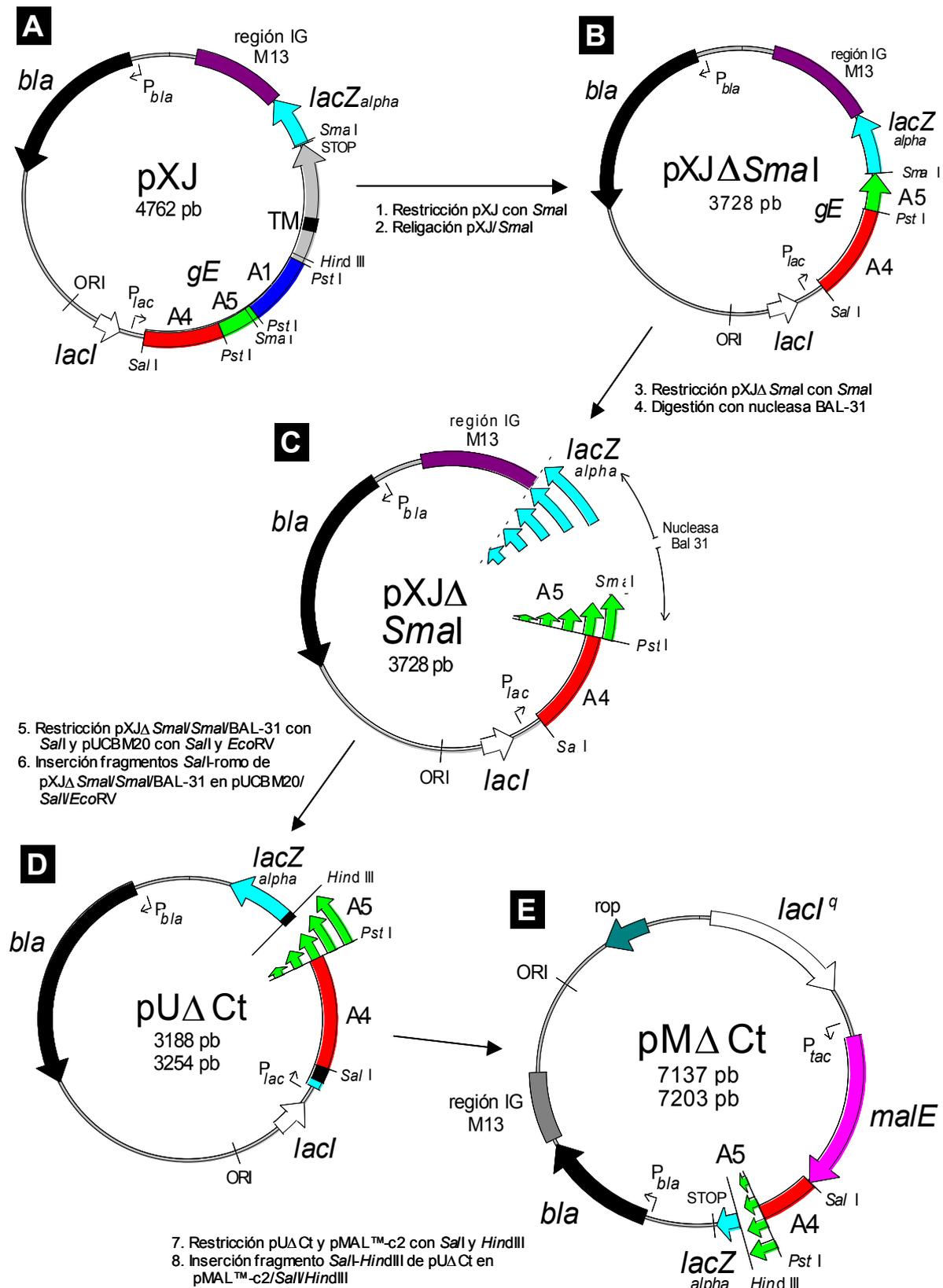


Figura 13. Diagrama de la construcción de las deleciones del fragmento A5 por su extremo Ct. **A, B, C, D** y **E** representan la secuencia de estadios diferentes del proceso, ordenada según las operaciones descritas 1. a 8. ORFs: *bla* (β-lactamasa), *lacZ_{alpha}* (subunidad β-galactosidasa de α-complementación), *lacI* y *lacI^q* (represores), *malE* (MBP); ori (origen replicación); región IG M13 (origen replicación bacteriófago M13); *P_{bla}*, *P_{lac}* (promotores); *EcoRV*, *HindIII*, *PstI*, *SalI*, *SmaI* (dianas de restricción); nucleasa BAL-31 (exonucleasa).

Se han seleccionado los clones transformantes para los plásmidos pUΔ414, pUΔ46, pUΔ410, pUΔ49, pUΔ42, pUΔ412, pUΔ41 y pUΔ43. La secuenciación del inserto de DNA contenido en estos clones confirma que las deleciones representadas se extienden hasta 91 pb desde el ácido citidílico 3' de la diana *Sma*I desde donde se inició la digestión con BAL-31 (Fig 14). Mediante una digestión *Sall*-*Hind*III se han liberado los productos de deleción de las construcciones pUΔ4* seleccionadas. Estos productos de deleción se han resuelto mediante electroforesis en geles de agarosa y, tras purificarlos (Fig 15), se han insertado en el vector de expresión pMAL™-c2 digerido con *Sall* y *Hind*III para su expresión como fusión al extremo Ct de la MBP (Fig. 13E). Los plásmidos así obtenidos se han denominado pMΔCt (pMΔ414, pMΔ46, pMΔ410, pMΔ49, pMΔ42, pMΔ412, pMΔ41 y pMΔ43), y con ellos se ha transformado células competentes XL1-Blue de *E. coli*.

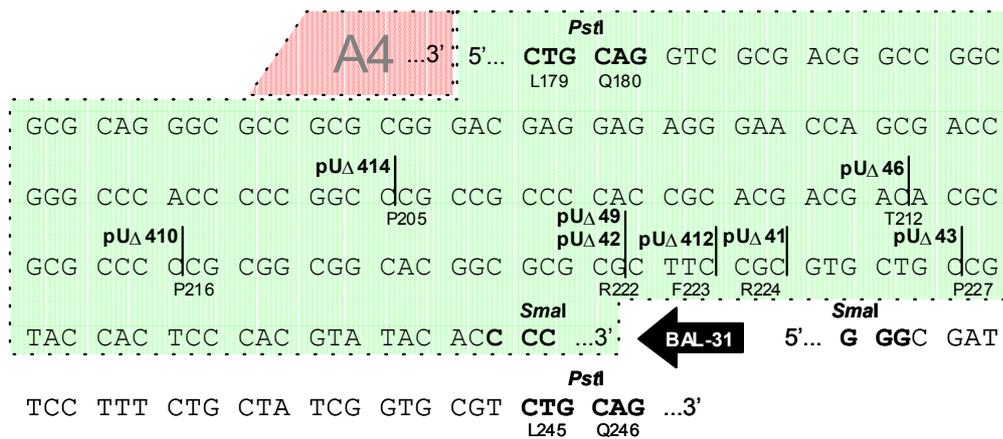


Figura 14. Diagrama de la secuencia de DNA contenida en los plásmidos seleccionados pUΔ4*. La figura muestra la secuencia de DNA codificante para A5 sobre la que se localiza el punto exacto que alcanza BAL-31 en su avance desde la diana *Sma*I. La secuencia contenida en los clones seleccionados es la que se extiende desde la diana *Pst*I en el extremo 5' hasta la línea vertical que marca el punto alcanzado por BAL-31. El nombre del clon aparece sobre la secuencia de DNA. Debajo de la secuencia se indica la posición y el aminoácido que codifica el codón en particular.

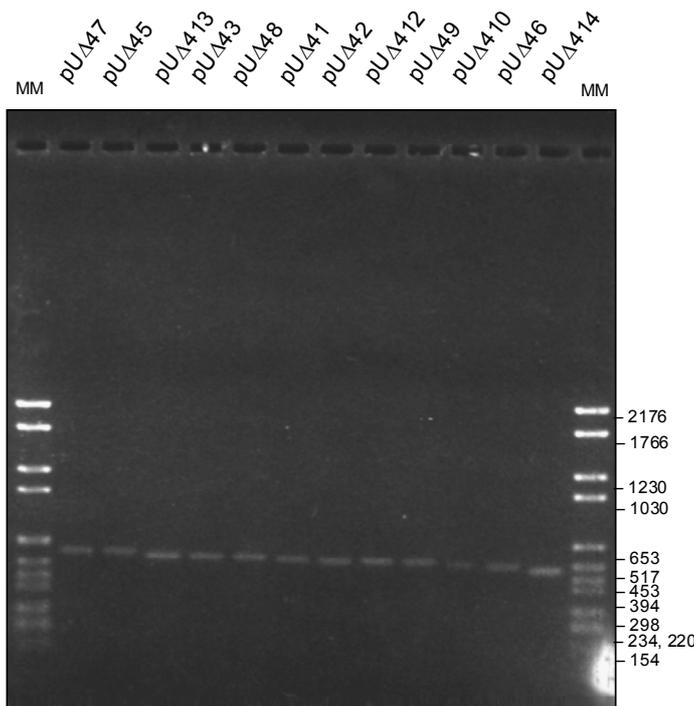


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de deleción pUΔ4* purificados (fragmentos *Sall*-*Hind*III). 'MM': marcador de peso molecular pBR328/*Bgl*I + pBR328/*Hin*fl (DNA mwm VI, Boehringer Mannheim). Los números a la derecha indican el tamaño, en pb, de los fragmentos de DNA doble hebra que componen el MM. Condiciones de electroforesis: agarosa 1.2%, 65 V, 155 min.

III.A.1.A.1.b. Expresión

La cinética de crecimiento de los cultivos de los clones transformantes pMΔCt muestra que, tras inducir la expresión de la proteína recombinante, ninguno de ellos alcanza los valores de A_{550} del cultivo control pMAL™-c2 (Fig. 16A). Partiendo de la base que la expresión de MBP a partir de pMAL™-c2 es inocua para el crecimiento de un cultivo, este resultado indica que la expresión de las formas del fragmento A5 delecionadas por su extremo Ct y fusionadas a la MBP inhibe el crecimiento celular. La cinética de crecimiento de los clones transformantes seleccionados registra, sin embargo, diferentes grados de inhibición. Los cultivos de expresión pMΔ414 y pMΔ46 registran un menor grado de inhibición del crecimiento y alcanzan valores de A_{550} comparables entre sí y siempre superiores a los de los cultivos de expresión pMΔ410, pMΔ49, pMΔ412 y pMΔ41. Los cultivos de expresión pMΔ49, pMΔ412 y pMΔ41 registran el mayor grado de inhibición del crecimiento. Esta inhibición es progresiva desde el momento de la inducción de expresión, de manera que a las seis horas post-inducción la A_{550} de los cultivos pMΔ49, pMΔ412 y pMΔ41 es sólo la mitad de la que registran los cultivos pMΔ414 y pMΔ46. El cultivo de expresión pMΔ410 presenta un grado de inhibición en todo momento intermedio con respecto a los dos grupos mencionados. Estos resultados indican que en los cultivos pMΔ49, pMΔ412 y pMΔ41 la inducción de expresión de la forma delecionada del fragmento A5 conlleva una inhibición del crecimiento mayor que en los cultivos pMΔ414 y pMΔ46. Por otro lado, la inducción de expresión de la forma delecionada de A5 en el cultivo pMΔ410 conlleva un grado intermedio de inhibición del crecimiento.

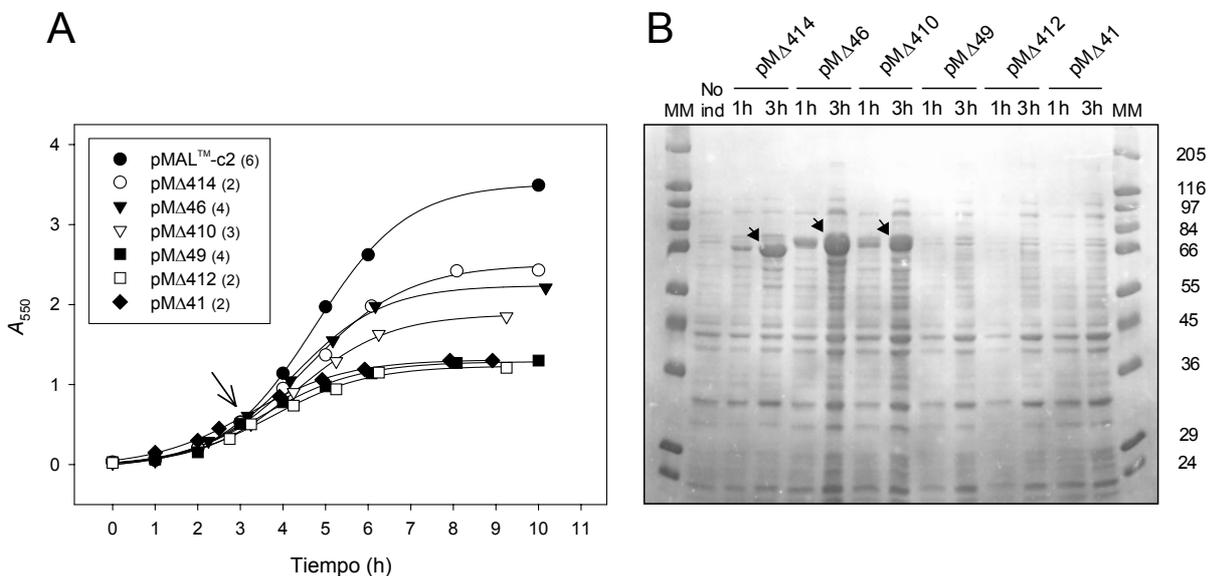


Figura 16. Expresión de los productos de deleción Ct de A5. **(A)** Cinética de crecimiento de los clones transformantes pMΔCt de *E. coli* XL1-Blue. Las curvas representadas son la media del número de cinéticas individuales que se indica entre paréntesis junto a cada clon. La flecha señala el momento de inducción de los cultivos. El clon pMAL™-c2 constituye el cultivo control. **(B)** SDS-PAGE en condiciones reductoras del extracto crudo a 1 y 3 horas post-inducción. 'No ind': extracto crudo del cultivo control no inducido. 'MM': marcador de peso molecular (Wide Molecular Weight Range Sigma Marker, Sigma). Los números a la derecha indican el tamaño, en kDa, de los polipéptidos que componen el MM. Las flechas denotan la acumulación de la proteína de fusión. Condiciones de electroforesis: gel acrilamida 12% y 0.8 mm, 12.5 mA.

El análisis por SDS-PAGE de los extractos crudos de los cultivos de expresión muestra claramente la presencia de bandas más intensas en las muestras correspondientes a los cultivos inducidos pMΔ414,

pM Δ 46 y pM Δ 410 (Fig. 16B). La migración electroforética de estas bandas se corresponde con la teórica esperada para la proteína recombinante en cada caso, y refleja por tanto la acumulación de la forma deletionada de A5 fusionada a la MBP. Por el contrario, no se detecta acumulación alguna de la proteína de fusión en los cultivos pM Δ 49, pM Δ 412 y pM Δ 41. Comparando conjuntamente los resultados de la cinética de crecimiento y de la acumulación de proteína recombinante, se observa que la mayor inhibición del crecimiento va asociada a una no acumulación de la proteína recombinante.

III.A.2. Deleciones Nt del fragmento A5. Análisis de expresión

III.A.2.A.1.a. *Construcción*

El método utilizado para obtener las deleciones anidadas 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica para el fragmento A5 ha sido el mismo que para las deleciones 3'. No obstante, se ha debido tener en cuenta que, (i) la linearización del plásmido debe dejar expuesto el extremo 5' de la secuencia codificante a la actividad exonucleásica de la nucleasa BAL-31 y, (ii) que únicamente un tercio de todo el conjunto de productos de deleción que se obtiene reproducirá la fase de lectura del gen *gE* cuando se fusione al gen *malE* en el vector de expresión pMALTM-c2.

Debido a que sólo son de interés un tercio de todo el conjunto de productos de deleción 5', se ha desarrollado un sistema que permite seleccionarlos por α -complementación. Esta selección consiste en insertar el conjunto de productos de deleción 5' entre las dianas *SmaI* y *AatII* del plásmido pUCBM20. En estas condiciones, únicamente la inserción de los fragmentos derivados de la deleción de codón+2pb respeta el marco de lectura del gen *lacZ* que se encuentra corriente abajo. En presencia de IPTG y X-Gal, sólo los clones transformantes para un plásmido que contiene un inserto como el descrito pueden expresar β -galactosidasa y adquirir color azul por la hidrólisis del cromógeno. Además, la traducción de estos productos de deleción se da fuera del marco de lectura de la *gE*, de manera que se evita seleccionar en contra la posible toxicidad de la proteína resultante. Por otra parte, se ha planteado que en el proceso de selección sean traducidos el menor número posible de aminoácidos de la *gE* para minimizar la posible interferencia con la actividad hidrolítica final de la β -galactosidasa.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el primer paso a seguir ha sido la clonación por separado de las secuencias codificantes para los fragmentos A5 y A1 de la *gE*. Los plásmidos pUC18A5 y pUC18A1 derivan de la inserción en el plásmido pUC18 del fragmento *PstI-PstI* de 198 pb codificante para A5, y del fragmento *PstI-PstI* de 360 pb codificante para A1, respectivamente (Fig. 17A, D). La orientación del inserto A5 en el plásmido pUC18A5 se ha comprobado mediante una digestión con *SmaI*.

La restricción de pUC18A5 con *BamHI* lineariza el plásmido y deja el extremo 5' de la secuencia de DNA codificante para el fragmento A5 accesible a la digestión con nucleasa BAL-31 (Fig. 17B). En este caso, mientras la actividad exonucleásica de BAL-31 tiene lugar en el sentido 3'→5' de la cadena no codificante, la actividad endonucleásica, más lenta, degrada los extremos 5' protruyentes que se generan en la cadena codificante. El resultado final es la deleción del fragmento A5 en el sentido L₁₇₉ a Q₂₄₆. La digestión con *AatII* del DNA tratado con BAL-31 libera los productos de deleción 5'. Estos productos, una vez resueltos por

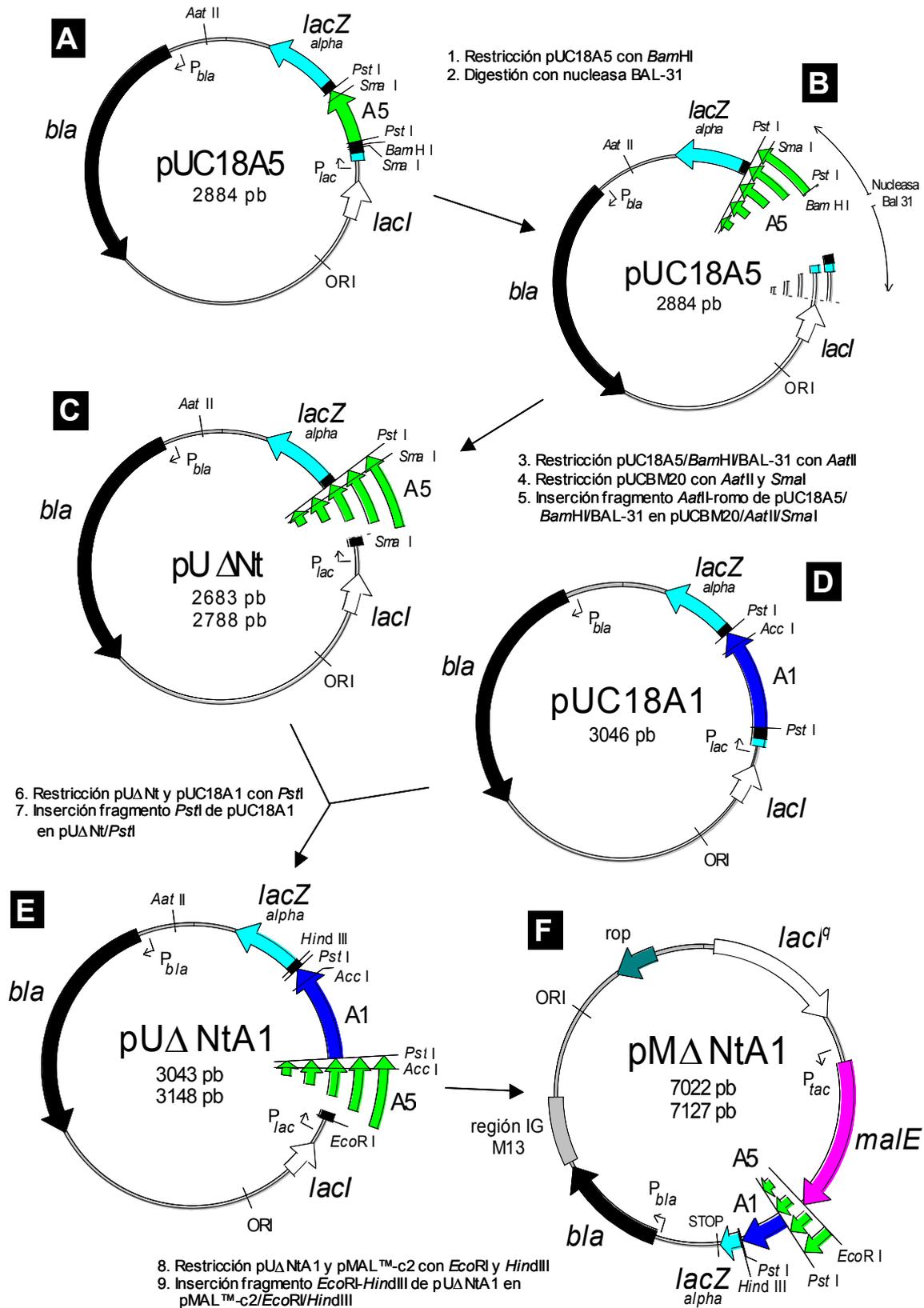


Figura 17. Diagrama de la construcción de las deleciones del fragmento A5 por su extremo Nt. **A, B, C, D, E y F** representan la secuencia de estadios diferentes del proceso, ordenada según las operaciones descritas 1. a 9. ORFs: *bla* (β-lactamasa), *lacZ*_{alpha} (subunidad β-galactosidasa de α-complementación), *lacI* y *lacI^q* (represores), *malE* (MBP); ori (origen replicación); región IG M13 (origen replicación bacteriófago M13); *P_{bla}*, *P_{lac}* (promotores); *Aat* II, *Acc* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Pst* I, *Sma* I (dianas de restricción); nucleasa BAL-31 (exonucleasa).

electroforesis y purificados, se han insertado entre las dianas *Sma*I y *Aat*II de pUCBM20 dando lugar a la serie de plásmidos pUΔNt (pUΔ3, pUΔ5, pUΔ7 y pUΔ9) (Fig. 17C). Los conjuntos de plásmidos pUΔ5* y pUΔ7* se han utilizado para transformar células competentes XL1-Blue de *E. coli*. Estas células se han cultivado en placas de LB Miller/Amp/IPTG/X-Gal y han dado lugar a una proporción aproximada de 1 colonia azul por cada 2 colonias blancas.

Entre los clones transformantes obtenidos se ha seleccionado, entre otras, las colonias azules pUΔ515, pUΔ715, pUΔ50, pUΔ726, pUΔ714, pUΔ514 y pUΔ55. La secuenciación de los insertos contenidos en estos clones prueba, ante todo, que la fase de la delección en todos ellos es la de codón+2pb. Este resultado demuestra que el método de selección ha funcionado correctamente. Las delecciones representadas en estos clones se extienden hasta 183 pb desde el punto de corte de *Bam*HI en el plásmido pUC18A5 (Fig. 18). Para corroborar la validez del método de selección, se ha secuenciado también el inserto contenido en los clones transformantes pUΔ54 y pUΔ724, crecidos de color blanco. En ambos clones, la fase de la delección ha resultado ser la de codón+1pb. La delección representada en pUΔ54 se extiende hasta el ácido citidílico 5' del aminoácido R₂₁₃, mientras que la de pUΔ724 se extiende hasta el ácido citidílico 5' de R₂₂₄.

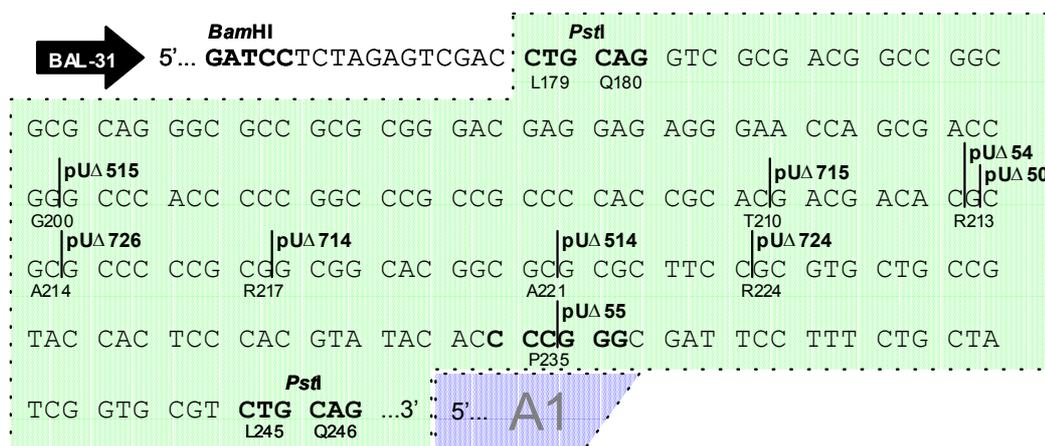


Figura 18. Diagrama de la secuencia de DNA que contienen los plásmidos seleccionados pUΔ5* y pUΔ7*. La figura muestra la secuencia de DNA codificante para A5 sobre la que se localiza el punto exacto que alcanza BAL-31 en su avance desde la diana *Bam*HI. La secuencia contenida en los clones seleccionados es la que se extiende desde la línea vertical que marca el punto alcanzado por BAL-31 hasta la diana *Pst*I en el extremo 3'. Nótese que todos los productos de delección seleccionados, a excepción de pUΔ54 y pUΔ724, resultan de deleccionar un número entero de codones + las 2 primeras bases del siguiente codón. El nombre del clon aparece sobre la secuencia de DNA. Debajo de la secuencia se indica la posición y el aminoácido que codifica el codón en particular.

A continuación, y adyacente al extremo 3' de los productos de delección seleccionados, se ha insertado el fragmento *Pst*I-*Pst*I codificante para el fragmento A1 de la gE. Este fragmento se ha obtenido a partir de la digestión con *Pst*I del plásmido pUC18A1 (Fig. 17D), y su orientación final se ha comprobado mediante digestiones *Ac*cl y *Ac*cl-*Aat*II. Los plásmidos así obtenidos constituyen la serie denominada pUΔNtA1 (pUΔ515A1, pUΔ715A1, pUΔ50A1, pUΔ726A1, pUΔ714A1, pUΔ514A1 y pUΔ55A1) (Fig. 17E). Mediante una digestión *Eco*RI-*Hind*III se ha liberado los productos de delección de las construcciones pUΔNtA1 seleccionadas. Estos productos se han resuelto mediante electroforesis y, una vez purificados, se han insertado en el vector de expresión pMALTM-c2 para su expresión como fusión Ct a la MBP (Fig. 17F). Los plásmidos obtenidos se han llamado pMΔNtA1 (pMΔ515A1, pMΔ715A1, pMΔ50A1, pMΔ726A1, pMΔ714A1, pMΔ514A1 y pMΔ55A1), y con ellos se ha transformado células competentes XL1-Blue de *E. coli*.

III.A.2.A.1.b. Expresión

La cinética de crecimiento de los cultivos de expresión de los clones transformantes p Δ NtA1 muestra que, tras inducir la expresión de la proteína recombinante, los cultivos p Δ 50A1, p Δ 726A1, p Δ 714A1, p Δ 514A1 y p Δ 55A1 alcanzan valores de A_{550} equivalentes al cultivo control pMALTM-c2 (Fig. 19A). Por el contrario, los cultivos de expresión p Δ 515A1 y p Δ 715A1 presentan una evidente y progresiva inhibición post-inducción del crecimiento. A las seis horas post-inducción, la A_{550} alcanzada por los cultivos p Δ 515A1 y p Δ 715A1 es la mitad que la que registran los cultivos control, p Δ 50A1, p Δ 726A1, p Δ 714A1, p Δ 514A1 y p Δ 55A1. Partiendo de la base que la expresión de MBP a partir de pMALTM-c2 es inocua para el crecimiento de un cultivo, estos resultados indican que la expresión de las formas delecionadas del fragmento A5 en p Δ 515A1 y p Δ 715A1 ciertamente inhibe el crecimiento celular. Por el contrario, la expresión de las formas delecionadas en los cultivos p Δ 50A1, p Δ 726A1, p Δ 714A1, p Δ 514A1 y p Δ 55A1 no inhibe el crecimiento del cultivo.

El análisis por SDS-PAGE de los extractos crudos de los cultivos de expresión muestra claramente la presencia de bandas más intensas en las muestras correspondientes a los cultivos inducidos p Δ 50A1, p Δ 726A1, p Δ 714A1 y p Δ 55A1 (Fig. 19B). La migración electroforética de estas bandas se corresponde con la esperada para la proteína recombinante en cada caso, y refleja la acumulación de la forma delecionada de A5 fusionada a la MBP. Por el contrario, no se detecta acumulación alguna de la proteína de fusión en los cultivos inducidos p Δ 515A1 y p Δ 715A1.

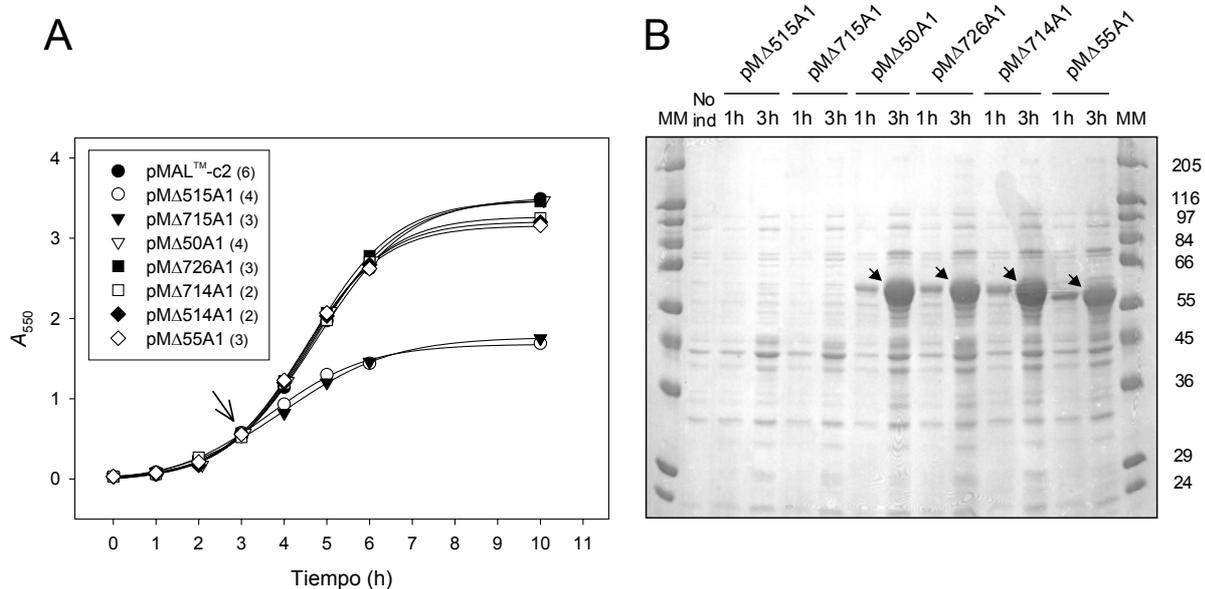


Figura 19. Expresión de los productos de deleción Nt de A5. **(A)** Cinética de crecimiento de los clones transformantes p Δ NtA1 de *E. coli* XL1-Blue. Las curvas representadas son la media del número de cinéticas individuales que se indica entre paréntesis junto a cada clon. La flecha señala el momento de inducción de los cultivos. El clon pMALTM-c2 constituye el cultivo control. **(B)** SDS-PAGE en condiciones reductoras del extracto crudo a 1 y 3 horas post-inducción. 'No ind': extracto crudo del cultivo control no inducido. 'MM': marcador de peso molecular (Wide Molecular Weight Range Sigma Marker, Sigma). Los números a la derecha indican el tamaño, en kDa, de los polipéptidos que componen el MM. Las flechas denotan la acumulación de la proteína de fusión. Condiciones de electroforesis: gel acrilamida 12% y 0.8 mm, 12.5 mA.

Comparando conjuntamente los resultados de la cinética de crecimiento y de la acumulación de proteína recombinante, se aprecia de nuevo que la inhibición de crecimiento va asociada a una no acumulación de la proteína recombinante.

III.A.3. Determinación de la secuencia TRAPP. Análisis de expresión

Los resultados de la expresión de las formas delecionadas Ct y Nt del fragmento A5 fusionadas a la MBP indican que, para cada una de ellas, existe una secuencia de aminoácidos de la gE cuya inducción de expresión va asociada a la inhibición del crecimiento del cultivo y a la no acumulación de la proteína recombinante. Al comparar entre sí la secuencia de aminoácidos de las formas delecionadas Ct y Nt del fragmento A5, se observa que las formas delecionadas Ct y Nt de los clones de crecimiento no inhibido (y acumuladores de la proteína de fusión) no solapan en su secuencia. Por el contrario, las formas delecionadas Ct y Nt de los clones de crecimiento sí inhibido (y no acumuladores de la proteína de fusión) sí solapan en su secuencia de aminoácidos (Fig. 20A).

Este solapamiento debía mostrar la zona del fragmento A5 responsable directa o indirectamente de la inhibición del crecimiento y de la no acumulación de la proteína de fusión. La construcción de una serie de plásmidos en los que se expresaran fusionadas algunas formas delecionadas Ct y Nt no tóxicas debía, *a priori*, (i) acotar más la secuencia tóxica contenida en el fragmento A5 y, (ii) hacer posible la expresión en *E. coli* de la mayor parte del dominio extracelular de la gE. En este apartado se exponen los resultados obtenidos en la construcción de estos plásmidos y en la expresión de las formas truncadas de la gE para las que codifican.

III.A.3.A.1.a. Construcción

Los plásmidos pU Δ 1178A1 y pU Δ 1190A1 se han construido a partir de los plásmidos pU Δ 46 y pU Δ 714A1 o pU Δ 726A1, respectivamente. El plásmido pU Δ 46 ha sido digerido con *Nco*I, y los extremos cohesivos generados convertidos a romo mediante una digestión con la enzima Klenow (Fig. 21A). A continuación, el plásmido pU Δ 46 linearizado se ha digerido con *Hind*III. Los plásmidos pU Δ 714A1 y pU Δ 726A1 han sido digeridos con *Eco*RI, y los extremos cohesivos resultantes convertidos a romo con la enzima Klenow

Figura 20. (Página 62) Alineamiento de los productos de deleción del fragmento A5. **(A)** Alineamiento de los productos de deleción Δ Ct (Δ Ct) y Nt (Δ Nt) seleccionados. En la parte superior se representa la secuencia de DNA y la correspondiente secuencia de aminoácidos de los productos Δ Ct, ordenados de mayor a menor deleción. La línea de puntos representa la secuencia delecionada. En la parte media se representa lo propio de los productos Δ Nt. En la parte inferior se representa la secuencia de DNA y de aminoácidos originales del fragmento A5 de la gE del BoHV-1 FM. En la secuencia de DNA de cada clon se rotula en **negrita** el último nucleótido no delecionado. Bajo la secuencia de aminoácidos se indica en **negrita** la posición y el aminoácido en A5 cuyo codón ha sido total o parcialmente delecionado. Las dianas de restricción *Sal*I, *Eco*RI y *Hind*III señalan los límites de A4-A5 Δ en los plásmidos p Δ Ct (Fig. 13E), y de Δ A5-A1 en los plásmidos p Δ NtA1 (Fig. 17F). Las líneas verticales '|' marcan un salto de secuencia entre A4 y A5 Δ (p Δ Ct), y entre Δ A5 y A1 (p Δ NtA1). Los plásmidos p Δ Ct codifican la fusión MBP-A4-A5 Δ -lacZ α . Los plásmidos p Δ NtA1 codifican la fusión MBP- Δ A5-A1-lacZ α . Bajo el nombre de cada plásmido se indica el número de aminoácidos de la proteína de fusión que codifican. La secuencia TRAPP representa la secuencia mínima de aminoácidos en la que se solapan los productos tóxicos Δ Ct (p Δ 49, p Δ 412, p Δ 41) y Δ Nt (p Δ 515A1, p Δ 715A1). **(B)** Alineamiento de la fusión de productos Δ Ct y Δ Nt (Δ Ct+ Δ Nt). p Δ 1178A1 contiene la fusión de los productos de deleción de pU Δ 46 y pU Δ 714A1; p Δ 1190A1 de pU Δ 46 y pU Δ 726A1; p Δ 4198A1 de pU Δ 414 y pU Δ 54A1; p Δ 4859A1 de pU Δ 414 y pU Δ 715A1. Los plásmidos resultantes codifican para la fusión MBP-A4-A5 Δ + Δ A5-A1-lacZ α . La expresión de estas proteínas conlleva los cambios SHEFP, HPMEANS y HPMEFP sobre la secuencia original de aminoácidos de A5. Como resultado de la fusión se introducen nuevas dianas de restricción *Eco*RI y/o *Nco*I.

(Fig. 21B). La digestión con *Hind*III de los plásmidos linearizados pUΔ714A1 y pUΔ726A1 libera un fragmento de 462 pb y 471 pb, respectivamente, codificantes para el producto de delección 5' del fragmento A5 y el fragmento A1 del gen *gE*. Estos fragmentos se han resuelto mediante electroforesis en geles de agarosa y, tras purificarlos, se han insertado entre los extremos *Nco*I/romo y *Hind*III generados en pUΔ46 (Fig. 21C). Los plásmidos resultantes se han denominado pUΔ1178A1 y pUΔ1190A1. Cabe señalar que en la operación de construcción de estos plásmidos se genera una diana *Eco*RI nueva en el punto de fusión de los productos de delección 3' y 5'. La digestión *Sal*I-*Hind*III de los plásmidos pUΔ1178A1 y pUΔ1190A1 libera un fragmento de 987 y 996 pb, respectivamente, codificantes para los fragmentos A4, A5 y A1 de la *gE*. Estos fragmentos se han insertado en el vector de expresión pMALTM-c2 linearizado con *Sal*I y *Hind*III. Los plásmidos resultantes se han denominado pMΔ1178A1 y pMΔ1190A1 (Fig. 21D), y con ellos se han transformado células competentes XL1-Blue de *E. coli*.

El plásmido pUΔ4198A1 se ha construido a partir de los plásmidos pUΔ414 y pUΔ54A1. El plásmido pUΔ414 es portador de una forma delecionada Ct no tóxica del fragmento A5 (Fig. 14, 20A). Por otro lado, el plásmido pUΔ54A1 es portador de una forma delecionada Nt que no reproduce la fase de lectura del gen *gE* cuando se inserta entre las dianas *Eco*RI y *Hind*III adyacentes al gen *malE* en el vector de expresión pMALTM-c2 (Fig. 18). El plásmido pUΔ414 ha sido digerido con *Hind*III, y los extremos generados convertidos a romo mediante la enzima Klenow (Fig. 22A). A continuación, el plásmido pUΔ414 linearizado ha sido digerido con *Aat*II. Paralelamente, el plásmido pUΔ54A1 ha sido digerido con *Eco*RI, y los extremos generados convertidos a romo con la enzima Klenow (Fig. 22B). El plásmido pUΔ54A1 linearizado se ha digerido con *Aat*II y se ha obtenido un fragmento de 947 pb codificante en parte para los fragmentos A5 y A1 de la *gE*. Este fragmento se ha insertado entre los extremos *Aat*II y *Hind*III/romo de pUΔ414. El plásmido resultante se ha denominado pUΔ4198A1 (Fig. 22C). Cabe señalar que en la operación de construcción de este plásmido se genera una diana *Nco*I nueva en el punto de fusión de los productos de delección 3' y 5' codificantes para A5. La digestión *Sal*I-*Hind*III de pUΔ4198A1 libera un fragmento de 984 pb codificante para los fragmentos A4, A5 y A1 de la *gE*, que se ha insertado en el vector de expresión pMALTM-c2 linearizado con *Sal*I y *Hind*III. El plásmido resultante se ha llamado pMΔ4198A1 (Fig. 22D), y con él se han transformado células competentes XL1-Blue de *E. coli*.

El plásmido pMΔ4859A1 se ha construido a partir de los plásmidos pUΔ414 y pUΔ715A1. El plásmido pUΔ414 contiene una forma delecionada Ct no tóxica, mientras que pUΔ715A1 contiene una forma delecionada Nt sí tóxica (Fig. 18, 20A). Al digerir el plásmido pUΔ414 con *Sal*I y *Nco*I, se ha obtenido un fragmento de 495 pb codificante para los fragmentos A4 y A5 de la *gE* (Fig. 23A). Este fragmento se ha insertado en el plásmido pET-22b(+) previamente linearizado con *Sal*I y *Nco*I. El plásmido resultante se ha denominado pEΔ414 (Fig. 23B). Paralelamente, el plásmido pUΔ715A1 ha sido digerido con *Eco*RI y los extremos del producto de digestión convertidos a romo mediante digestión con la enzima Klenow (Fig. 23C). La digestión con *Hind*III del plásmido pUΔ715A1 linearizado libera un fragmento de 480 pb codificante para los fragmentos A5 y A1 de la *gE*. Al digerir el plásmido pEΔ414 con *Sal*I y *Sac*I por un lado, y *Sac*I y *Msc*I por otro, se obtienen dos fragmentos de 222 pb y 280 pb, respectivamente. Estos fragmentos, junto con el fragmento *Eco*RI/romo-*Hind*III de pUΔ715A1 pb, se han insertado a la vez en el plásmido pUCBM20 previamente linearizado con *Sal*I y *Hind*III. El plásmido resultante se ha llamado pUΔ4859A1 (Fig. 23D). Cabe señalar que en el punto de unión de los productos de delección 3' y 5' se generan nuevas dianas *Eco*RI y *Nco*I. La digestión de pUΔ4859A1 con *Sal*I y *Hind*III libera un fragmento de 987 pb codificante para los fragmentos A4, A5 y A1 de la *gE*. Este fragmento, una vez purificado, se ha insertado en el vector de

expresión pMAL™-c2 linearizado con *SalI* y *HindIII* (Fig. 23E). El plásmido resultante se ha denominado pMΔ4859A1, y con él se han transformado células competentes XL1-Blue de *E. coli*.

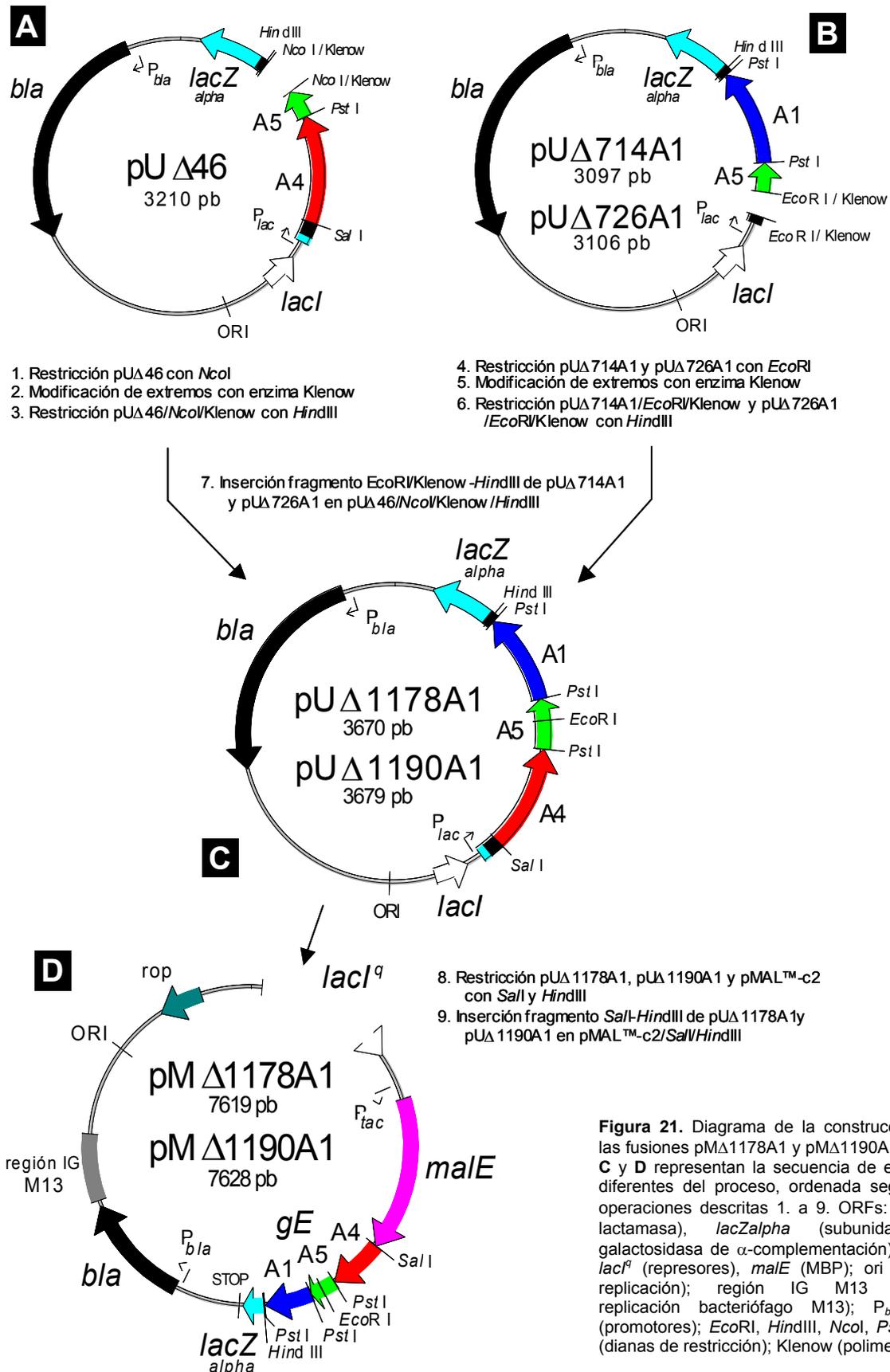
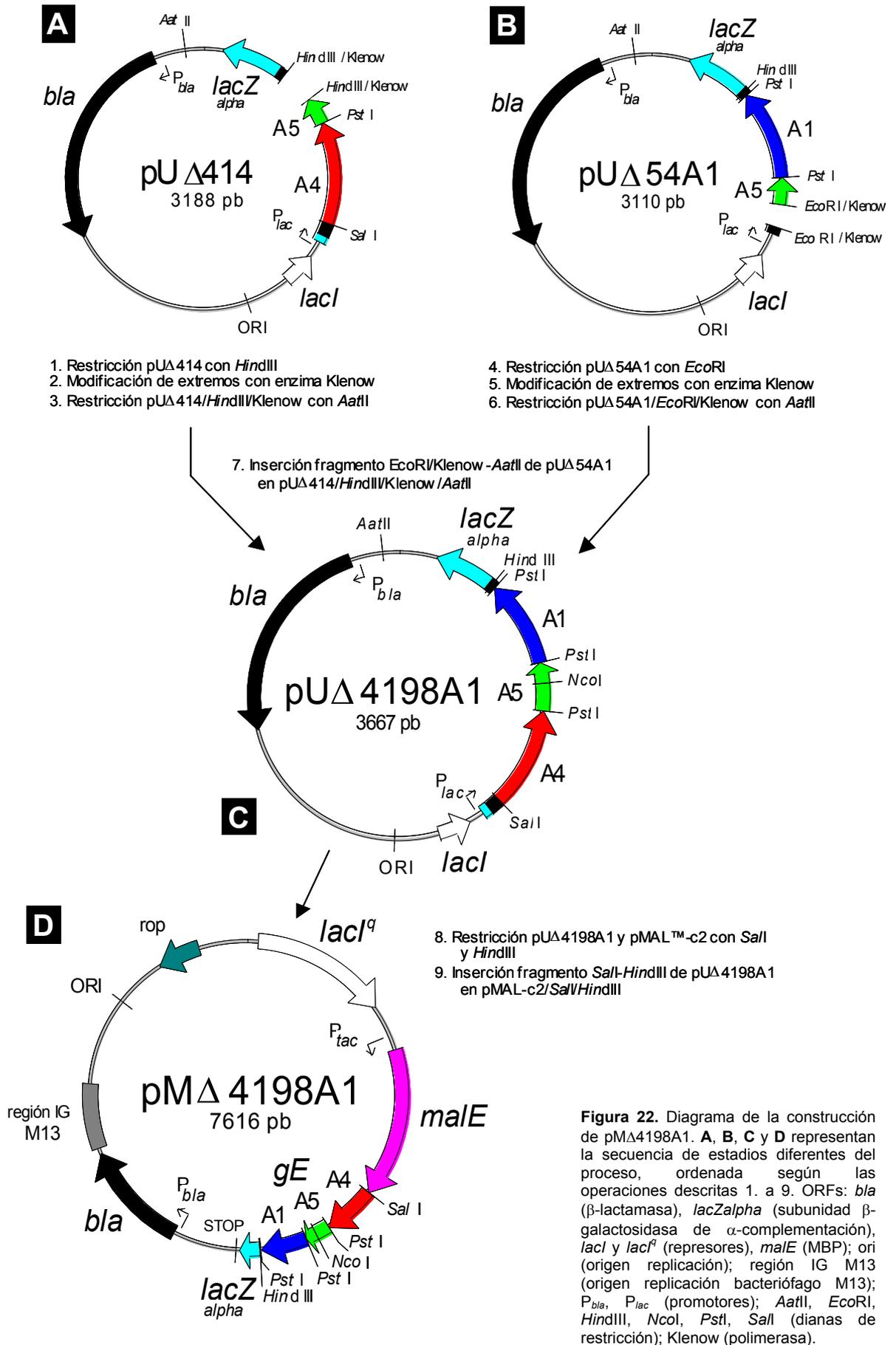


Figura 21. Diagrama de la construcción de las fusiones pMΔ1178A1 y pMΔ1190A1. **A, B, C y D** representan la secuencia de estadios diferentes del proceso, ordenada según las operaciones descritas 1. a 9. ORFs: *bla* (β-lactamasa), *lacZ*_{alpha} (subunidad β-galactosidasa de α-complementación), *lacI* y *lacI*^q (represores), *male* (MBP); ori (origen replicación); región IG M13 (origen replicación bacteriófago M13); *P*_{bla}, *P*_{lac} (promotores); *Eco*RI, *Hind*III, *Nco*I, *Pst*I, *Sal*I (dianas de restricción); Klenow (polimerasa).



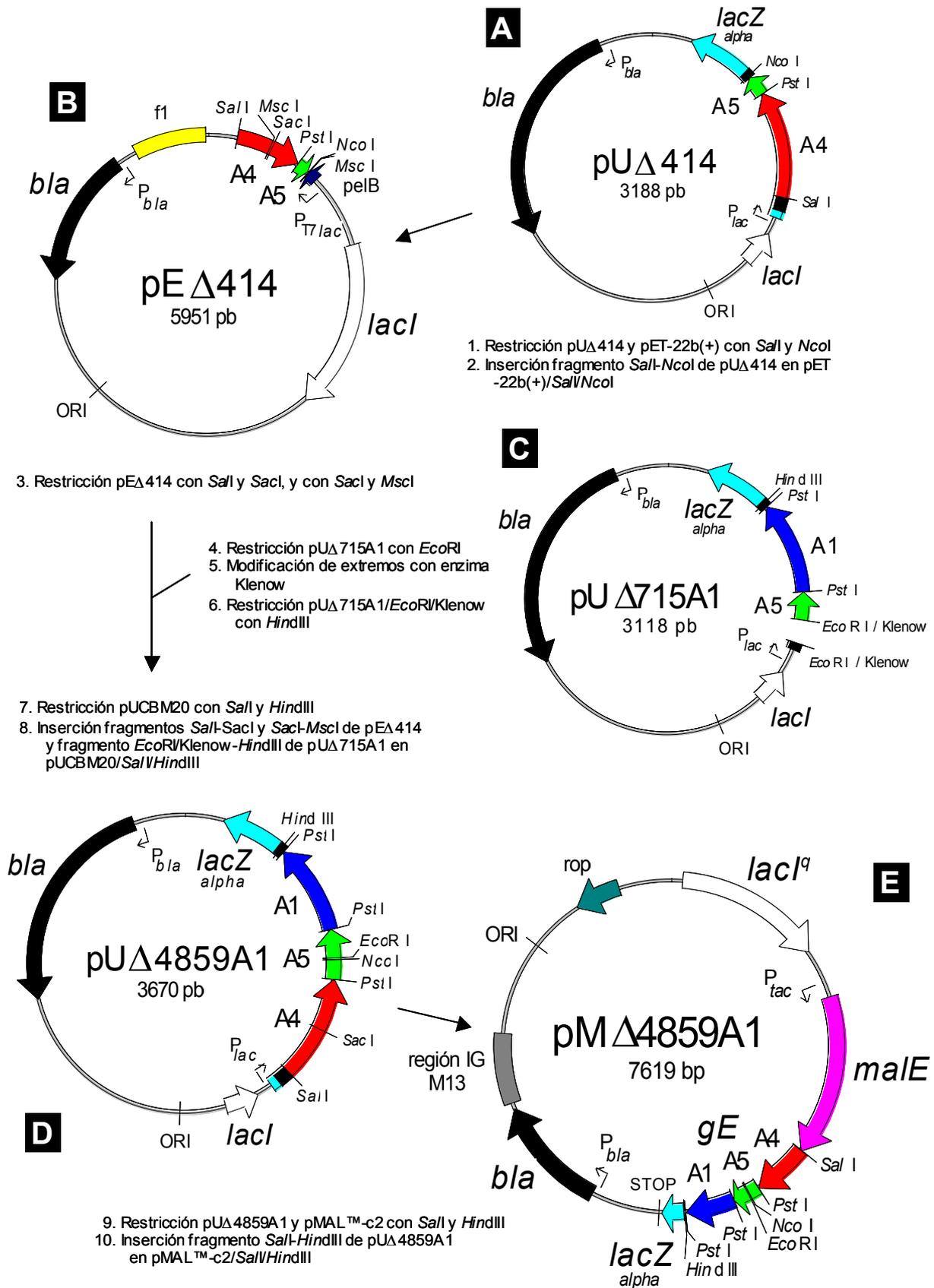


Figura 23. Diagrama de la construcción de pM Δ 4859A1. **A, B, C, D** y **E** representan la secuencia de estadios diferentes del proceso, ordenada según las operaciones descritas 1. a 10. ORFs: *bla* (β -lactamasa), *lacZ*_{alpha} (subunidad β -galactosidasa de α -complementación), *lacI* y *lacI*^q (represores), *malE* (MBP); ori (origen replicación); región IG M13 (origen replicación bacteriófago M13); f1 (origen replicación bacteriófago f1); P_{bla}, P_{lac}, P_{TTlac} (promotores); *Eco*R I, *Hind*III, *Msc*I, *Nco*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I (dianas de restricción); Klenow (polimerasa).

La fusión de los productos de delección 5' y 3' codificantes para las formas delecionadas Nt y Ct de la gE, conlleva la reconstrucción parcial de la secuencia de DNA codificante para el fragmento A5. Esta reconstrucción es parcial porque la secuencia de DNA resultante incorpora algunos cambios. Por un lado, aparecen nuevas dianas de restricción *EcoRI* y *NcoI*, y por otro, se substituye parcialmente la secuencia de aminoácidos del fragmento A5 (Fig. 20B). Estos cambios se deben a que en dicha reconstrucción participan las secuencias de DNA de las MCS que flanquean los productos de delección 5' y 3'. En los plásmidos pUΔ1178A1 y pMΔ1178A1 se da la substitución de la secuencia de aminoácidos RAPP (entre R₂₁₃ y R₂₁₇, ambos inclusive) por SHEFP. En los plásmidos pUΔ1190A1 y pMΔ1190A1, la reconstrucción conlleva la substitución de la secuencia RA (R₂₁₃ y A₂₁₄) por SHEFP y la consiguiente ganancia neta de tres aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos original. En los plásmidos pUΔ4198A1 y pMΔ4198A1 se substituye la secuencia PPPHRTTT (entre P₂₀₅ y T₂₁₂, inclusivos) por HPMEANS y ello conlleva la pérdida neta de un aminoácido respecto a la secuencia de aminoácidos original. Finalmente, en los plásmidos pUΔ4859A1 y pMΔ4859A1 se da la substitución de la secuencia PPPHRT (entre P₂₀₅ y T₂₁₀, inclusivos) por HPMEFP.

III.A.3.A.1.b. Expresión

La cinética de crecimiento de los cultivos de expresión de los clones pMΔ1178A1, pMΔ1190A1, pMΔ4198A1 y pMΔ4859A1 indica que, tras inducir la expresión de la proteína recombinante, ninguno de ellos alcanza los valores de A₅₅₀ del cultivo control pMALTM-c2 (Fig. 24A). Así pues, en todos ellos se observa inhibición del crecimiento tras inducir la expresión de la proteína de fusión MBP-gE. La cinética de crecimiento de estos clones registra sin embargo diferentes grados de inhibición. El cultivo de los clones pMΔ1178A1, pMΔ1190A1 y pMΔ4198A1 muestra un menor grado de inhibición post-inducción del crecimiento. El cultivo pMΔ4859A1, en cambio, registra un mayor grado de inhibición del crecimiento de manera que a las seis horas post-inducción el valor de A₅₅₀ alcanzado es 1.7 veces inferior al registrado por los cultivos menos inhibidos. Estos resultados indican que la inducción de expresión de la secuencia codificante para la gE en el plásmido pMΔ4859A1 conlleva una mayor inhibición del crecimiento que la inducción de expresión de las secuencias contenidas en los plásmidos pMΔ1178A1, pMΔ1190A1 y pMΔ4198A1. Cabe señalar que la inhibición del crecimiento en los cultivos pMΔ1178A1, pMΔ1190A1 y pMΔ4198A1 es similar a la observada en los cultivos pMΔ414 y pMΔ46 que expresan formas delecionadas Ct no tóxicas (Fig. 16A). Este resultado apunta a que la inhibición observada en pMΔ1178A1, pMΔ1190A1 y pMΔ4198A1 se debe principalmente a la expresión del fragmento A4 de la gE.

El análisis por SDS-PAGE de los cultivos para la expresión de las formas delecionadas Ct y Nt fusionadas, muestra claramente la presencia de bandas más intensas en el extracto crudo de los cultivos inducidos pMΔ1178A1, pMΔ1190A1 y pMΔ4198A1, pero no para pMΔ4859A1 (Fig. 24B). La migración electroforética de estas bandas se corresponde con la esperada para la proteína recombinante en cada caso, y refleja, por tanto, la acumulación del dominio extracelular de la gE fusionado a la MBP. Estos resultados muestran por vez primera la expresión en *E. coli* del dominio extracelular de la gE del BoHV-1 que se extiende desde la V₄₀ hasta la Q₃₆₆ en su secuencia aminoacídica casi íntegra. Por otro lado, y comparando los resultados de la cinética de crecimiento y de la acumulación de la proteína recombinante, se constata de nuevo que la mayor inhibición del crecimiento va asociada a una no acumulación de la proteína recombinante.

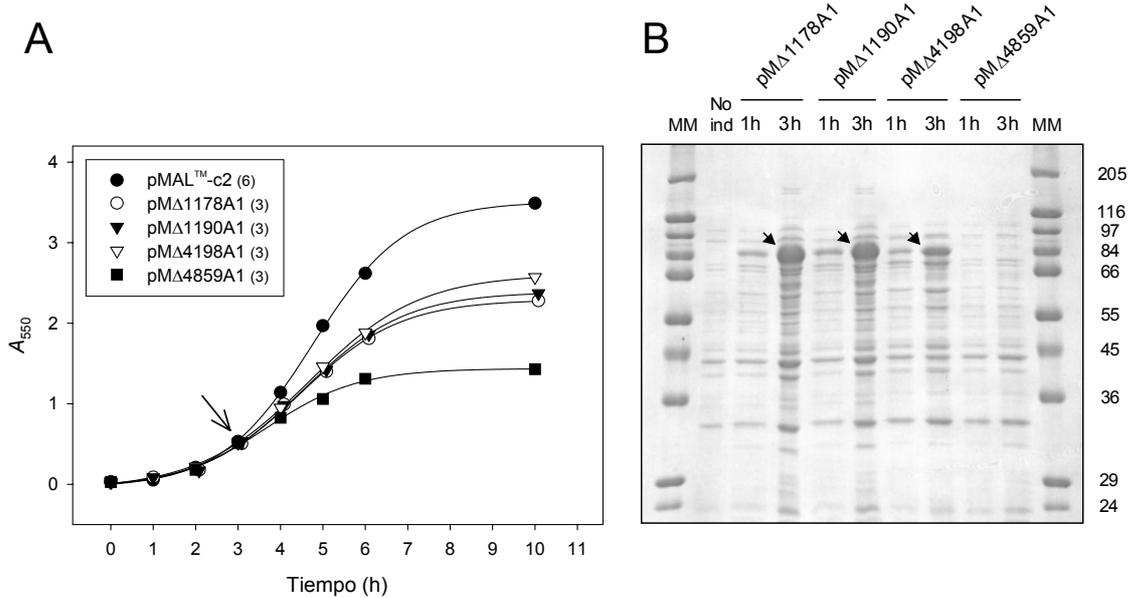


Figura 24. Expresión de las fusiones Δ Ct+ Δ Nt de A5. **(A)** Cinética de crecimiento de los clones transformantes pM Δ 1178A1, pM Δ 1190A1, pM Δ 4198A1 y pM Δ 4859A1 de *E. coli* **XL1-Blue**. Las curvas representadas son la media del número de cinéticas individuales que se indica entre paréntesis junto a cada clon. La flecha señala el momento de inducción de los cultivos. El clon pMALTM-c2 constituye el cultivo control. **(B)** SDS-PAGE en condiciones reductoras del extracto crudo a 1 y 3 horas post-inducción. 'No ind': extracto crudo del cultivo control no inducido. 'MM': marcador de peso molecular (Wide Molecular Weight Range Sigma Marker, Sigma). Los números a la derecha indican el tamaño, en kDa, de los polipéptidos que componen el MM. Las flechas denotan la acumulación de la proteína de fusión. Condiciones de electroforesis: gel acrilamida 12% y 0.8 mm, 12.5 mA.

Los resultados obtenidos prueban que la inducción de expresión de formas delecionadas Ct y Nt fusionadas no tóxicas del fragmento A5 no conlleva toxicidad al cultivo. Por el contrario, inducir la expresión de la fusión de una forma delecionada tóxica (la contenida en pU Δ 715A1) con una forma delecionada no tóxica (la contenida en pU Δ 414) sí conlleva toxicidad para el cultivo de expresión. Estos resultados permiten concluir que la secuencia de aminoácidos más corta de la gE cuya inducción de expresión conlleva la inhibición del crecimiento y la no acumulación de la proteína de fusión se halla, exclusivamente, en las formas delecionadas Ct y Nt tóxicas del fragmento A5 (pM Δ 49, pM Δ 412, pM Δ 41, pM Δ 515A1 y pM Δ 715A1) y en la fusión pM Δ 4859A1. Esta secuencia de aminoácidos es la secuencia Thr-Arg-Ala-Pro-Pro (TRAPP) y se extiende entre la T₂₁₂ y la P₂₁₆ de la gE (Fig. 20A).

Los resultados hasta ahora expuestos indican que la secuencia TRAPP de la gE del BoHV-1 es aquella cuya inducción de expresión conlleva la inhibición del crecimiento de *E. coli* y la no acumulación de la proteína de fusión. Con la finalidad de comprobar hasta qué punto se da o no la expresión de las proteínas de fusión que contienen la secuencia TRAPP en los cultivos inhibidos, se han llevado a cabo pruebas de inmunodetección sobre transferencias 'Western' utilizando anticuerpos dirigidos contra la MBP (Fig. 25). Los resultados obtenidos reflejan que, a excepción de la proteína de fusión representada en el clon pM Δ 4859A1, sí hay expresión de las fusiones MBP-gE en los cultivos de formas delecionadas Ct y Nt tóxicas. Por otro lado, se aprecia un número muy elevado de subproductos de la proteína de fusión tanto en las muestras de expresión de formas delecionadas tóxicas como no tóxicas. Estos subproductos pueden ser intermediarios de la síntesis de la proteína de fusión, o bien fragmentos de proteólisis de la fusión expresada. Con todo, la cantidad de proteína de fusión acumulada en los cultivos no inhibidos es siempre superior a aquella que se acumula en los cultivos de crecimiento inhibido. Este hecho lleva a pensar que o bien existe un grado de

proteolisis diferente para unos u otros productos de fusión, o bien el grado de proteolisis es el mismo y sin embargo la tasa de expresión diferente. De todos modos, y probada la expresión de las formas deletionadas tóxicas, se puede atribuir directa o indirectamente la toxicidad observada a la expresión de la secuencia TRAPP de la gE del BoHV-1.

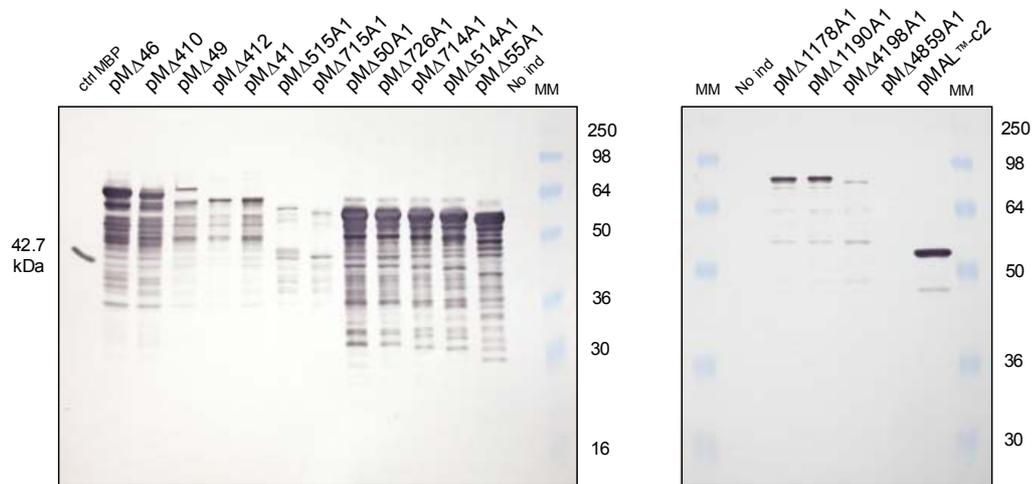


Figura 25. Análisis sobre transferencia 'Western' de la expresión de los productos Δ Ct, Δ Nt y Δ Ct+ Δ Nt de A5, fusionados a la MBP. SDS-PAGE en condiciones reductoras del extracto crudo de clones seleccionados XL1-Blue a 1 hora post-inducción: gel acrilamida 12% y 0.8 mm, 12.5-15 mA/gel, 75 min. Transferencia: 0.19-0.21 A, 60 min. Inmunodetección: dilución 1:5000 de suero policlonal anti-MBP de conejo (Protein Fusion and Purification System pMAL™-2, New England Biolabs) y dilución 1:2000 de suero policlonal anti-conejo de cabra, marcado con peroxidasa (Nordic Immunology). 'No ind': extracto crudo del cultivo pMAL™-c2 no inducido. 'ctrl MBP': proteína de 42.7 kDa expresada a partir de un derivado de pMAL™-c2 que incluye los codones de la MCS hasta la diana de restricción *XmnI* (Protein Fusion and Purification System pMAL™-2, New England Biolabs). 'MM': marcador preteñido de peso molecular (SeeBlue™ Pre-Stained Standards, Novex). Los números a la derecha indican el tamaño, en kDa, de los polipéptidos que componen el MM.