

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA

DESARROLLO Y APLICACIÓN EXPERIMENTAL DE
VECTORES VIRALES BASADOS EN GENOMAS DE
CORONAVIRUS PARA PREVENIR INFECCIONES POR
ROTAVIRUS

JUAN MANUEL RIBES FERNÁNDEZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 3 d'abril de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. Francisco Javier Ortego Alonso
- Dr. Jesús Rodríguez Díaz
- Dra. Rosa María Pintó i Solé
- Dra. Gloria Sánchez Moragas
- Dr. David Navarro Ortega

Va ser dirigida per:

Dr. Francisco Javier Buesa Gómez

Dr. Luis Enjuanes Sánchez

©Copyright: Servei de Publicacions
Juan Manuel Ribes Fernández

Dipòsit legal: V-3758-2009

I.S.B.N.: 978-84-370-7514-3

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

Desarrollo y aplicación experimental de vectores virales basados en genomas de coronavirus para prevenir infecciones por rotavirus

Juan Manuel Ribes Fernández

Dirigido por :

Javier Buesa Gómez

Luis Enjuanes Sánchez



VNIVERSITAT Æ VALÈNCIA

Departament de Microbiologia i Ecologia

Universitat de València



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Departament de Microbiologia i Ecologia

FAX 34 96 386 46 58

Facultat de Medicina i Odontologia

Tel. 34 96 386 46 58

*Av. Blasco Ibáñez, 17
46010 València*

Javier Buesa Gomez, Profesor Titular del Departament de Microbiologia i Ecologia en la Facultat de Medicina i Odontologia de la Universitat de València.

Luis Enjuanes Sánchez, Profesor de Investigación Del Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología, CSIC.

HACEN CONSTAR

que el presente trabajo de investigación titulado “**Desarrollo y aplicación experimental de vectores virales basados en genomas de coronavirus para prevenir infecciones por rotavirus**”, ha sido realizado bajo nuestra dirección por **Juan Manuel Ribes Fernández**, licenciado en Biología, para optar al título de **Doctor en Biología**, dentro del Programa de Doctorado de “**Microbiología**” (694-275D) de la Universitat de València.

En Valencia, a 6 de enero de 2009

Prof. Dr. Javier Buesa Gómez

Dr. Luis Enjuanes Sánchez

AGRADECIMIENTOS

¿Cuánto vale una tesis? En dinero miles de euros, en tiempo y esfuerzo años. Pero ¿Cuánto vale agradecer el esfuerzo conjunto de todo el mundo que ha participado en la consecución de esta tesis? Para mí mucho, desgraciadamente solo puedo pagar con mi más sincero AGRADECIMIENTO a todas las personas que han contribuido en este trabajo, a todos aquellos que con su esfuerzo, su apoyo y entrega han conseguido que este trabajo también sea un poco suyo.

Quiero empezar agradeciendo el esfuerzo y dedicación de mis codirectores de tesis, Javier y Luis.

Me gustaría seguir con aquellas personas con las que he compartido trabajo en el laboratorio (y muchas más cosas fuera de él) en la Facultad de Medicina de Valencia, en orden cronológico que no de importancia: Rebeca, Jesús, Rima, Pedro, Marta, Carlos, Nuria, Miguel, Jonathan, Ana, Manuel y Noelia. Aunque no compartieran trabajo de laboratorio no me olvido de Sergio y Toñi. Gracias a la gente del departamento que en estos años me ha soportado estoicamente: Javier, Carmen, Cristina y María.

Gracias al personal de otros departamentos de la facultad de medicina de la Universidad de Valencia por lo trabajos realizados para que esta tesis saliera adelante: Alejo y Cristina de Anatomía Patológica, Enrique de Bioquímica y al personal de Burjassot del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Valencia.

También merecen un recuerdo la gente del laboratorio de Coronavirus del Centro Nacional de Biotecnología por su apoyo: Javier, Juan, Carlos y Marta.

Han sido parte integrante de este trabajo mis amigos biólogos que han aportado su visión particular, cuando no ayuda directa: Paco, Mariola, Rocío, Iván, José, María y Lorena.

Por último, quiero dedicárselo a mi familia, en especial a mis padres, sin olvidarme de gente que ha mostrado un gran interés en este trabajo: Paco, Santiago y Adelina.

No quisiera que este apartado fuera una simple enumeración de personas, es mi más sincero agradecimiento a personas que me han ayudado de forma directa e indirecta. Directamente trabajando en el laboratorio, corrigiendo mi estilo o dando una visión nueva para que los árboles me dejen ver el bosque. De forma indirecta agradezco el compromiso a todos por haber sido mis acompañantes en una etapa de mi vida, una etapa que recordaré con cariño e ilusión.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
APN	Aminopeptidasa N (<i>aminopeptidase N</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNg	ARN genómico viral
ARNm	ARN mensajero
ARNsg	ARN subgenómico viral
BAC	Cromosoma artificial bacteriano (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
BCoV	Coronavirus bovino (<i>bovine coronavirus</i>)
BRV-TV	Vacuna recombinante tetravalente de rotavirus bovino (<i>bovine rotavirus tetravalent vaccine</i>)
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
Ca	Calcio
CAT	Enzima cloranfenicol acetiltransferasa (<i>chloramphenicol acetyltransferase</i>)
cm ²	Centímetro cuadrado
CMR	Células Caco2 transfectadas con el receptor de MHV
CMV	Citomegalovirus
CoV	Coronavirus
CS	Secuencia consenso para la transcripción (<i>core sequence</i>)
DAB	Diaminobencidina
DEAE-D	Dietilaminoetil-Dextrano
DEPC	Dietil pirocarbonato
D-MEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
EAV	Virus de la arteritis equina (<i>equine arteritis virus</i>)
EDIM	Virus de la diarrea epizootica del ratón lactante (<i>epizootic diarrhea of infant mice</i>)
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoanálisis acoplado a enzima (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ENS	Sistema nervioso entérico (<i>enteric nervous system</i>)
ERGIC	Compartimento intermedio entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (<i>endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment</i>)

FIPV	Virus de la peritonitis infecciosa felina (<i>feline infectious peritonitis virus</i>)
FITC	Conjugado con isotiocianato de fluoresceína (<i>fluorescein isothiocyanate conjugate</i>)
fMHV	Virus MHV con tropismo felino
GAPDH	Enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GC	Contenido en guaninas-citosinas
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>green fluorescent protein</i>)
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (<i>granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i>)
GUS	Enzima β -glucuronidasa (<i>β glucuronidase</i>)
HCoV	Coronavirus humano (<i>human coronavirus</i>)
HE	Hemaglutinina esterasa
hpi	Horas después de la infección (<i>hours postinfection</i>)
HR	Estructura de superenrollamiento en proteínas tipo “coiled-coil”
HRP	Enzima peroxidasa de rábano (<i>horseradish peroxidase</i>)
IBV	Virus de la bronquitis infecciosa (<i>infectious bronchitis virus</i>)
IFN	Interferón
IgA	Inmunoglobulina de clase A
IgG	Inmunoglobulina de clase G
IgM	Inmunoglobulina de clase M
IL	Interleucina
Kb	Kilobase
KDa	KiloDaltons
LUC	Enzima luciferasa (<i>luciferase</i>)
M	Molar
MEM	Medio mínimo esencial (<i>minimum essential medium</i>)
μ g	Microgramo
mg	Miligramo
μ l	Microlitro
ml	Mililitro
μ M	Micromolar
mM	Milimolar
MHV	Virus de la hepatitis murina (<i>mouse hepatitis virus</i>)
moi	Multiplicidad de infección (<i>multiplicity of infection</i>)
NCDV	Cepa de rotavirus bovina (<i>Nebraska calf diarrhea virus</i>)
nm	Nanómetro

NSP o nsp	Proteína viral no estructural (<i>non-structural protein</i>)
nt	Nucleótido
OPD	o-fenilenediamina
ORF	Paúta abierta de lectura (<i>open reading frame</i>)
pAPN-BHK	Línea celular de riñón de hámster (<i>baby hamster kidney cells</i>) que expresa la APN porcina
PBS	Tampón fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEDV	Virus de la diarrea epidémica porcina (<i>porcine epidemic diarrhea virus</i>)
pg	Picogramos
poliA	Cola de poliadeninas
pp	Poliproteína
PRRSV	Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (<i>porcine reproductive and respiratory syndrome virus</i>)
PUR46-MAD	Cepa Purdue 46-Madrid del TGEV
rpm	Revoluciones por minuto
RRV	Cepa de rotavirus de simio (<i>Rhesus rotavirus</i>)
RS	Sentido antiviral o polaridad negativa (<i>reverse sense</i>)
RT	Transcripción inversa o retrotranscripción (<i>reverse transcriptase</i>)
rTGEV	Virus TGEV recombinante
RV	Rotavirus
RV-TV	Vacuna recombinante tetravalente de rotavirus (<i>rotavirus tetravalent vaccine</i>)
S _{C11}	Proteína de la espícula del virus TGEV clon C11 con tropismo porcino
S _{MHV}	Proteína de la espícula del virus MHV con tropismo murino
S _{PTV}	Proteína de la espícula del virus TGEV cepa PTV con tropismo porcino
SARS	Síndrome respiratorio agudo y grave (<i>severe acute respiratory syndrome</i>)
SBF	Suero bovino fetal
SFV	Virus del bosque de Semliki (<i>Semliki forest virus</i>)
SINV	Virus Sindbis (<i>Sindbis virus</i>)
STAT	Señales activadoras y transductoras de la transcripción (<i>signal transducers and activators of transcription</i>)
STAT1-/-	Deficiencia homocigótica en la proteína STAT1
TGEV	Virus de la gastroenteritis porcina transmisible (<i>transmissible gastroenteritis virus</i>)
Th	Linfocito T cooperador (<i>T helper lymphocyte</i>)

TNF	Factor de necrosis tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
TRS	Secuencia reguladora de la transcripción (<i>transcription regulatory signal</i>)
uff	Unidades formadoras de focos
ufp	Unidades formadoras de placas
UI	Unidades internacionales
UTR	Región no traducida (<i>untranslated region</i>)
VEEV	Virus de la encefalitis equina venezolana (<i>venezuelan equine encephalitis virus</i>)
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLP	Partícula pseudovírica (<i>virus-like particle</i>)
VP	Proteína viral (<i>viral protein</i>)
VS	Sentido viral o polaridad positiva (<i>virus sense</i>)
wt	Silvestre (<i>wild type</i>)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Vacunas basadas en vectores virales	1
1.1.1. Expresión de genes heterólogos en virus de ARN de simple cadena de sentido positivo.....	2
1.1.1.1. Alphavirus	3
1.1.1.2. Poliovirus	5
1.1.1.3. Flavivirus.....	7
1.1.1.4. Coronavirus	8
1.2. Coronavirus.....	9
1.2.1. Características de la familia <i>Coronaviridae</i>.....	9
1.2.2. Taxonomía	9
1.2.3. Clasificación de la subfamilia <i>Coronavirinae</i>.....	10
1.2.4. Morfología y estructura del virión	12
1.2.4.1. Proteínas estructurales.....	13
1.2.4.2. Genoma	15
1.2.5. Ciclo celular de coronavirus	16
1.2.5.1. Entrada	18
1.2.5.2. Ciclo replicativo.....	19
1.2.5.3. Empaquetamiento del genoma	24
1.2.5.4. Ensamblaje de las partículas virales	26
1.2.6. TGEV	28
1.2.7. Sistemas de expresión en coronavirus	28

1.2.7.1. Sistemas de expresión dependientes de virus auxiliar	29
1.2.7.2. Sistemas de expresión de genoma único. Genética reversa	30
1.3. Rotavirus	35
1.3.1. Importancia de las infecciones por rotavirus.....	35
1.3.2. Estructura y genoma	37
1.3.3. Clasificación de rotavirus	41
1.3.4. Ciclo infectivo.....	43
1.3.4.1. Entrada	43
1.3.4.2. Transcripción y replicación.....	45
1.3.4.3. Morfogénesis y liberación de las partículas virales.....	45
1.3.5. Patología	47
1.3.6. Protección frente a la enfermedad	51
1.3.6.1. Modelo en el ratón.....	51
1.3.6.1.1. Respuesta inmunitaria humoral	51
1.3.6.1.2. Respuesta inmunitaria celular.....	54
1.3.6.2. Protección en niños tras la infección natural.....	54
1.3.6.3. Protección conferida por la vacunación	56
1.3.6.3.1. Vacuna basada en recombinantes de rotavirus humano y mono Rhesus (RotaShield).....	57
1.3.6.3.2. Vacuna basada en recombinantes de rotavirus humano y bovino (Rotateq)	58
1.3.6.3.3. Vacuna basada en rotavirus humano atenuado (Rotarix)	59
1.3.6.3.4. Vacunas en proyecto.....	61

2. OBJETIVOS	65
3. MATERIAL Y MÉTODOS	67
3.1. Células y cultivo celular	67
3.1.1. Células	67
3.1.2. Técnicas de cultivo celular	68
3.2. Virus	69
3.2.1. Coronavirus	69
3.2.1.1. TGEV	69
3.2.1.2. Virus recombinantes basados en el genoma de TGEV	70
3.2.2. Rotavirus	70
3.2.2.1. Cepa de rotavirus bovino RF	70
3.2.2.2. Cepa de rotavirus murino EDIM	71
3.3. Animales	71
3.4. Generación de los vectores recombinantes	72
3.4.1. Clonación de los genes que expresan las proteínas de rotavirus en el genoma de TGEV	72
3.4.2. Cambio de tropismo de los vectores virales basados en el genoma de TGEV	75
3.4.3. Transfección de clones infectivos de TGEV y rescate de virus recombinantes	78
3.5. Inmunofluorescencia indirecta	79
3.6. Microscopía electrónica	81
3.6.1. Preparación de muestras	81
3.6.2. Inmunomarcaje con oro coloidal	81

3.7. Extracción de ácidos nucleicos y RT-PCR.....	82
3.7.1. Obtención de muestras y extracción de ARN	82
3.7.2. Reacciones de RT y PCR.....	83
3.8. Inmunohistoquímica.....	86
3.8.1. Preparación de cortes histológicos	86
3.8.2. Inmunohistoquímica	86
3.9. Inmunizaciones	87
3.10. Determinación de anticuerpos	88
3.10.1. Niveles de anticuerpos	88
3.10.2. Titulación de anticuerpos neutralizantes.....	89
3.11. Purificación de antígeno vírico.....	90
3.11.1. Purificación de antígeno de coronavirus.....	90
3.11.2. Purificación de antígeno de rotavirus	91
3.12. Detección de citocinas	91
3.12.1. Obtención de muestras	92
3.12.1.1. Obtención del suero.....	92
3.12.1.2. Cultivo de esplenocitos	92
3.12.2. Determinación de la concentración de citocinas por citometría de flujo	92
3.13. Estudios de protección	93
3.14. Análisis estadístico	94
4. RESULTADOS.....	95
4.1. Diseño de virus recombinantes basados en el genoma de TGEV que	

codifican las proteínas VP7 y VP2/VP6 de rotavirus	95
4.1.1. Generación de virus recombinantes que expresan la proteína VP7 de rotavirus	95
4.1.1.1. Construcción de un ADNc infeccioso de TGEV que codifica la ORF7 de rotavirus	95
4.1.1.2. Obtención de virus recombinantes que expresan la proteína VP7 de rotavirus	96
4.1.2. Generación de virus recombinantes que expresan las proteínas VP2/VP6 de rotavirus	99
4.1.2.1. Construcción de un ADNc infeccioso de TGEV que codifica las ORF2 y ORF6 de rotavirus	99
4.1.2.2. Obtención de virus recombinantes que expresan las proteínas VP2/VP6 de rotavirus	100
4.2. Cambio de tropismo de los vectores recombinantes basados en el genoma de TGEV (rTGEV _{S-MHV})	104
4.2.1. Diseño de vectores virales basados en el coronavirus TGEV con tropismo para la especie murina	104
4.2.2. Obtención de virus con la proteína S quimérica (S _{MHV-A59/TGEV}) a partir de un ADNc infeccioso	106
4.2.3. Generación de vectores virales basados en el genoma de TGEV con tropismo por el ratón y que expresan proteínas de rotavirus	106
4.3. Replicación “in vitro” del virus TGEV con tropismo murino (rTGEV _{S-MHV})	109
4.4. Cinética de la replicación del virus rTGEV _{S-MHV} en diferentes tipos celulares	113
4.5. Cinética de la replicación y de la producción de la proteína heteróloga por los virus rTGEV _{S-MHV} -VP7 y rTGEV _{S-MHV} -VP2/VP6	114
4.6. Obtención de un clon estable de los virus recombinantes	118

4.7. Replicación “in vivo” del virus rTGEV_{S-MHV}	120
4.8. Estudios de inmunización en ratones	124
4.8.1. Estudio de la respuesta inmunitaria humoral	124
4.8.1.1. Anticuerpos anti-TGEV	124
4.8.1.2. Anticuerpos anti-rotavirus.....	127
4.8.2. Producción de citocinas.....	130
4.8.3. Protección en el modelo lactante frente a infecciones por rotavirus .	135
5. DISCUSIÓN	137
5.1. Expresión de genes heterólogos utilizando vectores basados en genomas de coronavirus con tropismo porcino	137
5.2. Sustitución del tropismo de especie del virus TGEV por el del virus MHV	139
5.2.1. Modificación “in vitro” del tropismo de TGEV por el de MHV	140
5.2.2. Implicaciones de la modificación del tropismo de TGEV “in vivo”	142
5.3. Expresión de las proteínas de rotavirus por los vectores murinizados....	144
5.4. Inmunización de ratones con el vector que expresa la proteína VP7 de rotavirus.....	149
5.4.1. Respuesta de anticuerpos	149
5.4.2. Respuesta de citocinas en ratones inmunizados	152
5.4.3. Protección en el modelo de ratón lactante	153
5.5. Problemas de expresión del vector rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6 para inmunizar	153
5.6. Estrategias futuras	154
6. CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFÍA	159

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Vacunas basadas en vectores virales

La vacunación es una de las medidas más importantes para prevenir las enfermedades infecciosas, junto con la mejora de los servicios sanitarios y el suministro de agua potable.

El concepto de vacunación se originó en el siglo XVIII cuando el médico inglés Edward Jenner comenzó a inocular el virus de la viruela vacuna para combatir la viruela humana. Actualmente la viruela está erradicada y otras enfermedades como la poliomielitis han desaparecido prácticamente del hemisferio norte. Se espera que otras enfermedades se erradiquen en un futuro cercano. La vacunación también ha limitado eficazmente la diseminación de muchas enfermedades infecciosas como el sarampión, las paperas, la rubéola y la hepatitis B. No obstante, hoy día los esfuerzos para desarrollar vacunas frente a otros agentes infecciosos, habituales o emergentes, como *Plasmodium falciparum*, VIH, herpes o dengue han sido hasta ahora ineficaces. A pesar de los empeños realizados no disponemos de vacunas eficaces frente a micosis o enfermedades parasitarias. Estas limitaciones se deben a la dificultad para definir claramente las dianas antigénicas que inducen una respuesta inmunitaria (tanto humoral como celular, sistémica y a nivel de mucosas) que pueda prevenir y limitar el progreso de la enfermedad. En consecuencia, se requieren nuevas tecnologías para desarrollar vacunas más seguras y mejores. Se necesitan nuevas aproximaciones, con una caracterización más detallada de la organización genética del patógeno y de los genes responsables de la inducción de la virulencia o de la inmunidad.

Actualmente estamos en una situación sin precedentes para desarrollar mejores vacunas a partir de vectores vivos. Debemos aspirar a que estos vectores sean más seguros y capaces de inducir un amplio rango de respuestas inmunitarias protectoras. Estos objetivos se podrán cumplir con el incremento del conocimiento y de la capacidad de manipular los genomas de los agentes patógenos. De los posibles vectores a desarrollar, los virus recombinantes representan nuevas estrategias vacunales especialmente prometedoras, tanto para mejorar las vacunas existentes como para desarrollar otras nuevas.

Los sistemas derivados de virus ofrecen algunas ventajas potenciales sobre las vacunas tradicionales. Éstas incluyen altos niveles de producción de los antígenos directamente en el interior de las células del hospedador, efectos adyuvantes derivados del sistema de inoculación viral (mayor potencia de la respuesta inmunitaria) y la posibilidad de una liberación eficiente del antígeno directamente a los componentes del sistema inmunitario como las células presentadoras de antígeno. La administración de vacunas derivadas de vectores virales en combinación con otras vacunas aporta una ventaja adicional.

Por tanto, los vectores virales constituyen una herramienta con un gran potencial en el campo de la vacunación. Durante muchos años las estrategias empleadas para desarrollar vacunas han sido empíricas y dependían de la inducción de anticuerpos neutralizantes para generar protección. No obstante, para algunas enfermedades infecciosas esta aproximación no tiene éxito, debido principalmente a la necesidad de generar un amplio espectro de respuestas inmunitarias que se correlacionan con la protección. Entre otras se incluyen respuesta de anticuerpos neutralizantes, de células T e inmunidad de mucosas. Los vectores virales pueden constituir la esperanza más importante para el desarrollo de una vacuna eficaz para enfermedades que requieren una respuesta inmunitaria compleja.

1.1.1. Expresión de genes heterólogos en virus de ARN de simple cadena de sentido positivo

Numerosos virus de ARN de cadena positiva se han empleado para desarrollar vectores virales que expresen genes heterólogos partiendo de clones de ADN complementario (ADNc). Estos vectores se pueden clasificar según la naturaleza de su genoma (uno o más fragmentos de ARN) y la estrategia de expresión génica (uso o no de intermediarios de ARN subgenómico). Se han desarrollado sistemas de expresión en virus de ARN de cadena positiva que son transcritos en un ARN único, tales como los picornavirus (poliovirus) y los flavivirus. Y también se han desarrollado sistemas de expresión en virus que utilizan intermediarios de ARN subgenómico, como los alfavirus.

Las principales ventajas de la aplicación de los virus de ARN de simple cadena y sentido positivo como vectores virales derivan de su estrategia de replicación. Estos virus replican y expresan sus genes únicamente a través de intermediarios de ARN. Por tanto, la replicación ocurre exclusivamente en el citoplasma de la célula infectada,

lo que proporciona una ventaja inherente de seguridad al eliminar cualquier posibilidad de integración con el ADN celular. Estos virus son los que poseen los genomas más grandes de los virus de ARN, por lo que tienen menos limitaciones de tamaño para insertar secuencias heterólogas. Además, dicho genoma funciona directamente como un mensajero, por lo que sólo se necesita empaquetar a éste en la partícula viral.

El uso eficiente de los virus de ARN como vectores está limitado en parte por nuestra comprensión incompleta del ciclo replicativo y sus restricciones. La inserción de genes foráneos en los virus de ARN frecuentemente disminuye la eficacia de la replicación del genoma de ARN y de su expresión o la del ARN subgenómico, pero desconocemos las causas. El grado de reducción de la replicación del ARN genómico varía con el gen insertado, puede ser considerable y no depender directamente de la longitud de la secuencia insertada. Esta reducción en la replicación puede volver la expresión del vector inestable genéticamente, dado que altos niveles de recombinación en el ARN conducen a la aparición de variantes con deleciones que han perdido todo o una parte del gen insertado. Estas variantes poseen un “fitness” replicativo mayor, lo que les permite superar al vector inicial. En muchos virus se desconoce cuáles son los mecanismos por los que los genes foráneos inhiben la replicación del genoma viral, lo más seguro es que impliquen requisitos desconocidos actualmente para la replicación del ARN viral. La utilidad de estos vectores puede incrementarse con una mejor comprensión de estas restricciones y de los mecanismos generales para la replicación del genoma y la síntesis del ARN.

1.1.1.1. Alphavirus

El género *Alphavirus* pertenece a la familia *Togaviridae*, que incluye a especies que son patógenas humanas. Tres miembros de este género se utilizan como vectores de expresión para su aplicación como vacunas; el virus Sindbis (SINV), el virus del bosque de Semliki (SFV) y el virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV). Debido a sus características comunes y simplicidad no existen diferencias significativas entre ellos, con respecto a su capacidad de infectar células y de expresar genes heterólogos.

El genoma de estos virus está formado por una molécula de ARN de sentido positivo, con un tamaño de unos 12 Kb, con estructura en cap, poliadenilado y que contiene dos pautas abiertas de lectura (ORFs).

Estos virus tienen interés como vectores porque pueden infectar a un gran número de células animales y expresar proteínas virales y heterólogas de forma transitoria, pero en grandes cantidades. Además existe un efecto intensificador de la respuesta inmunitaria porque algunas células infectadas con el vector finalmente pueden sufrir apoptosis, dando lugar a cuerpos apoptóticos que son fagocitados eficientemente por células presentadoras de antígenos (Albert et al., 1998). Estas características y la ausencia general de inmunidad preexistente frente a alfavirus en el hombre resaltan su potencial como vehículo vacunal.

Además se han creado vectores seguros mediante la sustitución del gen de la proteína estructural por genes heterólogos. Estos vectores de ARN son capaces de replicar pero no de empaquetarse en pseudopartículas víricas (VLPs) a menos que las proteínas estructurales se proporcionen en *trans*. Este ARN con capacidad autoreplicativa o replicón es un vector de un único ciclo, porque las partículas formadas no pueden producir progenie viral debido a la ausencia de los genes virales estructurales. Por tanto, estas partículas son incapaces de transmitirse desde la célula infectada a otras células. El empaquetamiento del replicón en partículas virales se puede conseguir mediante la cotransfección en células permisivas de replicones y un ARN auxiliar que codifica las proteínas estructurales. Este último conserva las señales para la amplificación del replicón, pero se han extraído las señales de empaquetamiento y el gen de la replicasa (Liljestrom y Garoff, 1991). No obstante, se pueden producir partículas competentes en replicación con una baja frecuencia, por medio de la recombinación entre el vector y el virus auxiliar. Este problema puede evitarse utilizando un sistema con dos virus auxiliares, en los que la cápside y las proteínas de membrana se localizan en plásmidos separados. Así se consigue reducir la probabilidad de recombinación homóloga a niveles insignificantes (Frolov et al., 1997). Otra aproximación es el desarrollo de células transformadas que expresen las proteínas estructurales virales permanentemente (Polo et al., 1999).

Una alternativa al desarrollo de partículas recombinantes de alfavirus es la administración directa de ácidos nucleicos (tanto ADN como ARN) que contienen el replicón de alfavirus. El componente clave de la inoculación es el replicón, que es el responsable de la generación rápida de unas 200.000 copias de ARN por célula como consecuencia de la replicación directa del ARN en el citoplasma (Zhou et al., 1994). Otra posibilidad es el uso de ADN plasmídico que contenga un replicón de alfavirus, estos plásmidos contienen promotores de la ARN polimerasa del hospedador para dirigir la transcripción del replicón (Herweijer et al., 1995). Una gran ventaja de esta

modalidad es su simplicidad, ya que se puede administrar directamente el plásmido de ADN. Otro beneficio de estos sistemas es que al producirse una intensa replicación del ARN en el citoplasma se reduce la dosis del ácido nucleico y mejora la eficacia para inducir una fuerte respuesta inmunitaria. Se ha visto que los replicones inducen la producción de interferón y quizás de otras citocinas.

Una ventaja adicional del uso de replicones basados en el VEEV es la capacidad, tanto del virus como de la partícula pseudovírica, para ser reconocido por las células dendríticas. Estas células pueden ser un paso intermedio importante en la presentación de antígenos a las células T y pueden inducir la estimulación de la respuesta inmunitaria (MacDonald y Johnston, 2000). De igual forma se ha podido dirigir al virus SINV hacia este tipo celular mediante una mutación en la proteína E2 (Gardner et al., 2000).

Se ha demostrado la utilidad de alfavirus como portadores de genes heterólogos para su aplicación como vacunas frente a un amplio rango de patógenos virales (por ejemplo virus influenza, VIH o el virus del papiloma humano), bacterianos (como *Chlamydia pneumoniae* o *Mycobacterium tuberculosis*) y parasitarios (como *Plasmodium falciparum*), así como de células tumorales (Lundstrom, 2003; Riezebos-Brilman et al., 2006). La mayoría de estos estudios se han realizado en el modelo experimental en ratón. No obstante, también se ha demostrado la eficacia de estos vectores en otros modelos animales tales como el hámster, el cobaya, el pollo, la oveja y el macaco.

1.1.1.2. Poliovirus

Poliovirus es un miembro de la familia *Picornaviridae*. Es un virus de ARN de polaridad positiva con un genoma de aproximadamente 7.400 nucleótidos que contiene un único ORF que codifica la poliproteína viral. En su extremo 3' posee una cola de poliadeninas, pero no posee estructura en cap en su extremo 5'.

Poliovirus es el agente causal de la poliomielitis, y por tanto, todos los vectores basados en poliovirus derivan de una cepa vacunal atenuada y bien caracterizada, la cepa Sabin. Ésta es particularmente atractiva debido a su amplia aplicación en millones de vacunas y también por su capacidad de inducir una respuesta inmunitaria robusta y duradera en humanos. Otra ventaja de la utilización de poliovirus es su fácil administración por vía oral, evitando la vía parenteral. También posee una estabilidad

inherente en el tracto intestinal. Sus células diana son las células M de la mucosa, que son las responsables de la presentación de antígenos, por lo que inducen una potente respuesta inmunitaria a nivel de mucosas (Ogra y Ogra, 1973). Además, los procesos de producción de poliovirus están bien establecidos y el virus puede replicarse a títulos altos, permitiendo la producción a bajo coste de este vector viral.

Hasta la fecha se han usado dos aproximaciones para desarrollar vacunas basadas en poliovirus: virus competentes o defectivos en replicación. En el caso de los virus competentes en replicación las proteínas de la cápside se modifican para incluir péptidos inmunogénicos de otro microorganismo dentro de la proteína de la cápside del virión. La secuencia heteróloga se flanquea por sitios de corte por proteasas. Por tanto, todos los componentes proteicos de poliovirus se producen normalmente y la replicación viral no está comprometida (Andino et al., 1994). No obstante, la cantidad de material genético foráneo que se puede introducir con esta aproximación está estrictamente limitado. En el caso de virus defectivos, los vectores de poliovirus se construyen como replicones en los que dos genes de la cápside del virión se sustituyen por el gen heterólogo. La generación de replicones de poliovirus es posible debido a que el gen viral P1, que codifica las proteínas de la cápside, no es esencial para la replicación del ARN y esta región se puede reemplazar con material foráneo (Porter et al., 1993). La liberación del gen clonado se consigue flanqueando el inserto con sitios de corte por proteasas virales. El replicón de ARN se empaqueta en VLPs mediante la transfección del ARN que expresa la región P1 de poliovirus en células infectadas con el virus auxiliar o con un virus vacuna recombinante (Porter et al., 1993). Se ha demostrado que ambas estrategias son inmunogénicas en varios sistemas experimentales como primates no humanos, utilizando varias rutas de inmunización, incluyendo la liberación en mucosas (Crotty et al., 2001).

Existen dos restricciones importantes para la utilización de vectores basados en poliovirus. La primera es la estabilidad y el tamaño del inserto del gen heterólogo (aproximadamente 200 aminoácidos) (Mueller y Wimmer, 1998). La segunda es la presencia de altos niveles de inmunidad preexistente frente a poliovirus en la población general.

1.1.1.3. Flavivirus

Los flavivirus pertenecen a la familia *Flaviviridae*. El virus prototipo de esta familia viral es el virus de la fiebre amarilla. Este virus posee un genoma no segmentado compuesto por una única molécula de ARN de simple cadena de sentido positivo de unas 11 Kb. En su extremo 5' posee una estructura en cap, pero no poseen cola de poliadeninas en su extremo 3'.

El virus 17D es una cepa atenuada que se utiliza como vacuna comercial con una extensa aplicación desde 1936. En los últimos 70 años se han vacunado más 400 millones de personas con una seguridad y eficacia sobresalientes (Monath, 2004). Esta vacuna es barata, se aplica en una única dosis y los métodos de producción están muy bien establecidos. Una única dosis subcutánea proporciona una inmunidad celular y en mucosas duradera (Poland et al., 1981). Aunque se induce protección mediada por células T no está totalmente aclarado cual es el mecanismo de acción. Se ha propuesto que el mecanismo que explica la fuerte inmunogenicidad de las vacunas basadas en la cepa 17D es que los virus recombinantes replican preferentemente en las células dendríticas del sitio de inoculación (Tao et al., 2005). Se ha demostrado que células dendríticas infectadas con la cepa 17D, o recombinantes basados en ésta son resistentes al daño viral, y procesan y presentan eficazmente antígenos a células T CD8⁺ (Barba-Spaeth et al., 2005).

El desarrollo de la tecnología de clones infecciosos ha permitido la manipulación genética del genoma de 17D para la expresión de genes foráneos. Existen diferentes aproximaciones técnicas para construir virus recombinantes basados en esta cepa. La técnica más importante es la creación de virus quiméricos con otros flavivirus mediante el intercambio de los genes estructurales prM/M/E (Lai y Monath, 2003). En el caso de otros patógenos las secuencias heterólogas se han insertado en posiciones diferentes. Se han expresado epítomos foráneos en el lazo *fg* de la proteína E (Bonaldo et al., 2002; Bonaldo et al., 2005) y también entre las proteínas no estructurales flanqueados por secuencias de proteólisis específicas para proteasas virales (McAllister et al., 2000). Recientemente se han insertado fragmentos más grandes entre las proteínas E y NS1 (Bonaldo et al., 2007). En este caso la liberación del producto se realiza al insertar secuencias de corte por peptidasas celulares. Otra estrategia ha sido la inserción de las secuencias foráneas en las región no traducible (UTR) 3' (Mutebi et al., 2004). Aunque esta región posee problemas de

estabilidad genética. Por último, se ha propuesto la expresión transitoria de genes heterólogos mediante replicones (Jones et al., 2005; Mason et al., 2006).

Este sistema viral se ha empleado para crear una vacuna para combatir la malaria. Se ha conseguido reducir la carga parasitaria en el modelo murino de la malaria mediante la expresión de un epítipo de *Plasmodium yoelii* que es reconocido por linfocitos T citotóxicos (Tao et al., 2005). Además, cuando se ha insertado la secuencia repetida de *P. falciparum* en el lazo *fg* de la proteína E, el virus resultante es capaz de inducir anticuerpos frente a la proteína del esporozoíto en el modelo en ratón (Bonaldo et al., 2002). También se ha demostrado la protección de cobayas frente al virus de la fiebre de Lassa (Bredenbeek et al., 2006).

La principal limitación de este sistema es que la capacidad actual para expresar genes foráneos para 17D es de alrededor de 1'5 Kb. En el caso de enfermedades en las que sea importante la edad de inoculación, como es la malaria, la principal restricción es que la vacuna está contraindicada para su administración en niños menores de 6 meses de edad.

1.1.1.4. Coronavirus

Las características de este virus y en concreto su aplicación como vector viral para el desarrollo de vacunas constituyen el objeto de esta tesis, por lo que se le dedica el siguiente apartado.

1.2. Coronavirus

1.2.1. Características de la familia *Coronaviridae*

Los coronavirus son virus de importancia veterinaria y médica. Son una familia de virus de ARN con envuelta, que están ampliamente distribuidos entre aves y mamíferos, incluido el hombre. Coronavirus causa enfermedades entéricas o respiratorias principalmente, pero en algunos casos desencadenan otras enfermedades al infectar el sistema nervioso central, el hígado o el riñón (Lai y Holmes, 2001). En los últimos años se ha intensificado el interés por el estudio de esta familia debido a la identificación de un nuevo patógeno emergente, el SARS-CoV, que es el agente etiológico del síndrome respiratorio agudo y grave (SARS en inglés). Este patógeno, que fue descubierto en el año 2003, causa neumonía y provoca la muerte en un 10% de las personas infectadas (Enjuanes et al., 2007; Marra et al., 2003; Rota et al., 2003).

La característica más distintiva de esta familia es el tamaño de su genoma, ya que posee el genoma más grande de todos los virus de ARN, incluyendo los virus de ARN de genoma segmentado. Éste oscila entre 27 y 31'5 Kb. Su alta capacidad de codificación exige y posibilita una gran variedad de estrategias de expresión génica. Por ello, a nivel molecular coronavirus se caracteriza por cumplir un complejo programa de expresión génica que emplea una gran variedad de estrategias inusuales. Las más importantes son que para la replicación del genoma es necesario que se produzca un cambio de pauta de lectura ribosómica durante la transcripción, que en la replicación se origine la síntesis de una especie de ARN genómico (ARNg) y de múltiples subgenómicos (ARNsg) y que el ensamblaje de los viriones se produzca por una vía que es única entre los virus de ARN envueltos.

1.2.2. Taxonomía

Los coronavirus se clasifican dentro de la familia *Coronaviridae*. Esta familia agrupa a las subfamilias *Coronavirinae* y *Torovirinae*. La subfamilia *Coronavirinae* incluye a tres géneros: α , β y γ . La subfamilia *Torovirinae* está compuesta por los géneros *Torovirus* y *Bafinivirus* (Enjuanes et al., 2008). Esta clasificación es una propuesta provisional al "International Committee on Taxonomy of Viruses" (ICTV), que se decidió en la última reunión del "International Coronavirus Study Group" (Oxford, Julio 2008).

La familia *Coronaviridae* se ha agrupado junto con las familias *Arteriviridae* (que contiene al género *Arterivirus*) y *Roniviridae* (formada únicamente por el género *Okavirus*) en el orden *Nidovirales*. Este nivel de organización superior reconoce una relación entre estas familias que las diferencia de los otros virus de ARN de sentido positivo y no segmentado. La característica más notable de los nidovirus es que su expresión génica se realiza a través de la transcripción de un conjunto de ARNs subgenómicos 3' coterminales. Esta cualidad da origen al nombre del orden, que deriva del latín *nidus*, "nido" (Enjuanes et al., 2000b). Además, la producción de estos ARNm coterminales se realiza después de un proceso de transcripción discontinua característico (Enjuanes et al., 2006). Otra característica que comparten las familias de este orden son que las ORF 1a y 1ab, que son las ORFs más largas y próximas al extremo 5' y ocupan dos tercios del genoma, son traducidas directamente del ARN genómico y se solapan parcialmente. Estas dos ORFs codifican las subunidades de la maquinaria de replicación y es necesario un cambio de pauta de lectura ribosómico para su expresión completa. Estas subunidades se originan por la proteólisis autocatalítica mediada por la poliproteínas pp1a y pp1ab codificadas por los genes ORF 1a y ORF 1ab, respectivamente. Por último todos los nidovirus presentan una proteína transmembrana que atraviesa varias veces la membrana en el virión.

Las diferentes familias de los nidovirus divergen entre sí de distintas formas, las más importantes son por el número, tipo y tamaño de las proteínas estructurales del virión.

1.2.3. Clasificación de la subfamilia *Coronavirinae*

La subfamilia *Coronavirinae* contiene tres géneros (α , β y γ). Estos géneros se han diferenciado de forma práctica utilizando 4 parámetros (Spaan et al., 2006), aunque no se han seguido directrices rigurosas para aplicar estos criterios a la hora de definir nuevas especies o distinguir las existentes. Los parámetros son:

1. Propiedades antigénicas. La caracterización serológica permite situar a un virus dentro de un grupo antigénico, pero esta clasificación tiene el inconveniente de que refleja las propiedades de un número limitado de proteínas virales. Por ejemplo, en el caso de TGEV se han dado casos de virus claramente relacionados que no son serológicamente reactivos (Sanchez et al., 1990). Por tanto, la comparación de secuencias entre genomas virales (o aminoácidos) ha sido la base para la clasificación en 3 géneros (Gorbalenya et al., 2004) (Tabla 1.1).

Género	Acrónimo	Especie	Hospedador	Diana
α	TGEV	Virus de la gastroenteritis porcina transmisible	Cerdo	Aparato digestivo
	PRCoV	Coronavirus respiratorio porcino		Aparato respiratorio
	FIPV	Virus de la peritonitis infecciosa felina	Gato	Macrófagos
	CCoV	Coronavirus canino	Perro	Aparato digestivo
	HCoV-229E	Coronavirus humano cepa 229E	Humano	Aparato respiratorio
	HCoV-NL63	Coronavirus humano cepa NL63		Aparato respiratorio
	Bat-CoV	Coronavirus de murciélago	Murciélago	Aparato respiratorio
β	MHV	Virus de la hepatitis murina	Ratón	Hígado
	RCoV	Coronavirus de rata	Rata	Aparato respiratorio
	BCoV	Coronavirus bovino	Vaca	Aparato digestivo
	HEV	Virus de la encefalomielitis aglutinante porcina	Cerdo	Sistema nervioso central
	CRCoV	Coronavirus respiratorio canino	Perro	Aparato respiratorio
	HCoV-OC43	Coronavirus humano cepa OC43	Humano	Aparato respiratorio
	SARS-CoV	Síndrome respiratorio agudo y grave		Pulmón
	HCoV-HKU1	Coronavirus humano cepa HKU		Aparato respiratorio
	Bat-SARS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio agudo y grave del murciélago	Murciélago	Aparato respiratorio
γ	IBV	Virus de la bronquitis infecciosa	Pollo	Aparato respiratorio
	TCoV	Coronavirus del pavo	Pavo	Riñón
	PhCoV	Coronavirus del faisán	Faisán	Aparato digestivo

Tabla 1.1. Clasificación de especies de coronavirus en tres géneros. Se indican especies características de cada grupo, así como su hospedador y diana.

2. La posición y variedad de las proteínas no estructurales y no esenciales en el extremo 3' del genoma. El número, tipo y localización de los genes no esenciales (que codifican las proteínas no estructurales) varía significativamente entre diferentes aislados de coronavirus. Algunos de estos genes son comunes para un conjunto de virus estrechamente relacionados y otros pueden ser específicos para una especie de virus. Sin embargo, se ha observado que diferentes aislados del mismo coronavirus pueden también diferir respecto a ciertas ORFs localizadas hacia el extremo 3'.

3. El procesamiento de la proteína S en dos mitades (S1 y S2). Todos los coronavirus se pueden agrupar en dos divisiones dependiendo de si la proteína S se procesa en dos subunidades (S1 y S2) o no. La proteína S no sufre proteólisis en el género α (TGEV, CCoV y FCoV). En cambio, los géneros β y γ sí que procesan la proteína S.

4. El rango del hospedador. Casi todos los coronavirus de los géneros α y β tienen hospedadores de mamíferos, los coronavirus que infectan humanos pertenecen a estos grupos. Coronavirus infecta un amplio rango de mamíferos, aunque coronavirus poco relacionados pueden infectar al mismo hospedador. En cambio, los virus del género γ sólo se han aislado de hospedadores aviares.

1.2.4. Morfología y estructura del virión

Coronavirus tiene una forma aproximadamente esférica y moderadamente pleomórfica. El virión posee un diámetro medio de entre 80 y 120 nm. En su superficie presenta proyecciones de 17-20 nm, que se ensanchan hasta 10 nm en el extremo distal. Estas proyecciones se llaman espículas o peplómeros y corresponden a trímeros de la glicoproteína S, éstas le dan al virus un aspecto parecido al de una corona solar, de ahí el nombre de la familia. Algunos coronavirus como MHV y BCoV poseen proyecciones adicionales formadas por la proteína hemaglutinina esterasa (HE).

Otra característica distintiva de la familia *Coronaviridae* es que sus miembros poseen nucleocápsides de simetría helicoidal. Esta organización es típica de los virus de ARN de cadena negativa, pero casi todos los virus animales de ARN de cadena positiva poseen cápsides icosaédricas. Sin embargo, en estudios de microscopía electrónica de viriones de TGEV se ha observado simetría esférica, posiblemente icosaédrica, en una estructura que sólo adopta una forma de nucleocápside helicoidal

tras el tratamiento de los viriones con Tritón X-100 (Escors et al., 2001; Risco et al., 1996).

1.2.4.1. Proteínas estructurales

Las proteínas estructurales que componen el virión se muestran en la Figura 1.1 y son:

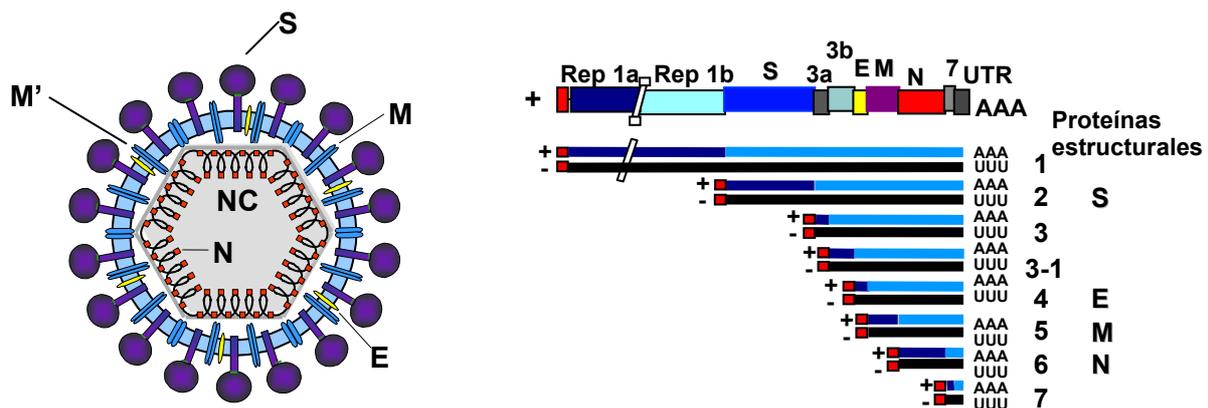


Figura 1.1. Estructura del genoma y proteínas del virión de coronavirus. **A.** Diagrama esquemático de la estructura del virión. El virión está formado por una envuelta lipídica a la que se asocian las proteínas estructurales de la espícula (S), de membrana (en sus dos conformaciones M y M') y de la envuelta (E). La proteína N se asocia al genoma viral formando la nucleocápside (NC). **B.** Representación del genoma y ARNs subgenómicos del coronavirus TGEV. Se muestra el conjunto de mensajeros de sentido negativo y positivo producidos en una célula infectada y el producto obtenido de cada ARN de cadena positiva. Las colas de poliadeninas y poliuracilos están representadas por AAA y UUU respectivamente.

➤ **La proteína de la espícula (S).** Es la responsable de la unión al receptor celular y de la fusión de la membrana viral y celular (Collins et al., 1982). Es una proteína altamente glicosilada que posee un gran peso molecular en un rango de 150 a 200 KDa. Esta proteína se ensambla en trímeros (Delmas y Laude, 1990; Song et al., 2004) y es una proteína transmembrana. El ectodominio constituye la mayor parte de la molécula y el dominio transmembrana y el endodominio forman un pequeño segmento que contiene el extremo carboxilo-terminal (71 o menos de un total de 1.162-1.452 residuos). En la mayor parte del género β y del género γ la proteína S sufre procesamiento por proteasas tipo tripsina del huésped. La proteólisis origina dos polipéptidos, S1 (con el extremo amino-terminal) y S2 (con el extremo carboxilo-

terminal), que tienen un tamaño aproximadamente igual. El dominio S1 es la región más divergente de la molécula. El modelo de la estructura de la espícula de coronavirus de Groot et al. (1987) propone que el dominio S1 constituye la porción bulbosa de la espícula y la porción alargada es una estructura helico-helicoidal formada por la asociación de monómeros del dominio S2 por medio de regiones repetidas de 7 aminoácidos (HR).

➤ **La proteína de membrana (M).** Es una glicoproteína y es el constituyente más abundante del virión (Sturman, 1977; Sturman et al., 1980). Es la responsable de conferir la forma a la envuelta del virión. Posee un tamaño de 25-30 KDa (221-262 aminoácidos). Es una proteína transmembrana que atraviesa la membrana varias veces. Esta proteína expone su dominio amino-terminal fuera del virión o en el retículo endoplasmático y está glicosilado. Por otra parte, su dominio carboxilo-terminal se localiza en el interior del virión o del citoplasma, junto con la mayor parte de la molécula (Rottier, 1995).

➤ **La proteína de la envuelta (E).** Es un pequeño polipéptido, con un tamaño de 8'4-12 KDa (76-109 aminoácidos). Es un componente minoritario del virión y de función incierta.

➤ **La proteína de la nucleocápside (N).** Tiene un tamaño de 43-50 KDa y junto con el genoma compone la nucleocápside. Se une al ARN genómico como las cuentas de un rosario (Laude y Masters, 1995). Además de su función estructural se han propuesto una serie de actividades potenciales. Se postula que participa en la transcripción viral (Baric et al., 1988; Choi et al., 2002; Stohlman et al., 1988). Esta actividad deber ser moduladora pero no esencial. También se ha aventurado que la proteína N se une a la secuencia líder del ARN para lograr la traducción preferente de los ARNm virales (Tahara et al., 1994; Tahara et al., 1998), aunque los datos que apoyan esta hipótesis son todavía incompletos. Por último, también se ha observado que la proteína N incrementa la eficacia de la replicación de ARNs genómicos o de replicones en los sistemas de genética reversa, en los cuales la infección viral se inicia desde un ARN viral modificado genéticamente (Almazan et al., 2004; Schelle et al., 2005; Thiel et al., 2001a; Yount et al., 2002). Este hecho puede ser indicativo de un papel directo de la proteína N en la replicación, aunque también es posible que la mejora se deba a la continua traducción de un complejo de la replicasa limitado. Recientemente se ha demostrado que la proteína N del virus TGEV y SARS-CoV posee actividad chaperona de ARN (Zuniga et al., 2007). La presencia de esta

actividad en dos grupos diferentes puede indicar que ésta sea común a todos los grupos.

Todos los genomas de coronavirus contienen ORFs adicionales en un amplio rango de configuraciones. Estos genes “extra” que codifican para proteínas no estructurales (nsp), se sitúan entre los genes estructurales con distribuciones muy diversas. Estos genes varían desde tan poco como uno (por ejemplo PEDV y HCoV-NL63) hasta ocho genes (SARS-CoV). Muchos de estos genes accesorios requieren mecanismos de traducción no estándar para su expresión (Liu et al., 1991).

El origen de estos genes es incierto. Se ha especulado que se han adquirido horizontalmente de fuentes celulares o virales heterólogas, pero sólo existen evidencias para los genes 2 (HE) y 2a del género β . La mayoría de los genes accesorios no presentan homología con secuencias virales o celulares de bases de datos. Por tanto, es concebible que muchos de estos genes hayan evolucionado en coronavirus individuales por degeneración de ORFs del propio genoma del virus.

Algunos genes accesorios codifican funciones “lujosas” para sus respectivos virus y otros pueden ser ancestros genéticos. En todos los casos examinados los genes de proteínas accesorias no son esenciales para la replicación en cultivo celular, por ejemplo el gen 7 de TGEV (Ortego et al., 2003). De forma similar, algunos genes de proteínas accesorias no parecen jugar ningún papel en la infección del hospedador natural. Sin embargo, la interrupción del gen 7 de TGEV reduce enormemente la replicación viral en el pulmón e intestino de cerdos infectados (Ortego et al., 2003). En una aproximación contraria, la inserción mediante ingeniería genética del gen 6 del SARS-CoV potenció considerablemente la virulencia de una variante atenuada del MHV (Pewe et al., 2005).

1.2.4.2. Genoma

El genoma de coronavirus está formado por una única molécula de ARN de cadena simple y de sentido positivo. Debido a ello, el ARN genómico de coronavirus es infeccioso cuando se transfecta a células hospedadoras permisivas, como ocurre con todos los virus de ARN de sentido positivo. El genoma posee múltiples funciones durante la infección. Inicialmente actúa como un ARNm que se traduce en el enorme complejo poliproteico de la replicasa, la síntesis completa del cual requiere un evento de cambio de pauta de lectura (la replicasa es el único producto derivado del genoma,

todos los demás ORFs se expresan desde ARNs subgenómicos). El genoma también funciona como molde para la replicación y transcripción. Finalmente, el genoma participa en el ensamblaje, cuando los genomas generados en el curso de la infección se incorporan en la progenie viral.

El genoma se parece estructuralmente a la mayoría de ARNm eucarióticos en que posee una estructura cap en su extremo 5' y una cola de poliadeninas en su extremo 3'. A diferencia de la mayoría de ARNs eucarióticos el genoma de coronavirus es extremadamente grande. De hecho, el genoma de coronavirus se halla entre las moléculas de ARN más grandes conocidas en biología. Otra diferencia con los ARNm eucarióticos es que contiene múltiples ORFs. El primer gen comenzando por el extremo 5' es el gen que codifica para la replicasa viral y constituye dos tercios del genoma, el tercio restante del genoma está compuesto por los genes de las cuatro proteínas estructurales agrupados hacia el extremo 3' y los genes de proteínas accesorias. El orden invariable de los genes en todos los miembros de la familia de coronavirus es 5'-replicasa-S-E-M-N-3'. No obstante, la modificación por ingeniería genética del orden génico del genoma de MHV es completamente tolerado por el virus (de Haan et al., 2002). Esto implica que aunque el orden nativo de los genes en la familia *Coronaviridae* se haya fijado tempranamente en la evolución, éste no es esencial funcionalmente. En los extremos del genoma se encuentran las regiones no traducibles (UTR), en el extremo 5' miden de 210 a 530 nucleótidos y de 270 a 500 nucleótidos en su extremo 3'. Las regiones no codificantes entre las ORFs son generalmente bastante pequeñas y en algunos casos existe un pequeño solapamiento entre ORFs adyacentes. Existen además uno o más genes accesorios intercalados entre los genes de las proteínas estructurales.

1.2.5. Ciclo celular de coronavirus

La infección por coronavirus comienza con la unión de los viriones al receptor celular (Figura 1.2). Esta unión inicia una serie de eventos que culminan con la liberación de la nucleocápside en el citoplasma de la célula infectada, donde el genoma viral está disponible para su traducción. El genoma funciona como el primer ARNm de la infección ya que es de sentido positivo y se traduce en el enorme complejo de la replicasa. Este complejo usa el genoma como molde para la síntesis de los genomas de la progenie y de un conjunto de ARNm subgenómicos por medio de un intermediario de cadena negativa (Baric y Yount, 2000; Sethna et al., 1991; Sethna et al., 1989).

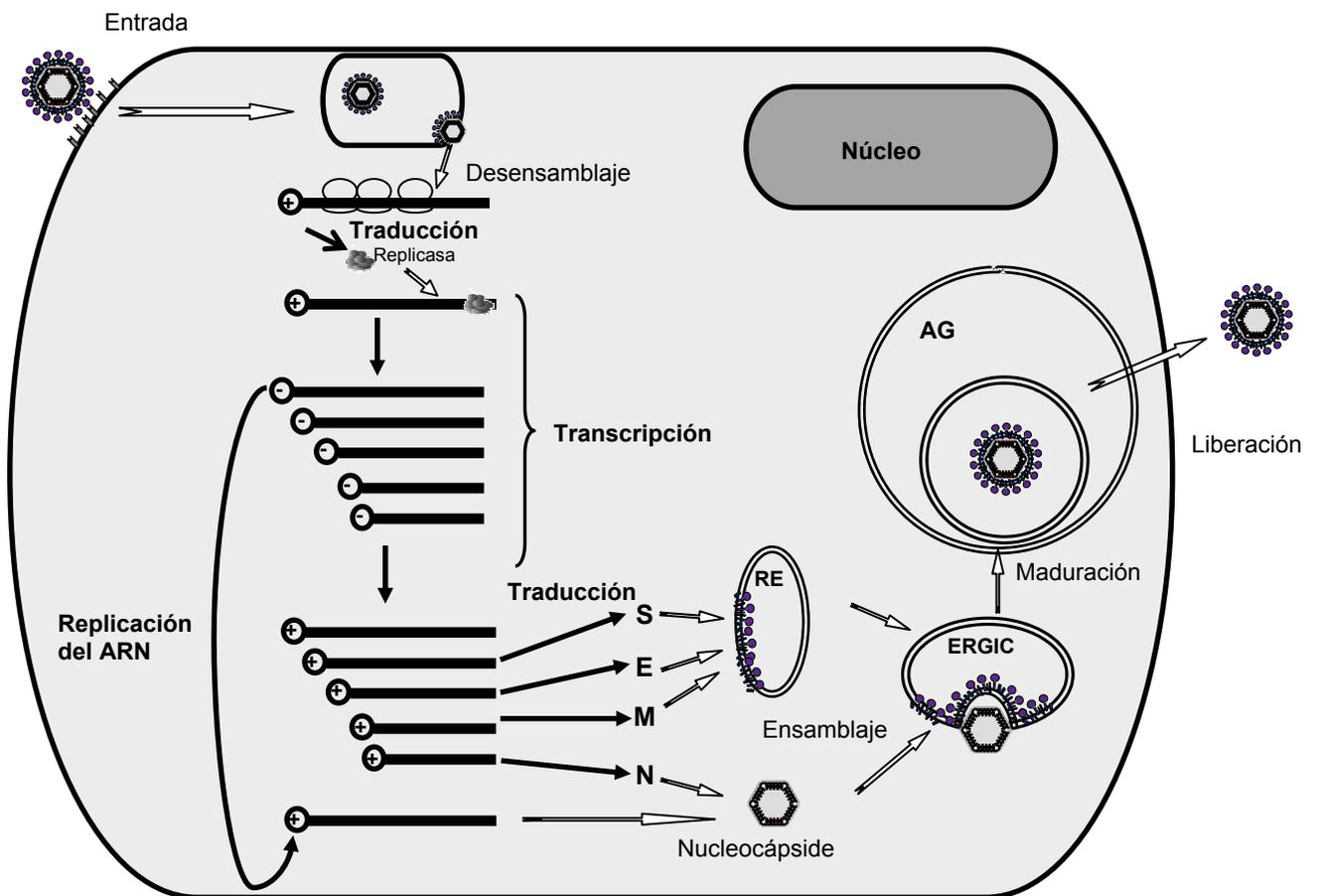


Figura 1.2. Ciclo infeccioso de coronavirus. Se representa un esquema del ciclo infeccioso de coronavirus, enfatizando los procesos de replicación, transcripción y traducción. RE: Retículo Endoplasmático. AG: Aparato de Golgi.

La traducción de los ARNm subgenómicos da lugar a las proteínas estructurales y accesorias. Las proteínas estructurales que unen a membrana, M, S y E, se insertan en el retículo endoplasmático, desde allí transitan al compartimento intermedio entre el retículo y el Golgi (ERGIC). Simultáneamente se va formando la nucleocápside como resultado de la encapsidación de los genomas de la progenie por la proteína N. Las nucleocápsides formadas se fusionan con los componentes que unen a membrana en vesículas o sacos del Golgi. Durante la infección de algunos coronavirus, pero no de todos, una fracción de la proteína S que no se ensambla en los viriones alcanza la membrana plasmática en última instancia. En la superficie celular, la proteína S puede causar la fusión de una célula infectada con la adyacente no infectada, conduciendo a la formación de grandes sincitios multinucleados. Esta unión posibilita la diseminación de la infección independientemente de la acción del virus extracelular y, por tanto, es un medio para escapar del sistema inmunitario.

1.2.5.1. Entrada

El emparejamiento de coronavirus con su correspondiente receptor celular es generalmente específico de especie, aunque algunos coronavirus son capaces de transmitirse esporádicamente entre especies, como por ejemplo el BCoV (Saif, 2004) y SARS-CoV.

La interacción entre la proteína S y su receptor celular constituye el principal, sino el único, determinante de tropismo de especie y de tejido. Esta proteína posee dos porciones: S1 y S2. S1 es la parte más variable de las dos porciones y es la parte que une al receptor. Parece ser que cada coronavirus usa regiones diferentes de S1. La unión al receptor desencadena un cambio conformacional dando como resultado que la porción más conservada de la espícula, S2, medie la fusión entre el virión y la membrana celular. El cambio conformacional en S2 se puede mimetizar en ausencia de receptor en un medio con un pH alcalino suave, el cual induce un estado fusogénico en S2 (Zelus et al., 2003).

La proteína S de coronavirus es una proteína de fusión viral de tipo I funcionalmente similar a las proteínas de fusión de virus de ARN filogenéticamente distantes como virus influenza, VIH y virus Ébola (Bosch et al., 2003). El dominio S2 de coronavirus, al igual que sus homólogos virales, contiene dos regiones repetidas de 7 aminoácidos separadas entre sí, HR1 y HR2. El péptido de fusión se halla antes de HR1 y el dominio transmembrana se encuentra inmediatamente detrás de HR2.

Mutaciones en estas regiones de la proteína S del virus MHV inhiben o impiden la fusión (Luo et al., 1999; Luo y Weiss, 1998). La proteína S de coronavirus, a diferencia de sus homólogos virales, no requiere proteólisis para ser fusogénica ya que contiene un péptido de fusión interno. El cambio conformacional mediado por el receptor en S1 y la disociación entre S1 y S2 inicia una reorganización en el trímero S2. Esta reorganización expone un péptido de fusión que interactúa con la membrana celular del hospedador. El resultado es la yuxtaposición de las membranas celulares y virales en una proximidad suficiente para permitir la mezcla de las bicapas lipídicas y la liberación de los contenidos del virión al citoplasma.

1.2.5.2. Ciclo replicativo

La replicación y transcripción de coronavirus se basan en la síntesis del ARN genómico y de moléculas de ARN mensajero. La replicación de coronavirus origina una copia del genoma de ARN de tamaño completo, mientras que la transcripción conduce a la producción de un conjunto anidado de ARNm subgenómicos de varios tamaños (Pasternak et al., 2006). Esta síntesis de ARN se produce por un mecanismo complejo y comprendido parcialmente, fases del cual implican interacciones entre segmentos distantes del genoma (Lai y Cavanagh, 1997; Lai y Holmes, 2001).

Cada ARN subgenómico de sentido positivo sirve como un mensajero para cada una de las ORFs que se hallan hacia el extremo 3' de la ORF de la replicasa. Todos los ARNs subgenómicos de sentido positivo comienzan por la secuencia líder, que comprende entre 65 y 98 nucleótidos y que es idéntica al extremo 5' del genoma. Después de ésta se une el cuerpo del ARN subgenómico, que tiene una secuencia idéntica al extremo 3' del genoma, de modo que cada ARNm incluye al inmediatamente anterior de menor tamaño más un gen adicional en el extremo 5'. Al final, los ARN subgenómicos forman un conjunto anidado en 3'. Este conjunto anidado, con o sin la secuencia líder, es una característica definitoria del orden *Nidovirales* (Enjuanes et al., 2000b). Las regiones de separación entre la secuencia líder y el cuerpo del ARN subgenómico se denominan señales reguladoras de la transcripción (TRS). Éstas son pequeñas secuencias idénticas, o casi, al extremo 3' de la secuencia líder. Estas secuencias están bien conservadas dentro de cada grupo de coronavirus. Pero no todas las TRS en un virus dado se ajustan exactamente a la secuencia consenso; cada TRS individual varía en un número de bases que le son permitidas. Los ARNm acaban en una región no traducible, al final de ésta en 3' se encuentran dos estructuras esenciales funcionalmente para la replicación. La primera

es una estructura en forma horquilla (Goebel et al., 2004; Hsue et al., 2000; Hsue y Masters, 1997) y la segunda es un pseudonudo (Goebel et al., 2004; Williams et al., 1999). Se ha postulado que configuran un interruptor molecular que es operativo en algunos estadios de la síntesis del ARN, aunque la diana de su posible regulación aún no se ha identificado (Goebel et al., 2004). Estas dos estructuras se han hallado en miembros del género β , pero en el género α sólo se ha encontrado la estructura de pseudonudo, que está altamente conservada (Williams et al., 1999).

El ARN subgenómico de sentido negativo es aproximadamente de una décima a una centésima parte tan abundante como su contrario. Éste posee una organización complementaria al genoma, incluyendo un tramo de oligouracilos en su extremo 5' (Hofmann y Brian, 1991) y un anti-líder en el extremo 3' (Sethna et al., 1991).

Desde los primeros estudios está claro que los ARN subgenómicos se forman por un proceso cotranscripcional discontinuo y no por un proceso de "splicing" de un precursor genómico de tamaño completo (Jacobs et al., 1981; Stern y Sefton, 1982). Existen dos modelos de transcripción (Figura 1.3):

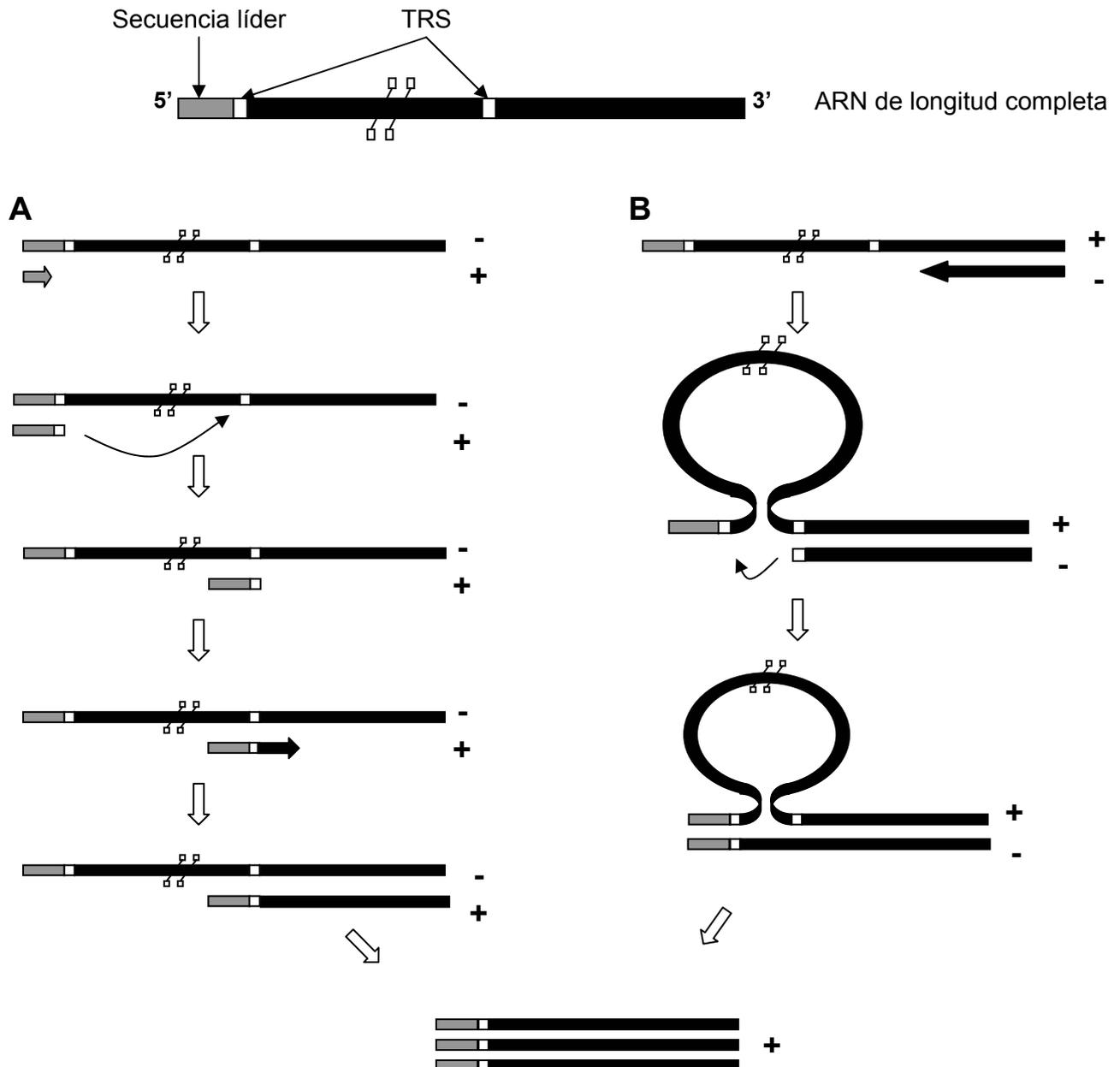


Figura 1.3. Modelos de transcripción en coronavirus. Se han propuesto dos mecanismos para la transcripción de coronavirus. **A. Transcripción primada por líder.** A partir de la cadena negativa se sintetiza el líder de polaridad positiva hasta la síntesis de la TRS adyacente. Entonces, el complejo de transcripción se disocia y la secuencia líder hibrida en una secuencia complementaria a la TRS presente en el ARN de longitud completa y polaridad negativa, completándose la síntesis del ARNm correspondiente. **B. Transcripción discontinua de la cadena negativa.** La síntesis de la cadena negativa se inicia desde el extremo 3' del ARN genómico. La elongación ocurre hasta la secuencia TRS, entonces el complejo de replicación se detiene, se desprende y posteriormente hibrida con el extremo 3' de la secuencia líder para completar la síntesis de una copia negativa del ARNm. Este ARN de sentido negativo sirve después como molde para la síntesis continua del ARNm correspondiente

1. Transcripción primada por líder. Los ARN subgenómicos se generan durante la síntesis de la cadena de sentido positivo. Se ha propuesto que la polimerasa realiza una pausa cerca del final de la secuencia líder y se separa con el ARN líder naciente libre. A este paso le sigue la hibridación del ARN líder a la secuencia complementaria de un TRS en una porción interna del molde de cadena negativa, desde donde el ARN naciente es entonces elongado (Lai, 1986). La eficacia de la fusión de un TRS no viene mediada sólo por el emparejamiento de bases, por debajo de un umbral mínimo de emparejamiento de bases otros factores predominan. Tiene importancia el contexto de la secuencia local de la TRS y la posición de la TRS con relación al extremo 3' del genoma (Joo y Makino, 1995; Krishnan et al., 1996; Ozdarendeli et al., 2001; van Marle et al., 1995). Un refinamiento de esta idea es que la fusión de la secuencia líder al cuerpo del ARN subgenómico resulta de una síntesis casi continua a través de dos porciones distantes de un molde con forma de lazo, las cuales se juntan por interacciones ARN-proteína y proteína-proteína (Lai et al., 1994; Zhang et al., 1994).

2. Transcripción discontinua durante la síntesis de ARN de la cadena negativa. Es la teoría más reciente, que retiene la noción de molde en lazo. Apoya un mecanismo en el que el paso discontinuo en la síntesis de ARN subgenómico ocurre durante la síntesis de ARN de la cadena positiva (Sawicki y Sawicki, 2005; Sawicki et al., 2007). En este modelo la polimerasa viral comienza desde el extremo 3' de una hebra del genoma y cambia de hebra en una TRS interna y continua la síntesis en la secuencia de la TRS homóloga del extremo 3' del ARN líder genómico. El ARN subgenómico resultante de cadena negativa, en asociación con el ARN genómico de sentido positivo, funciona entonces como molde para la síntesis de múltiples copias del correspondiente ARN subgenómico. Esta nueva visión se fundamenta en el descubrimiento de los ARN subgenómicos de cadena negativa (Sethna et al., 1989) y en la demostración de que no se puede detectar en células infectadas ARN líder libre (Chang et al., 1994). La mayoría, aunque no todos, de los trabajos bioquímicos subsiguientes apoyan el argumento de que las especies de ARN subgenómicos de sentido negativo son cinéticamente competentes para funcionar como moldes para los ARN subgenómicos de sentido positivo. Actualmente existe un consenso amplio para coronavirus, pero no universal, que tanto la replicación como la transcripción se inician con la síntesis de ARN de sentido negativo. Futuros trabajos deben elucidar los detalles del cambio de hebra.

El mecanismo de transcripción aceptado actualmente en el orden *Nidovirales* se basa fundamentalmente en el trabajo de Pasternak et al. (2001) en *Arterivirus*, los trabajos de Zuniga et al. (2004) y Sola et al. (2005) en *Coronavirus* y el trabajo de Smits et al. (2005) en *Torovirus*. El proceso de transcripción en coronavirus implica una síntesis discontinua del ARN, ésta se produce durante la extensión de las copias negativas de los ARNm subgenómicos. Este proceso está regulado por las TRS que preceden a cada gen. Se ha propuesto un modelo de transcripción en coronavirus que implica tres pasos (Enjuanes et al., 2006): la formación de complejos 5'-3' en el ARN genómico, el emparejamiento de bases de la cadena de ARN negativo naciente por el TRS líder y el intercambio de hebra durante la síntesis de la cadena negativa para completar el ARN subgenómico de cadena negativa.

Una característica importante para la síntesis de ARN de la familia de coronavirus es la alta tasa de recombinación homóloga y no homóloga en el ARN. En MHV la recombinación tiene lugar a lo largo de todo el genoma y se ha estimado una frecuencia de un 1% por cada 1'3 Kb (casi el 25% considerando el genoma completo), que es la tasa más alta observada para cualquier virus de ARN (Baric et al., 1990). Se piensa que la recombinación es resultado de un mecanismo de elección de copia, descrito originalmente para poliovirus (Kirkegaard y Baltimore, 1986). En este modelo la polimerasa viral, con la cadena de ARN naciente intacta, se separa de una cadena y continúa la elongación en una posición idéntica, o muy similar, de la otra cadena. Se ha propuesto como alternativa que la transferencia de la cadena puede resultar de un mecanismo procesivo que no requiere la disociación de la polimerasa (Jarvis y Kirkegaard, 1991). Se ha demostrado que los sitios de recombinación son aleatorios (Banner y Lai, 1991). También se ha propuesto una forma de recombinación no homóloga que ocurre entre el ARN genómico y subgenómico y proviene del colapso del complejo de transcripción durante la transcripción discontinua de la cadena negativa (Kuo y Masters, 2002). Tal interrupción, seguida por una reanudación de la síntesis del antígenoma debería dar lugar a una copia parcial de la secuencia líder incrustada en un punto interno del genoma, cerca de la unión entre dos genes. Los eventos de colapso transcripcional pueden haber sido un factor significativo en la evolución de coronavirus. Es probable que la recombinación no homóloga sea el mecanismo de adquisición de varios genes de proteínas accesorias.

El complejo de la replicasa está codificado por el primer gen del genoma y lleva a cabo los intrincados procesos de la replicación y transcripción viral del ARN. Este enorme gen ocupa aproximadamente dos tercios del genoma y contiene dos ORFs, 1a

y 1b. Entre ambas existe un pequeño solapamiento de 43 nucleótidos, y la segunda ORF posee una pauta de lectura -1 con relación a la primera. La expresión completa de estas dos ORFs depende de un cambio de pauta de lectura ribosómico programado, ya que no existen ARN subgenómicos que puedan funcionar como un ARNm para la ORF 1b. Además, esta organización existe para todos los coronavirus, por tanto, se ha propuesto que éste es el mecanismo para la expresión de la ORF 1b. Se ha cuantificado una incidencia del 25-30% en el sistema de IBV (Brierley et al., 1989). La eficacia en células infectadas se ha cuantificado todavía y también se desconoce si el valor es constante a lo largo de la infección. La razón por la cual los coronavirus emplean este mecanismo como estrategia de expresión génica está poco definida actualmente. La explicación más común es que, al igual que en los retrovirus, este mecanismo facilita una proporción fija de productos de traducción. Además estos productos se hallan en una proximidad que es necesaria para el ensamblaje en un complejo macromolecular. También se ha especulado que evita la expresión de productos enzimáticos de la ORF 1b hasta un estadio y un ambiente celular adecuados para los productos de la ORF 1a.

El resultado final de la traducción, teniendo en cuenta el cambio de pauta de lectura del gen de la replicasa, es la síntesis de dos grandes poliproteínas, pp1a y pp1b, cuyo tamaño varía entre 440-500 KDa y 740-810 KDa, respectivamente. Estas dos proteínas son procesadas cotraduccionalmente por dos o tres actividades proteinasas que contienen internamente. Los productos finales del corte auto-proteolítico son 16 proteínas no estructurales, denominadas de la nsp1 a la nsp16. Actualmente se cree que existe una correspondencia entre el orden en el genoma de las actividades codificadas por los genes de la replicasa y el programa temporal de la infección. Los productos de pp1a parecen funcionar para preparar a las células para la infección y el ensamblaje de la maquinaria para la síntesis del ARN. Los productos de pp1ab llevan a cabo la verdadera catálisis de la replicación y transcripción del ARN.

1.2.5.3. Empaquetamiento del genoma

De las diferentes especies de ARN viral sintetizadas durante la infección, tanto de sentido positivo como negativo, sólo se incorpora en el virión el ARN genómico de sentido positivo. Los diferentes miembros de la familia lo consiguen con distintos grados de rigor. Algunos coronavirus contienen cantidades significativas de ARNm subgenómico en el virión, en algunos casos en cantidades molares que exceden al ARN genómico, por ejemplo TGEV (Sethna et al., 1991; Sethna et al., 1989), BCoV

(Hofmann et al., 1990) e IBV (Zhao et al., 1993). En cambio, en los viriones de MHV purificados se ha hallado exclusivamente ARN genómico (Makino et al., 1990). Como cabría esperar, la secuencia que especifica el empaquetamiento selectivo del ARN genómico se encuentra en una región del genoma que no se halla en cualquiera de los ARNm subgenómicos. Esta secuencia es relativamente pequeña (Makino et al., 1990; van der Most et al., 1991). Para TGEV la señal de empaquetamiento se localiza en el gen de la replicasa en la región de 100-649 nucleótidos del extremo 5' del genoma (Escors et al., 2003).

La encapsidación es el proceso de formación de la nucleocápside, es decir, la unión cooperativa de la proteína N al ARN viral. El empaquetamiento es la incorporación de la nucleocápside en los viriones. En los virus envueltos los dos procesos no son necesariamente el mismo. En coronavirus es lógico asumir que la encapsidación se inicia por la proteína N, de hecho se ha demostrado "in vitro" la unión específica de la proteína N de MHV a la señal de empaquetamiento del ARN (Molenkamp y Spaan, 1997). No obstante, también se ha visto que existe una interacción específica entre la proteína N de MHV y el líder del ARN, que se localiza en el extremo 5' del ARN genómico y subgenómico (Nelson et al., 2000; Stohlman et al., 1988). Aún no está claro si esta unión específica de secuencia representa un paso de nucleación que conduce a la encapsidación por múltiples monómeros de N en última instancia. La unión de N a la secuencia líder parece ser incoherente con la especificidad del empaquetamiento, pero es consistente con la observación de que anticuerpos anti-N coinmunoprecipitan tanto ARN genómicos como subgenómicos en células infectadas con MHV o BCoV (Baric et al., 1988; Cologna y Hogue, 2000; Narayanan et al., 2000). Una posible resolución de esta paradoja proviene del hallazgo del papel de la proteína M en la especificidad del empaquetamiento. Anticuerpos frente a la proteína M de MHV coinmunoprecipitan la fracción de la proteína N que une al ARN genómico, pero no la que está unida al ARN subgenómico (Narayanan et al., 2000). Además, estas interacciones específicas entre M y N dependen de la presencia de la señal de empaquetamiento de MHV (Narayanan y Makino, 2001). Hay que tener en cuenta que el trabajo de Narayanan et al. (2003) propone que la selección de la señal de empaquetamiento la realiza la proteína M. En dicho trabajo, VLPs de MHV formadas por las proteínas M y E, pero sin la proteína N, incorporaban moléculas de ARN heterólogo sólo si contenían la señal de empaquetamiento de MHV. Si este descubrimiento se generalizara para todos los coronavirus significaría que la proteína M organiza cada interacción individual necesaria para el ensamblaje del virión.

1.2.5.4. Ensamblaje de las partículas virales

El ensamblaje de los viriones en coronavirus se produce a través de una serie de interacciones cooperativas entre el conjunto de proteínas estructurales. Éstas suceden en el retículo endoplasmático y el ERGIC. La proteína M interviene en la mayor parte de estas interacciones, si no en todas, y se ha llegado a reconocer como el principal organizador del proceso de ensamblaje. A pesar de su papel dominante, la proteína M no es suficiente por sí sola para la formación de los viriones. La expresión independiente de la proteína M no resulta en el ensamblaje en estructuras tipo virión. En estas circunstancias la proteína M atraviesa la vía secretora hasta el trans-Golgi donde forma grandes complejos insolubles a los detergentes (Masters, 2006). Por el contrario, los coronavirus geman en un compartimento próximo, el ERGIC. El desarrollo de VLPs para coronavirus ha conducido a la identificación de la proteína E como el factor que junto con la proteína M determina el lugar de ensamblaje del virión y la gemación. En el caso de MHV, la coexpresión de las proteínas M y E, es necesaria y suficiente para la formación de las VLPs (Bos et al., 1996; Vennema et al., 1996). Las VLPs resultantes son morfológicamente idénticas a los viriones (sin las espículas) y se liberaban desde las células por una vía similar a la usada por los viriones. Sorprendentemente, ni la proteína S ni la nucleocápside son necesarias para la formación de VLPs. Estos resultados se han generalizado para los coronavirus de los tres grupos. Las VLPs contienen muy poca proteína E, por lo que se asume que las interacciones laterales entre los monómeros de la proteína M es la fuerza que dirige la formación de la envuelta del virión (de Haan et al., 2000).

La proteína S tiene un papel pasivo en el ensamblaje. La expresión independiente de la proteína S de MHV, FIPV e IBV produce proteína que entra por defecto en la vía secretora y alcanza, finalmente, la membrana plasmática (Vennema et al., 1990). Pero lo hace con una cinética mucho menor comparada con la proteína S que se incorpora en los viriones. Esto ha conducido a la propuesta de que la proteína S alberga señales de retención intracelular que se esconden durante el ensamblaje del virión (Vennema et al., 1990). No obstante, se ha observado que una fracción importante de la proteína S en presencia de la proteína M se retiene en las membranas intracelulares en células infectadas con MHV (Opstelten et al., 1995). Además, aunque la proteína S no se requiere para la formación de VLPs, ésta se incorpora en VLPs si es coexpresada con las proteínas M y E (Bos et al., 1996; Vennema et al., 1996). También existen indicios de que en algunos casos la proteína S coopera en su propia captura. La incorporación de la proteína S en una especie

particular está determinada exclusivamente por la presencia del dominio transmembrana y endodominio de la proteína S de la especie. La fuente del ectodominio no importa. El trabajo de Ye et al. (2004) muestra que el ensamblaje adecuado de la proteína S en el virión se encuentra localizado únicamente en 38 residuos del endodominio.

La incorporación de la nucleocápside depende de la proteína M. En los viriones de TGEV la interacción entre la proteína M y la nucleocápside se ha localizado en un segmento de 16 residuos adyacentes al extremo carboxilo-terminal de la proteína M (Escors et al., 2001). En el caso de MHV, la interacción se ha demostrado construyendo un mutante defectivo con una delección en el extremo carboxilo-terminal (Kuo y Masters, 2002). Se encontraron reversiones secundarias localizadas en los extremos carboxilo-terminal de las proteínas M y N que aumentaron el "fitness" viral. También se realizaron mutaciones en el extremo carboxilo-terminal de la proteína N que originaron mutantes fenotípicamente parecidos al mutante anterior (Hurst et al., 2005).

Se ignora el papel jugado por la proteína E en el ensamblaje comparado con las funciones patentes del resto de proteínas estructurales. El descubrimiento de la naturaleza esencial de la proteína E en la formación de VLPs ha hecho especular que la baja cantidad de proteína E en los viriones y VLPs indica una función catalítica más que estructural. La proteína E podría inducir la curvatura de la membrana en el ERGIC o pellizcar el cuello de la partícula viral en el estadio final del proceso de gemación (Vennema et al., 1996). Sorprendentemente, se puede deleccionar enteramente el gen E del genoma de MHV y los mutantes resultantes son sólo viables mínimamente, comparados con el virus silvestre (Kuo y Masters, 2003). Esto indica que en MHV la proteína E es importante, pero no absolutamente esencial para el ensamblaje del virión. Por el contrario, en TGEV la eliminación del gen E es letal. Sólo se pueden recuperar virus viables si la proteína E se proporciona en *trans* (Curtis et al., 2002; Ortego et al., 2002). Esta discordancia puede señalar una diferencia morfogénica entre los coronavirus de los géneros α y β . Una explicación alternativa es que la proteína E tenga múltiples actividades, una de las cuales sería esencial para el género α pero en gran parte prescindible para el género β . Aún no se dispone de una información suficientemente completa de la proteína E para comprender la función de esta minúscula molécula. Una de las cuestiones más intrigantes es si la proteína E necesita interactuar físicamente con la proteína M, o si puede hacerlo a distancia. Si la proteína E tiene múltiples funciones, quizás ambas posibilidades sean plausibles.

1.2.6. TGEV

El virus TGEV es el agente causal de la gastroenteritis porcina transmisible. El virus accede al animal por vía oral y después de un período de incubación de entre 18 y 72 horas causa sintomatología clínica. Esta enfermedad es muy contagiosa pero la gravedad y mortalidad varían con la edad. La tasa de mortalidad en lechones es muy elevada, con una estimación del 60 al 80% en lechones menores de 14 días que sufren la infección (Saif y Sestak, 2005). La enfermedad en lechones cursa con vómitos y diarrea grave que provocan deshidratación, pérdida rápida de peso y finalmente la muerte en 2 a 5 días después de la infección. En cerdos jóvenes de 2 a 8 semanas la enfermedad es menos grave, provocando retraso en el crecimiento, y se estima que la tasa de mortalidad es del 10-20%. En animales adultos la enfermedad muestra los síntomas de inapetencia y diarrea, que perdura sólo de 2 a 4 días, con una mortalidad inferior al 5% (Hill, 1989).

El virus replica en células epiteliales del tracto entérico y respiratorio de lechones recién nacidos y en la glándula mamaria de cerdas en periodo de lactancia, que pueden transmitir el virus a la descendencia a través de la leche. El virus también puede infectar a células de otros órganos, pero la susceptibilidad varía en función de la dosis viral, del tipo de cerdo (normal con ingestión de calostro, privado de dicha ingestión o gnotobiótico), de la temperatura y de la edad del animal, entre otros factores (Enjuanes y Van der Zeijst, 1995).

El principal reservorio de la enfermedad es el cerdo. Los principales responsables de la transmisión del virus a animales jóvenes son los animales de engorde y las cerdas lactantes.

1.2.7. Sistemas de expresión en coronavirus

Los coronavirus tienen varias ventajas para su uso como vectores sobre otros sistemas de expresión viral (Enjuanes et al., 2003):

1. Son virus de ARN de cadena simple que replican en el citoplasma sin un ADN intermediario, siendo improbable la integración del genoma viral en el cromosoma de la célula hospedadora (Lai y Cavanagh, 1997).
2. Estos virus tienen el mayor genoma de los virus con genoma de ARN y, en principio, permiten la inserción de genes foráneos grandes (Enjuanes et al., 2000a; Masters, 1999).

3. Dado que los coronavirus infectan las superficies mucosas, tanto respiratorias como entéricas, pueden ser usados para dirigir el antígeno a las áreas respiratorias y entéricas para inducir una intensa respuesta inmunitaria local (Enjuanes y Van der Zeijst, 1995).
4. La virulencia se puede atenuar mediante la delección de genes no esenciales para la replicación (McGoldrick et al., 1999; Ortego et al., 2003).
5. Se puede modificar su tropismo, tanto de especie como de tejido, por la manipulación de la proteína de la espícula (Ballesteros et al., 1997; Kuo et al., 2000; Leparc-Goffart et al., 1998; Sanchez et al., 1999).
6. Se dispone de cepas de coronavirus no patógenas que infectan a la mayoría de las especies de interés (humana, porcina, bovina, canina y felina).
7. Se pueden expresar diferentes genes heterólogos debido a su estrategia de expresión génica (Alonso et al., 2002b; Curtis et al., 2002; Sola et al., 2003).
8. Existen clones de ADNc infectivos de coronavirus disponibles para diseñar sistemas de expresión (Almazan et al., 2000; Thiel et al., 2001a; Yount et al., 2000).

Estudios futuros podrán mejorar los vectores basados en coronavirus mediante la optimización de los niveles de expresión, la identificación de genes no esenciales (que puedan ser deleccionados para aumentar la capacidad de clonación) y el incremento de su bioseguridad (Enjuanes et al., 2005).

Se han desarrollados dos sistemas para la expresión de genes heterólogos en coronavirus: uno basado en un sistema de dos componentes y otro basado en el uso de genomas únicos.

1.2.7.1. Sistemas de expresión dependientes de virus auxiliar

Es un sistema basado en dos componentes: el virus auxiliar y un minigenoma defectivo derivado de éste que contiene el gen heterólogo. El minigenoma es incapaz de codificar la replicasa y las proteínas estructurales, y es el virus auxiliar el que proporciona las secuencias necesarias en *trans* para la replicación y encapsidación del genoma defectivo. Este sistema tiene la ventaja de permitir una gran capacidad de clonación, superior a 26 Kb, que resultan de la diferencia entre el tamaño del genoma completo (unas 30 Kb) y el genoma defectivo (< 4 Kb). El principal inconveniente de este sistema es su inestabilidad, puesto que el minigenoma se elimina con relativa facilidad al depender de la replicación del virus auxiliar.

Se han utilizado minigenomas de ARN defectivos para producir proteínas heterólogas en los 3 géneros de coronavirus. En el género α se han desarrollado vectores basados en MHV que expresan los genes de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) (Liao y Lai, 1994; Lin y Lai, 1993), de la hemaglutinina esterasa (Liao et al., 1995) y del interferón γ (Zhang et al., 1997). En el género β se ha utilizado ARN defectivo de TGEV para expresar el gen de la β -glucuronidasa (GUS) (Alonso et al., 2002a; Izeta et al., 1999) y el gen de la ORF5 del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) (Alonso et al., 2002b). Por último, basado en IBV, que pertenece al género γ , se han expresado los genes CAT (Stirrup et al., 2000), luciferasa (LUC) (Evans et al., 2000) y el interferón γ de pollo (Hackney et al., 2003).

La estabilidad de la expresión de ARNs defectivos basados en MHV se mantiene durante los 2 o 3 primeros pases en cultivo si estos minigenomas no llevan la señal de empaquetamiento o si el gen es tóxico. Por el contrario, la expresión partiendo de ARNs defectivos de TGEV, que incluye la señal de empaquetamiento del ARN, se mantiene al menos durante 10 o 20 pases (Izeta et al., 1999).

Los niveles de expresión utilizando minigenomas basados en TGEV se sitúan en 1 μg por 10^6 células para la expresión del gen GUS, aunque ésta se puede incrementar a 2-8 μg por 10^6 células empleando un sistema de amplificación en dos pasos (el primero basado en la amplificación de los minigenomas en el núcleo de la célula hospedadora al incluir el promotor de citomegalovirus (CMV) y el segundo mediante la transcripción del ARNm del gen heterólogo en el citoplasma utilizando la replicasa del virus). Minigenomas basados en IBV han producido niveles de expresión de 1-2 μg por 10^6 células. No se han cuantificado los niveles de expresión para vectores basados en MHV.

1.2.7.2. Sistemas de expresión de genoma único. Genética reversa

Hace más de 20 años se establecieron los antecedentes para realizar genética reversa con virus de ARN de sentido positivo (la transcripción de un ARN infeccioso a partir de una copia de ADNc de longitud completa del genoma viral) para poliovirus (Racaniello y Baltimore, 1981). No obstante, hasta ahora ha habido grandes obstáculos para su aplicación en coronavirus. Sólo recientemente ha sido posible aplicar este sistema, debido a la necesidad de superar un gran número de limitaciones. Las más notables son las derivadas del enorme tamaño del genoma y la

alta inestabilidad de diversas regiones del gen de la replicasa cuando se han propagado como un ADNc clonado en *E. coli*.

El primer sistema de genética reversa para coronavirus desarrollado para sortear estas barreras es la recombinación dirigida del ARN (Masters, 1999; Masters y Rottier, 2005). Este método se aprovecha de la alta tasa de recombinación homóloga del ARN en coronavirus. En células infectadas con el virus parental que va recibir la secuencia heteróloga se introduce un minigenoma defectivo que contiene el gen de interés. Este virus parental debe poseer alguna característica que pueda ser seleccionada en contra. Posteriormente, se identifica a los mutantes recombinantes que surgen en la progenie viral por selección negativa del virus parental. El primer coronavirus utilizado en la recombinación dirigida del ARN fue el MHV. Como virus parental se empleó a un mutante clásico que es termolábil debido a una delección interna del gen N (Koetzner et al., 1992; Peng et al., 1995a). Los virus recombinantes, que se identificaron porque eran los supervivientes de una selección por calor, habían restaurado la región deleccionada de los virus parentales y a la vez habían adquirido las mutaciones marcadoras presentes en el ARN donante. La eficacia de este sistema se incrementó por la incorporación de elementos en 5' que actúan en *cis* y que convierte al ARN donante en un ARN defectivo interfiriente replicativo (DI RNA) (Masters et al., 1994; van der Most et al., 1992). Las posibilidades de esta técnica se incrementaron con la adición de una secuencia genómica contigua a 3' en el ARN donante que permitió el acceso a la genética reversa de todos los genes estructurales de MHV finalmente (Fischer et al., 1997a; Fischer et al., 1997b; Peng et al., 1995b). El alcance y versatilidad de la recombinación del ARN se potenció substancialmente como resultado de la construcción de un mutante interespecie de coronavirus, fMHV. Este virus es una quimera en la cual el ectodominio de la proteína S de MHV se ha reemplazado por el ectodominio de la proteína S de FIPV (Kuo et al., 2000). Esta sustitución da lugar a un virus que ha adquirido la capacidad de crecer en células felinas y simultáneamente ha perdido la capacidad de crecer en células murinas. Esta quimera ofrece una ventaja selectiva tremenda en la recombinación dirigida del ARN. El uso de fMHV como el virus parental destinatario permite la selección de recombinantes en base a la recuperación de la capacidad para crecer en células murinas. Estos recombinantes pueden albergar mutaciones de MHV no letales en las primeras 10 Kb del extremo 3' del genoma. Con este método se han aislado numerosos mutantes, muchos de los cuales poseen fenotipos extremadamente defectivos.

A pesar de su valor, la recombinación dirigida del ARN posee la limitación de que sólo puede ser usada para realizar ingeniería genética de un tercio del genoma. La genética reversa con el genoma completo de coronavirus es relativamente reciente y se ha conseguido a partir de las investigaciones de tres grupos independientes. Estos grupos han desarrollado sistemas basados en clones de ADNc de longitud completa usando diferentes estrategias para superar los problemas de inestabilidad inherentes a los ADNc de coronavirus. Estos sistemas proporcionan la posibilidad del acceso al gen de la replicasa.

- 1. Construcción de cromosomas artificiales bacterianos (BACs).** En este método se construyó una copia de ADNc de longitud completa del genoma de TGEV como un cromosoma artificial bacteriano (Enjuanes et al., 2005). Los coronavirus infecciosos de ARN se construyeron por un sistema de “lanzadera de ADN”, es decir, se produjo la transcripción nuclear “in vivo” por una ARN polimerasa de tipo II del hospedador con un promotor de CMV construido por ingeniería genética (Almazan et al., 2000). La lanzadera de ADN aseguró la formación de la estructura cap del ARN viral y evitó potenciales limitaciones del sistema que surgen de la baja eficacia de la transcripción “in vitro” del ARN genómico. La secuencia heteróloga se eliminó del extremo 3’ del ARN transcrito a través de la incorporación de un ribozima del virus de la hepatitis delta. Posteriormente, se consiguió la estabilización del clon del BAC en la bacteria por la inserción de un intrón eucariótico en dos posiciones de la región identificada como tóxica del ADNc de TGEV (Gonzalez et al., 2002). Esto permitió la propagación estable del BAC al menos en 200 generaciones bacterianas.
- 2. Ligación “in vitro” de fragmentos de ADNc.** El ADN genómico de longitud completa se ha ensamblado por ligación “in vitro” de ADNc subclonados más pequeños y estables (Baric y Sims, 2005). Los ARN infecciosos son transcritos “in vitro” desde el producto ligado. Las uniones de los fragmentos de ADNc genómicos subclonados se escogieron para permitir una fácil manipulación para aplicaciones de mutagénesis dirigida. Y aún más importante, se dispusieron algunas uniones entre fragmentos de tal manera que interrumpieran regiones de inestabilidad del ADNc clonado. Al final se utilizaron siete fragmentos. Para facilitar esta aproximación se introdujo la innovación de encaminar a los fragmentos en un único ensamblaje por medio de secuencias protuberantes no simétricas generados por enzimas de restricción que cortan a una distancia de las secuencias que reconocen. Esto aseguró que los fragmentos se conectaran en un orden

predeterminado en la ligación, evitando generar productos con reordenaciones. Originalmente se realizó para TGEV (Yount et al., 2000) y posteriormente se desarrolló para manipular los genomas de MHV (Yount et al., 2002), SARS-CoV (Yount et al., 2003) e IBV (Youn et al., 2005).

3. Propagación de ADNc de longitud completa utilizando el virus vacuna como vector. El ADNc de coronavirus se generó por RT-PCR de largo alcance (“long-range RT-PCR”) (Thiel et al., 1997), y fue insertado en un único sitio de restricción en el genoma de virus vacuna (Thiel y Siddell, 2005). En este procedimiento el virus vacuna sirve como un enorme vehículo de clonación, en el que el ADNc del genoma de coronavirus no muestra las inestabilidades encontradas en los plásmidos de *E. coli*. Los ARN infecciosos son producidos por transcripción “in vitro” del ADN del virus vacuna purificado (Thiel et al., 2001a). Se desarrolló un protocolo alternativo con una lanzadera de ADN que lleva a cabo la transcripción “in vivo” del ADNc transfectado por una ARN polimerasa T7 codificada por el virus de la viruela aviar (Casais et al., 2001). El uso de virus vacuna como vector ha permitido la manipulación del clon resultante de ADNc por métodos desarrollados para la genética reversa de poxvirus. En particular se ha utilizado la selección dominante transitoria para llevar a cabo mutagénesis dirigida (Britton et al., 2005).

Estos métodos se han optimizado con el rescate de virus recombinantes desde líneas celulares que expresan la proteína N, dado que esta proteína potencia en gran medida la recuperación de virus en los tres sistemas de ADNc de longitud completa (Almazan et al., 2004; Schelle et al., 2005; Thiel et al., 2001a; Yount et al., 2002). En el caso de poxvirus se ha aplicado a HCoV-229E (Thiel et al., 2001a), IBV (Casais et al., 2001) y MHV (Coley et al., 2005).

Las dos opciones para los sistemas de genética reversa tienen sus propias ventajas. Para estudios de genética reversa que impliquen los genes estructurales de coronavirus o las UTR en 3', la recombinación dirigida del ARN es el sistema más fácil de manipular y tiene el valor de recuperar mutantes extremadamente defectuosos. Otra ventaja es que se presta bien para estudios que impliquen intercambio de dominios entre diferentes proteínas (Peng et al., 1995b) o intercambio de elementos genómicos (Hsue y Masters, 1997). En estos casos el sistema, a través de su propia selección de los lugares de cruzamiento permitidos, puede revelar que sustituciones son funcionales y cuales letales. Por otra parte, las estrategias de genética reversa a partir de ADNc de longitud completa proporcionan la capacidad de realizar

mutagénesis dirigida al gen de la replicasa viral, que es sumamente grande. Se espera que esta ventaja juegue un papel primordial en el futuro para la comprensión de la actuación de la compleja maquinaria de síntesis del ARN. Además de los estudios de biología molecular, las investigaciones con genética reversa han abierto la puerta al desarrollo de vacunas para estos virus y sus replicones (Alonso et al., 2002b; Haijema et al., 2004), sistemas de expresión (de Haan et al., 2005; de Haan et al., 2003) y vectores de liberación de genes (Thiel et al., 2001b; Thiel et al., 2003).

1.3. Rotavirus

1.3.1. Importancia de las infecciones por rotavirus

Las infecciones por rotavirus son la principal causa de gastroenteritis infantil en el mundo y se calcula que provocan 600.000 muertes anuales, sobre todo en países en vías de desarrollo (Figura 1.4), lo que supone el 5% de la mortalidad infantil (Parashar et al., 2006).

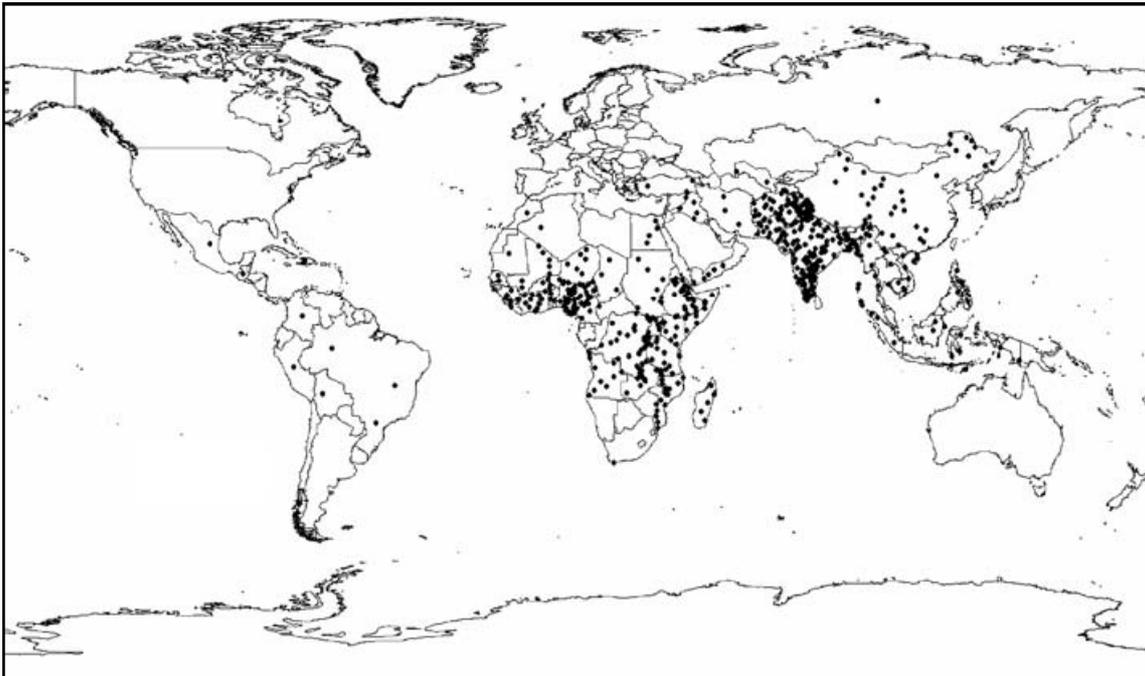


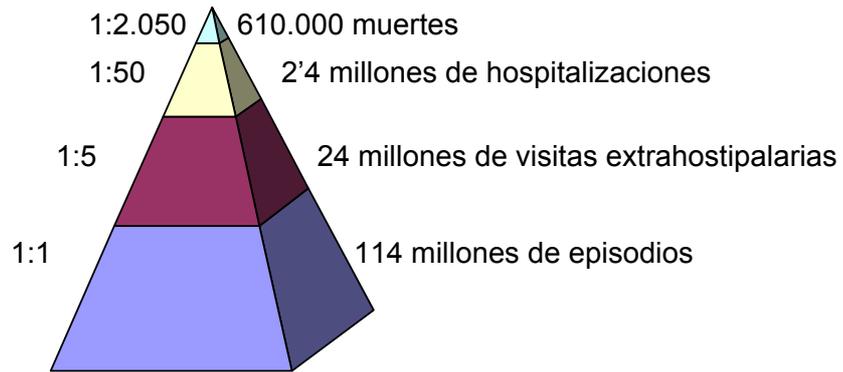
Figura 1.4. Mapa mundial de la estimación global de muertes causadas por rotavirus. Cada punto representa 1.000 muertes debidas a la gastroenteritis producida por rotavirus. Adaptado de Parashar et al. 2006.

Estas infecciones además causan 24 millones de consultas médicas extrahospitalarias y 2'4 millones de ingresos hospitalarios (Glass et al., 2006) (Figura 1.5).

Mundial

Riesgo

Casos



Unión Europea

Riesgo

Casos

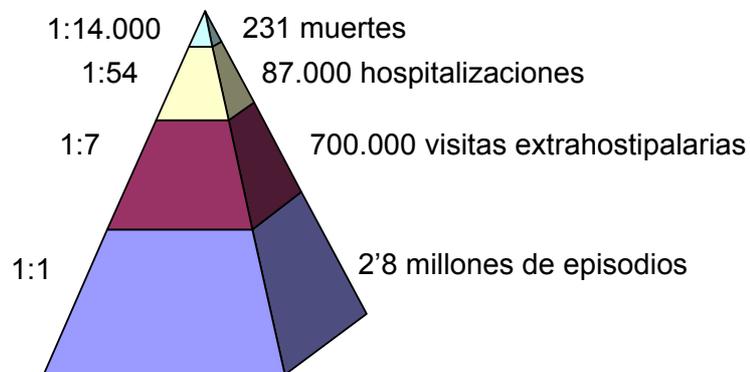


Figura 1.5. Riesgo y carga de la diarrea producida por rotavirus. Hay que destacar que el riesgo de muerte debido a la infección por rotavirus en países desarrollados como los 25 estados de la Unión Europea es muy bajo. Datos obtenidos de Glass et al. (2006) y Soriano-Gabarro et al. (2006).

1.3.2. Estructura y genoma

Rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae* y son virus desnudos de simetría icosaédrica con un tamaño de aproximadamente 100 nm de diámetro. Su genoma está formado por 11 segmentos de ARN bicatenario. Cada segmento genómico codifica una proteína, excepto el fragmento 11 que codifica dos proteínas (Estes, 2001). (Tabla 1.2).

Los 11 fragmentos genómicos codifican un total de 6 proteínas estructurales (VPs) y 6 no estructurales (NSPs) (Estes y Cohen, 1989) (Figura 1.6). El genoma se encuentra en el interior de la cápside, que está formada por tres capas proteicas concéntricas. La capa interna del virión está compuesta por las proteínas VP1, VP2 y VP3. La capa intermedia la forma una única proteína denominada VP6. La cápside externa la integran las proteínas VP7 y VP4, de las cuales VP7 es la más abundante. El virión completo se denomina partícula de tres capas, las partículas que carecen de capa externa son llamadas partículas de doble capa y no son infectivas. Y las partículas que no poseen las dos capas externas son las partículas de una capa o "cores".

Se ha desarrollado un modelo de la ultraestructura de la cápside gracias a los estudios de criomicroscopía electrónica. En este modelo la capa externa está formada por 780 copias de la glicoproteína VP7 (38 KDa) y de 120 copias de la proteína de la espícula VP4 (88 KDa) (Prasad et al., 1990). Las 780 copias de VP7 se organizan como 260 trímeros formando una red icosaédrica con simetría T=13. Una característica exclusiva de rotavirus respecto a los demás miembros de la familia es la presencia de 132 canales acuosos que comunican las dos capas externas; en estos canales se insertan 60 espículas bilobuladas que corresponden a dímeros de VP4 (Prasad et al., 1990; Tihova et al., 2001). Estas espículas están unidas a la capa inferior por un gran domino globular (Shaw et al., 1993; Yeager et al., 1994). Esta capa exterior es la responsable de la unión al receptor celular, adherencia y entrada a la célula.

La capa intermedia está formada por la proteína VP6. Esta proteína se organiza en 260 trímeros ensamblados en una red icosaédrica con simetría T=13. Aunque VP6 carezca de funciones enzimáticas resulta esencial para la transcripción del genoma.

Segmento genómico (pb)	Producto génico	Tamaño en aa de la proteína (Da)	Localización en la partícula vírica	Funciones
1 (3.302)	VP1	1.088 (125.005)	Cápside interna	ARN polimerasa ARN dependiente. Parte del complejo mínimo de replicación Parte del complejo de transcripción junto con VP3
2 (2.690)	VP2	881 (102.431)	Cápside interna	Proteína estructural de la cápside interna Parte del complejo mínimo de replicación
3 (2.591)	VP3	835 (98.120)	Cápside interna	Parte del complejo de transcripción junto con VP1
4 (2.362)	VP4	776 (86.782)	Cápside externa (espícula)	Forma la espícula de la cápside externa La infectividad viral se potencia con el corte proteolítico con tripsina de VP4, dando lugar a VP5* y VP8*
	VP5*	529 247-776 (60.000)		Unión a receptor, adherencia y entrada a la célula
	VP8*	247 1-247 (28.000)		Hemaglutinina Determina el serotipo P Protección
5 (1.611)	NSP1	495 (58.654)	No estructural	Unión específica al extremo 5' del ARNm Interacciona con el factor 3 de regulación del interferón
6 (1.356)	VP6 (T13)	397 (48.160)	Cápside intermedia	Proteína mayoritaria del virión. Forma la cápside intermedia Determina el antígeno de subgrupo Posible implicación en protección (mecanismo desconocido)
7 (1.105)	NSP3	315 (34.600)	No estructural	Unión específica con el extremo 3' del ARNm Une a eIF4G1 y circulariza al ARNm en el complejo de iniciación Regulación de la traducción viral y parada de la traducción celular
8 (1.059)	NSP2	317 (36.700)	No estructural	Implicada en la formación del viroplasma junto a NSP5
9 (1.062)	VP7	326 (37.368)	Cápside externa (glicoproteína)	Glicoproteína estructural de la cápside externa Determina el serotipo G Protección
10 (751)	NSP4	175 (20.290)	No estructural	Enterotoxina Receptor para la gemación de las partículas de doble capa a través del retículo endoplasmático Protección Movilización del calcio de la célula hospedadora
11 (667)	NSP5	198 (21.725)	No estructural	Actividad quinasa potenciada por NSP2
	NSP6	92 (11.012)	No estructural	Interacciona con NSP5

Tabla 1.2. Propiedades y funciones de las proteínas codificadas por los segmentos de ARN bicatenario del genoma del rotavirus SA11.

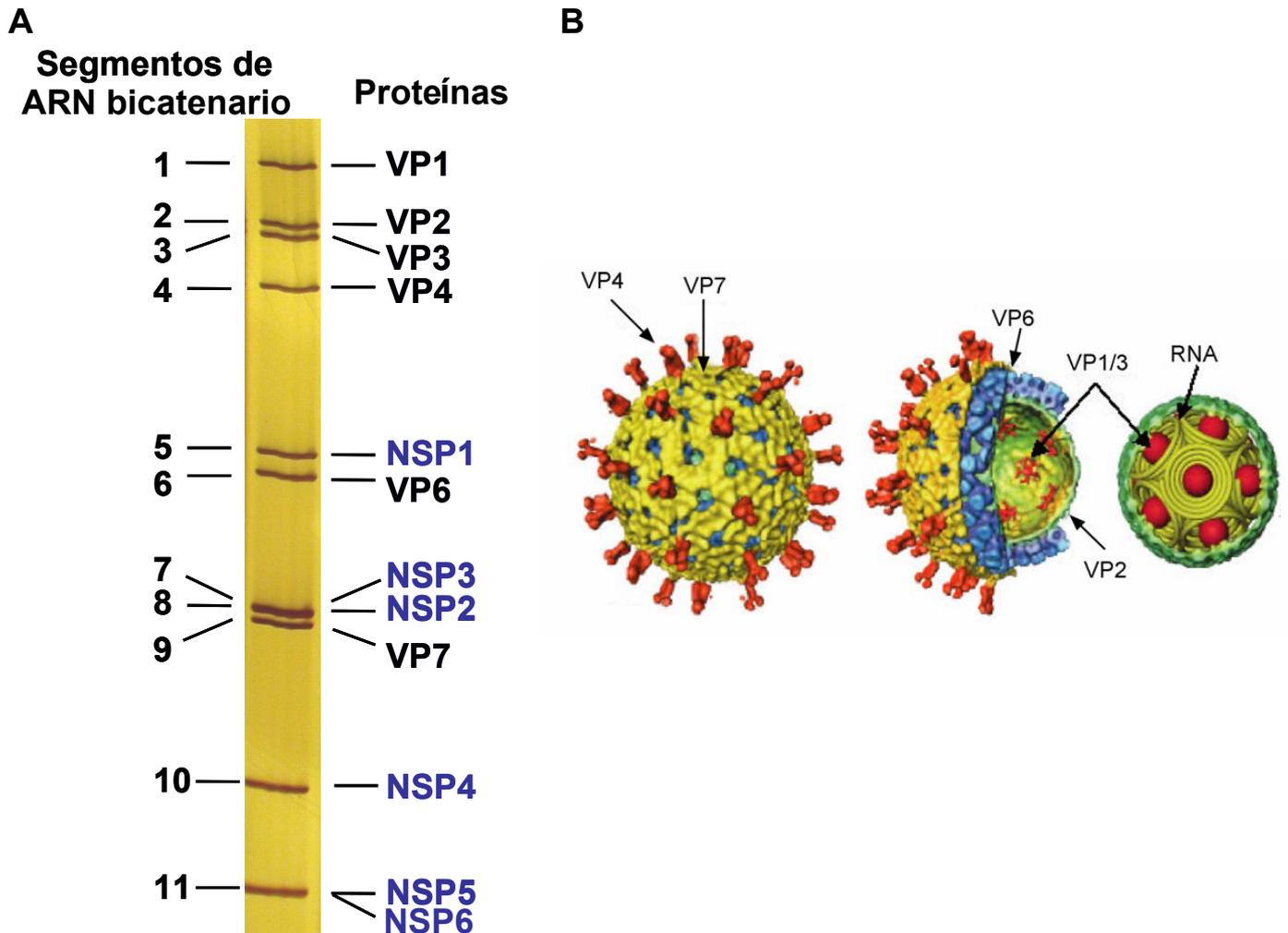


Figura 1.6. Visualización de los fragmentos genómicos y estructura de la cápside del virión de rotavirus. **A.** Migración de los 11 segmentos genómicos en gel de poliacrilamida (PAGE). A la izquierda se indica el número del segmento y a la derecha la proteína codificada por dicho segmento. **B.** Estructura tridimensional de la cápside viral. De izquierda a derecha se muestra la partícula viral completa, un corte transversal mostrando las tres capas y el núcleo que contiene los fragmentos genómicos (Adaptado de Jayaram et al. (2004).

La proteína VP2 compone la capa más interna de la cápside y forma el núcleo junto con las proteínas VP1 y VP3, siendo VP2 la proteína mayoritaria. VP2 interactúa por el exterior con la capa de VP6 y por el interior con el genoma y el complejo enzimático formado por las proteínas VP1/VP3. Esta disposición sugiere que esta proteína posee los determinantes necesarios para dirigir el ensamblaje correcto de las otras proteínas estructurales (Jayaram et al., 2004). La capa constituida por VP2 consiste en 120 moléculas organizadas en 60 dímeros formando una red icosaédrica con simetría T=1. Los estudios de criomicroscopía electrónica de partículas de doble capa han mostrado que la proteína VP2 también interacciona con el ARN genómico a través de la unión de residuos específicos en su extremo amino-terminal. Este hecho ha sugerido que otra función de la capa interna sea promover una organización estructural del genoma propicia para la transcripción. Por tanto, es posible que la organización de la capa interna haya evolucionado para servir al doble propósito de proporcionar la posición adecuada del complejo de transcripción y organizar el genoma para facilitar la transcripción (Jayaram et al., 2004).

El resto de proteínas estructurales forma junto con VP2 el núcleo de la cápside. La proteína VP1 es la ARN polimerasa ARN dependiente (Valenzuela et al., 1991). La proteína VP3 es una guanilil y metiltransferasa (Chen et al., 1999; Liu et al., 1992) con las funciones enzimáticas necesarias para la producción de la estructura cap del ARNm. Estas dos proteínas se hallan en baja concentración y son incorporadas a la cápside como un heterodímero que está anclado dentro de la superficie de la capa formada por VP2 (Prasad et al., 1996).

En los virus de ARN de doble cadena el genoma debe organizarse en una estructura que permita un proceso dinámico de transcripción. La transcripción de los múltiples segmentos debe de ser simultánea, repetida y rápida. En la familia *Reoviridae* este objetivo se cumple utilizando un complejo enzimático de transcripción que está anclado al interior de la cápside interna y funciona transcribiendo cada fragmento genómico independientemente. Al final, todos los segmentos genómicos se transcriben simultáneamente. Los estudios de criomicroscopía electrónica han revelado que en rotavirus el ARN viral forma una estructura dodecaédrica (Prasad et al., 1996), en la que las dobles hélices están empaquetadas alrededor de los complejos de transcripción que se localizan en los vértices icosaédricos (Pesavento et al., 2001). El ARN también interacciona estrechamente con la capa formada por VP2, la cual juega un papel importante en el mantenimiento del espacio apropiado entre las cadenas de ARN en el estado nativo. Además, bajo diferentes condiciones químicas

(por ejemplo el pH) el genoma de rotavirus tiene la capacidad de sufrir una condensación y expansión reversible dentro de la cápside (Pesavento et al., 2001). Esta capacidad junto con la estabilidad de la cápside son atributos importantes para llevar a cabo la transcripción continua de los múltiples segmentos dentro de la cápside.

1.3.3. Clasificación de rotavirus

Los rotavirus se clasifican serológicamente en grupos y serotipos según los determinantes antigénicos de las proteínas de la cápside media (VP6) y externa (VP4 y VP7) (Estes, 2001; Kapikian et al., 2001). El género *Rotavirus* se divide en 7 serogrupos designados con las letras A a la G, en base a la proteína VP6 que es la proteína mayoritaria del virión. Los distintos serogrupos difieren bastante genéticamente y no son capaces de sufrir recombinación de los fragmentos genómicos, aunque los virus dentro de un serogrupo sí que pueden hacerlo. La mayoría de los rotavirus patógenos humanos pertenecen a los grupos A, B y C, siendo el grupo A el más común y de aquí en adelante sólo me referiré a este serogrupo.

Cada serogrupo se clasifica en diferentes serotipos que se definen por las dos proteínas de la cápside externa, ya que son éstas las implicadas en la neutralización del virus. La proteína VP7 determina el serotipo G porque es una glicoproteína y la proteína VP4 define el serotipo P, puesto que es sensible a proteasas. Existen 15 serotipos G (determinados por la semejanza antigénica en ensayos de neutralización), que coinciden con los genotipos determinados por la secuencia de ácidos nucleicos. Más del 90% de los serotipos G circulantes en el mundo corresponden a G1, G2, G3, G4 y G9 (Santos y Hoshino, 2005). Hay 14 serotipos P, pero no existe una correspondencia exacta entre genotipos y serotipos, habiéndose descrito 23 genotipos P (el número siempre se representa encerrado entre corchetes). Según Santos y Hoshino. (2005) el serotipo P1 constituye más del 91% de las cepas de rotavirus circulantes humanos.

Existen múltiples combinaciones posibles entre los serotipos P y G, pero la variabilidad total de cepas está limitada. Las cepas de rotavirus que infectan humanos con serotipo G1, G3, G4 o G9 se asocian preferentemente al genotipo P[8], mientras que las cepas del serotipo G2 se agrupan frecuentemente con el genotipo P[4]. La distribución de los diferentes serotipos varía geográficamente (Tabla 1.3). Las diferencias pueden ser debidas a las diversas condiciones sanitarias, de clima y en aquellos lugares que presentan mayor diversidad de rotavirus al contacto más cercano

Continente País	Periodo de estudio	G1P[8]	G2P[4] Porcentaje	G3P[8]	G4P[8]	Otros (%)	Mixtas	No tipadas	Referencia
América									
EEUU	1996-97	66	8	7	1	G9P[6] (6) G9P[8] (2) G1P[6] (1)		8	(Ramachandran et al., 1998)
Argentina	1996-98	12	43	0	4	G1P[4] (14)	10	17	(Arguelles et al., 2000)
Europa									
España	1996-99	43	6	2	32		2		(Buesa et al., 2000)
Reino Unido	1995-99	77	10	3	5	G1P[4] (1) G1P[6] (<0.5) G1P[9] (<0.5) G2P[8] (<0.5) G3P[6] (<0.5) G3P[9] (<0.5) G4P[4] (<0.5) G4P[6] (<0.5) G8P[8] (<0.5) G9P[6] (1) G9P[8] (3) G sólo (5) P sólo (2)	1		(Iturriza-Gomara et al., 2000)
Asia									
India	2001	33	5	0	1	G1P[4] (2) G1P[6] (3) G2P[8] (4) G2P[6] (2) G4P[4] (2) G4P[6] (1)	31	17	(Das et al., 2004)
Bangladesh	1993-97	11	11	0	26	G1P# ⁽¹⁾ (6) G2P# ⁽¹⁾ (10) G3P# ⁽¹⁾ (11) G4P# ⁽¹⁾ (17)		8	(Unicomb et al., 1999)
África									
Sudáfrica	1988-89	57	22	<1	11	G1P[6] (<1) G4P[6] (10) G3P[9] (1)			(Geyer et al., 1995)
Kenia	1991-94	24 ⁽²⁾	17	1	42 ⁽²⁾	G8P[4] (2)		15	(Nakata et al., 1999)

⁽¹⁾ El genotipo P difiere del genotipo G al que está normalmente asociado.

⁽²⁾ No se ha determinado el genotipo P en todos los casos.

No determinado

Tabla 1.3. Combinaciones de genotipos G y P de rotavirus en estudios epidemiológicos a nivel mundial. Se muestran dos países representativos de cada continente. Para más información consultar la página web <http://www.eurorota.net/index.php>.

entre personas y rotavirus que infectan a animales (Santos y Hoshino, 2005).

La existencia de diferentes serotipos sugiere una función crítica de los anticuerpos específicos de serotipo en la protección frente a rotavirus. No obstante, existe una diversidad limitada de proteínas de la cápside externa. Aproximadamente, el 90% y el 65% de las cepas de rotavirus humanas circulantes en el mundo comparte algunos epítomos con reactividad cruzada para VP4 y VP7, respectivamente (Franco et al., 2006). Este hecho es una evidencia a favor de la hipótesis de que el sistema inmunitario no está ejerciendo una presión selectiva importante frente a rotavirus. De ello se desprende que el sistema inmunitario no favorecería el surgimiento de diferentes serotipos de rotavirus o la aparición de variaciones antigénicas menores en los serotipos actuales (Hoshino y Kapikian, 2000). De hecho, estudios de la distribución de serotipos de rotavirus a lo largo del tiempo también apoyan un papel relativamente moderado de la presión selectiva de los anticuerpos específicos de serotipo (Franco et al., 2006). No obstante, se ha observado que en un año la incidencia de serotipos individuales puede variar de una región a otra y múltiples tipos de G y P pueden circular dentro de la misma región (Santos y Hoshino, 2005).

1.3.4. Ciclo infectivo

1.3.4.1. Entrada

La capa externa del virión interviene en la unión al receptor celular, la adherencia y la entrada a la célula. Esta última es ejecutada principalmente por la proteína VP4, la cual está implicada en la unión a su receptor celular, la penetración de la membrana celular y también en hemaglutinación, neutralización y virulencia (Estes, 2001). La digestión proteolítica de VP4 (88 KDa) da lugar a las proteínas VP8* (28 KDa, fragmento del aminoácido 1 al 247) y VP5* (60 KDa, fragmento del aminoácido 248 al 776). Estos productos de la proteólisis permanecen asociados en el virión (Fiore et al., 1991). La proteólisis de VP4 potencia la infectividad viral varias veces (Arias et al., 1996; Estes et al., 1981) y facilita que la entrada del virus en las células sea más rápida y eficaz (Kaljot et al., 1988; Keljo et al., 1988). Para explicarlo se ha propuesto que la proteólisis estabiliza el ensamblaje de la espícula y confiere el ordenamiento icosaédrico de ésta (Crawford et al., 2001). También se ha comprobado que partículas activadas proteolíticamente y proteínas VP5* recombinantes poseen actividad lipofílica (Dowling et al., 2000; Ruiz et al., 1994). Por tanto, la proteólisis constituye un mecanismo clave para la internalización eficiente del virus. Esto es

relevante si consideramos que la replicación de rotavirus ocurre en los enterocitos del intestino delgado, que es un ambiente rico en proteasas.

Se desconoce la función precisa de la proteína VP7 de la capa externa durante las interacciones iniciales de los virus con la célula, pero se han postulado dos posibles mecanismos de acción. VP7 podría modular la función de VP4 durante el proceso de adherencia y entrada (Beisner et al., 1998; Mendez et al., 1996). El otro mecanismo es que VP7 podría interactuar con moléculas de la superficie celular después de las interacciones iniciadas por VP4 (Mendez et al., 1999).

La entrada celular es un proceso con múltiples estadios. La fase inicial de unión a la célula implica a receptores que contienen ácido siálico, y los pasos siguientes la unión a integrinas (Jayaram et al., 2004). Concretamente, en la interacción con ácido siálico está implicado un dominio de VP8*, mientras que en las interacciones con integrinas está implicada VP5*. La participación del ácido siálico en las infecciones por rotavirus no es un paso esencial en todas las cepas, ya que en la mayoría la entrada celular es independiente de ácido siálico, incluyendo rotavirus humanos (Ciarlet et al., 2001). En estos virus se ha postulado que la entrada celular está mediada por VP5* (Kirkwood et al., 1996; Padilla-Noriega et al., 1995). Estudios con células polarizadas muestran que los virus dependientes de ácido siálico entran por la membrana apical, mientras que los virus independientes de ácido siálico entran tanto por la cara apical como por la basolateral, demostrando que existen variaciones en los mecanismos de entrada entre virus dependientes e independientes de ácido siálico (Ciarlet et al., 2001).

Uno de los primeros sucesos después de la entrada celular es la pérdida de la capa externa, dando lugar a las partículas de doble capa, que son las partículas transcripcionalmente activas. La decapsidación se puede reproducir "in vitro" mediante el tratamiento con quelantes de calcio como EDTA (Cohen et al., 1979). Estudios con baculovirus recombinantes expresando VP7 han mostrado que se requiere calcio para la formación de los trímeros de VP7 (Dormitzer et al., 2000). Por ello, se necesita una concentración apropiada de calcio para mantener la integridad estructural de la capa externa. Concentraciones bajas de calcio similares a la del citoplasma desencadenan la disociación de los trímeros de VP7, lo que conduce al desprendimiento de la capa externa.

1.3.4.2. Transcripción y replicación

Los virus de ARN de doble cadena deben sortear una serie de problemas para llevar a cabo la transcripción y replicación. En primer lugar deben evitar las respuestas antivirales de la célula infectada que se desencadenan por la aparición del ARN de doble cadena. También requieren que las distintas actividades enzimáticas relacionadas con el genoma ocurran en los límites de la cápside para evitar la degradación del genoma por las nucleasas celulares. Otro problema es que se deben coordinar la arquitectura de la cápside y la organización del genoma para asegurar que se produzcan rondas repetidas de transcripción de los diferentes fragmentos del genoma. Por último, durante un ciclo de transcripción cada segmento de ARN tiene que desplazarse alrededor de la polimerasa y debe ser desenrollado, separado, transcrito y vuelto a unir en sucesivas rondas de transcripción. Para explicar como rotavirus resuelve estos problemas se ha postulado un modelo en el que hay diversos complejos enzimáticos de transcripción que funcionan independientemente y que están unidos a los vértices de la capa interna. Este modelo explica la transcripción de cada segmento genómico y que todos los segmentos sean transcritos simultáneamente (Jayaram et al., 2004). Los estudios "in vitro" indican que las partículas competentes en transcripción son máquinas moleculares altamente eficientes, que son capaces de realizar ciclos sucesivos de transcripción y que este proceso parece ser increíblemente rápido.

Los transcritos de ARN de cadena positiva poseen estructura cap y desempeñan una doble función. Por una parte, codifican las proteínas de rotavirus y por otra funcionan como moldes para la producción de la cadena negativa. Ésta es transcrita por la polimerasa viral VP1, que dará lugar a la progenie de ARN de doble cadena. Por tanto, los procesos de transcripción y replicación son complementarios e implican a la polimerasa viral. Además, ambos procesos tienen lugar en el confinado ambiente de la cápside interna (Patton y Spencer, 2000), ya que en ningún virus de ARN de doble cadena se ha encontrado ARN bicatenario libre.

1.3.4.3. Morfogénesis y liberación de las partículas virales

Después de la transcripción endógena y la liberación de los transcritos, el ciclo infectivo continúa con la traducción y síntesis de las proteínas virales. La proteína NSP3 facilita la traducción de los transcritos de ARNm al eludir la necesidad de la cola de adeninas por parte de la célula infectada y evitar su degradación por nucleasas celulares.

Después de la replicación se produce el empaquetamiento del genoma y el ensamblaje de las partículas de doble capa (formadas por la capa interna de VP2 con las proteínas VP1/VP3 y la capa intermedia de VP6). Se desconoce cómo cada partícula viral incorpora un conjunto de segmentos genómico correcto, al igual que en el resto de virus de ARN bicatenario. Estos procesos tienen lugar en inclusiones citoplasmáticas denominadas viroplasmias (Petrie et al., 1984). Los viroplasmias son una estructura especializada formada dentro o cerca del retículo endoplasmático. Las partículas subvirales emergen del viroplasma y son dirigidas para entrar en el retículo endoplasmático gracias a la interacción de la proteína VP6 con NSP4. Ésta última es una proteína transmembrana que actúa como receptor de las partículas subvirales. Durante la entrada de las partículas al interior del retículo endoplasmático éstas adquieren una envuelta lipídica que desaparece durante los siguientes procesos de la morfogénesis viral. La glicosilación de la proteína NSP4 es crítica para la eliminación de la envoltura transitoria (Petrie et al., 1984). En un paso posterior la NSP4 se traslada hasta sitios de contacto entre el retículo endoplasmático y la red del trans-Golgi y allí se asocia con "rafts". Los "rafts" o bolsas lipídicas son microdominios especializados de la membrana que están enriquecidos en colesterol y glicoesfingolípidos. Estos "rafts" participan en los mecanismos de transporte de proteínas celulares a la cara apical de la membrana celular por una vía de exocitosis atípica.

Finalmente, siguiendo el modelo propuesto por Delmas et al. (2004), sucede un evento de fusión entre el compartimento en el que están madurando los viriones (posiblemente derivado del retículo endoplasmático) y un compartimento que contiene "raft" y en los que está presente la proteína VP4. Esta fusión está dirigida por proteínas celulares que interactúan con VP4, posiblemente rab5 y PRA1. Después de la fusión se produce la maduración final de las partículas virales con la participación de la proteína NSP4, ya que ésta actúa como receptor de la glicoproteína VP7 y la proteína VP4 con las que forma hetero-oligómeros. Como resultado final se forman vesículas que contienen un número limitado de viriones maduros (Jourdan et al., 1997). En células no polarizadas, como MA104, las partículas son liberadas mediante la lisis celular. En células polarizadas, como Caco2 que es un sistema celular que mimetiza bastante bien la diana natural de rotavirus, las partículas virales son selectivamente liberadas desde la cara apical debido a una señal dirigida a la membrana apical presente en VP4. Este proceso conlleva una extensa preservación de la viabilidad celular.

1.3.5. Patología

Las infecciones por rotavirus son la causa más frecuente de diarrea en niños menores de 5 años. Estos virus infectan a los niños a una edad temprana. Aunque la mayoría de las infecciones primarias causan una diarrea leve, un 15-20% de los niños necesitan atención médica y entre 1-3% padece deshidratación siendo necesaria la hospitalización (Glass et al., 2006). El virus se puede identificar en el 15-35% de los niños menores de 5 años atendidos por diarrea extrahospitalaria y entre el 25-55% de los niños hospitalizados por diarrea (Cook et al., 1990).

Rotavirus se transmite por vía fecal-oral y sólo es necesaria una pequeña dosis infectiva (menos de 100 partículas víricas). Esta dosis infectiva facilita su diseminación de persona a persona y posiblemente por vía aérea mediante aerosoles (Estes, 2001). Una vez ingeridos, los virus que no han sido neutralizados por la acidez del estómago infectan la mucosa del intestino delgado. Durante el periodo de incubación, que dura entre 18-36 horas, el virus penetra en las células epiteliales (Figura 1.7) y las infecta hasta destruir la superficie del epitelio provocando la eliminación de los villi, destrucción masiva y liberación de grandes cantidades de virus en las heces ($> 10^{12}$ partículas por gramo) (Kapikian et al., 2001). El resultado es una profusa diarrea acuosa con pérdida de fluidos y electrolitos que puede durar 2-7 días y conducir a una deshidratación grave. La rehidratación intensa oral o intravenosa puede corregir estos desequilibrios y mantener al niño hasta que la diarrea se detenga.

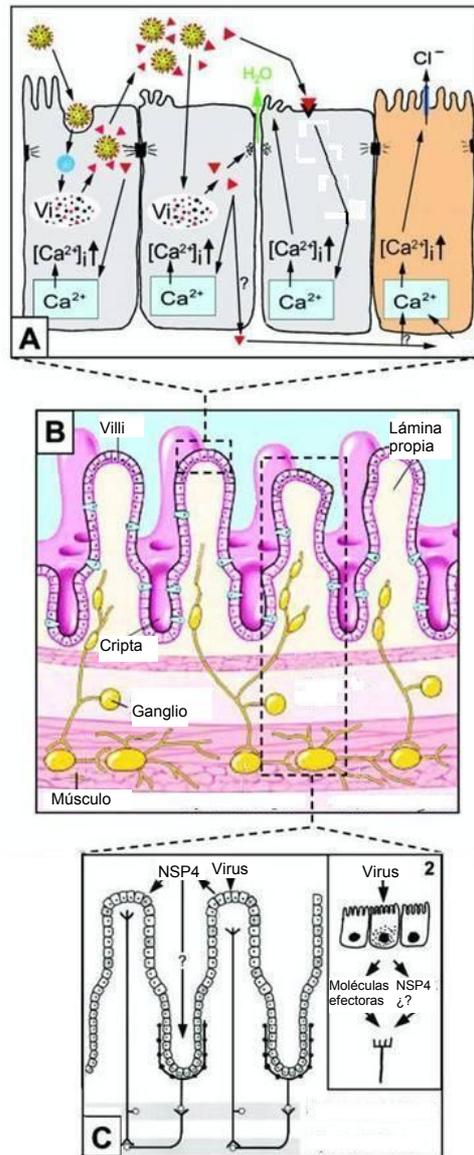


Figura 1.7. Mecanismos efectores de la diarrea causada por rotavirus. A. El proceso que conduce a la diarrea se inicia cuando al menos 100 partículas víricas infectan a los enterocitos en el intestino delgado. El virus es internalizado por un mecanismo desconocido y la cápside externa es eliminada, activando la transcriptasa asociada al virión y la síntesis del genoma. Las proteínas y ARNs virales se concentran en estructuras citoplasmáticas llamadas viroplasm (Vi) donde transcurre la replicación del ARN y el ensamblaje de las partículas virales. Eventos intracelulares, que implican probablemente a la proteína NSP4 (triángulos rojos), provocan la liberación de calcio (Ca^{2+}) del retículo endoplasmático, que desencadena una cascada de procesos celulares que conducen a la muerte celular. La liberación de la proteína NSP4 desde células infectadas produce efectos paracrinós en células no infectadas. La proteína NSP4 secretada se une a las células mediante un receptor no identificado desencadenando una cascada que culmina en la liberación de calcio intracelular. Uno de los resultados es la ruptura de las uniones intercelulares aumentando la permeabilidad (flecha verde). **B.** Esquema que muestra la arquitectura normal del intestino, enfatizando la inervación del sistema nervioso

entérico (ENS) y sus ganglios en los diferentes niveles de la submucosa. **C.** La proteína NSP4 desencadena la secreción de agua en las criptas al activar un transportador de cloro situado en las mismas. El resultado es el incremento del componente secretor de la diarrea. Moléculas efectoras como la proteína NSP4 secretada u otras liberadas de células infectadas pueden estimular el ENS. Adaptado de Ramig. (2004).

La fisiopatología de la diarrea causada por rotavirus es multifactorial y es el resultado conjunto de efectos directos e indirectos de la infección viral y de la respuesta del hospedador. En la Tabla 1.4 se resumen los factores productores de diarrea causados por el virus. Existe una disminución de la absorción que parece relacionarse con el daño primario al epitelio intestinal por la infección viral (Kapikian et al., 2001). Además, se produce una disminución en la absorción de agua, sodio y disacáridos (Chrystie et al., 1978; Graham et al., 1984). El bolo alimenticio no digerido es osmóticamente activo y el colon es incapaz de absorber suficiente agua generando una diarrea osmótica. Otra hipótesis es que el fallo en la absorción se origina por el daño epitelial producido por la isquemia de las células epiteliales (Osborne et al., 1988). El hecho de que con frecuencia lesiones en el intestino no se correlacionen con la presencia de diarrea ha conducido a la búsqueda de otros mecanismos inductores de diarrea. Se ha observado que la proteína no estructural NSP4 posee una actividad tóxica y es capaz de inducir diarrea en ratones inoculados con la proteína completa, fragmentos o péptidos (Ball et al., 1996; Estes y Morris, 1999; Zhang et al., 2000). Se ha comprobado que esta proteína se secreta en el curso de la infección antes de que se produzca el daño tisular. También se ha sugerido la implicación del sistema nervioso entérico (ENS), puesto que inhibidores que bloquean su acción atenúan la secreción inducida por rotavirus (Lundgren et al., 2000; Lundgren y Svensson, 2001). En el modelo murino se ha estimado que, aproximadamente, el 67% de la secreción de electrolitos y fluidos en la diarrea por rotavirus se debe a la activación del ENS (Lundgren et al., 2000). El modo de activación del ENS no está claro, pero puede producirse a través de la NSP4 secretada o de quimioquinas y otros factores liberados por las células epiteliales infectadas.

Característica	Comentario
Periodo de incubación corto (entre 1-2 días).	Tiempo insuficiente para reclutar altos niveles de los mecanismos efectores de la inmunidad.
Las primeras células infectadas son las utilizadas para la replicación viral.	
El virus se excreta en grandes cantidades (títulos superiores a 10^{11} ufp/gramo de heces).	
Tras 5-7 días del comienzo de la diarrea en niños un porcentaje mayor del 30% continúa excretando antígenos.	Alto inóculo y propagación viral.
Alta tasa de mutación viral y reordenamiento genómico.	Puede permitir al virus escapar del sistema inmunológico (no comprobado actualmente).
Aproximadamente el 50% de las infecciones son asintomáticas.	Rotavirus está bien adaptado al hombre.

Tabla 1.4. Factores productores de diarrea asociados a rotavirus y que contribuyen probablemente a la reinfección.

Hasta hace poco tiempo se pensaba que la infección por rotavirus estaba localizada en el intestino delgado, pero recientemente se ha demostrado la existencia de viremia en niños con diarrea causada por rotavirus (Blutt et al., 2007). Además, ésta se correlaciona con antigenemia (Blutt et al., 2003), por lo que puede ser considerada un marcador de la presencia extraintestinal de rotavirus (Blutt y Conner, 2007). En los animales también se ha detectado antigenemia que se acompaña de una viremia transitoria, como lo demuestra la presencia de virus infectivos en el suero de prácticamente todos los animales analizados (Ramig, 2004). Las posibles consecuencias clínicas de la viremia en humanos son todavía desconocidas. Durante la viremia virus infectivos podrían acceder a la mayoría de tejidos y tipos celulares, como pone de manifiesto la detección de ARN extraintestinal (Blutt et al., 2003) y proteínas no estructurales en órganos (Gilger et al., 1992). La detección de virus infecciosos en el suero sugiere un posible mecanismo de cómo los virus alcanzan estos lugares. A pesar de ello, no es probable que la infección sistémica tenga siempre significación clínica. Es posible que la viremia por rotavirus resulte en infección extraintestinal subclínica y que en algunos casos puede progresar a enfermedades

clínicas. Esta hipótesis puede explicar la amplia gama de enfermedades asociadas a la infección por rotavirus, como son la atresia biliar, neumonía, coagulación intravascular diseminada y síndrome de Reye, entre otras. Estas patologías junto al hecho de que rotavirus cause viremia plantean una reevaluación de la asociación de rotavirus con otras enfermedades no intestinales.

1.3.6. Protección frente a la enfermedad

1.3.6.1. Modelo en el ratón

1.3.6.1.1. Respuesta inmunitaria humoral

Las células B son necesarias para una protección intensa y de larga duración frente a rotavirus, como se ha demostrado en ratones deficientes en células B (Franco y Greenberg, 1999). En los ratones normales se desencadena tanto una respuesta sistémica de células B como una respuesta local en mucosas. En la respuesta sistémica se produce una selección clonal de células B presentes en el bazo y médula ósea que expresan inmunoglobulinas de clase G (IgG) y de clase A (IgA). En mucosas, lo más probable es que las células B situadas en las placas de Peyer y la lámina propia del intestino produzcan IgAs poliméricas (Youngman et al., 2002). Estos resultados concuerdan con la detección de antigenemia y la aparición de viremia durante la fase aguda de la infección. La transferencia pasiva de células B comprometidas intestinalmente pero no sistémicamente (células B que expresan receptores específicos para dirigirse a órganos en mucosas) en ratones inmunodeficientes (deficientes en células B y T) con infección crónica suprime la infección por rotavirus (Williams et al., 1998). Estos experimentos sugieren que es importante que las células plasmáticas efectoras se localicen en el intestino para su efecto antiviral y que los anticuerpos séricos no son muy eficientes para la protección. Teniendo en cuenta estos resultados Franco et al. (2006) han propuesto un modelo en el que los antígenos de rotavirus estimulan los dos compartimentos del sistema inmunitario: en mucosas y en sangre (Figura 1.8). En las mucosas, los antígenos de rotavirus estimulan las placas de Peyer para generar células B memoria con receptores de retorno al lugar de origen (“homing”), que permiten a estas células circular por la sangre y volver a las placas de Peyer. Además, las células secretoras de anticuerpos que se localizan en la lámina propia secretan IgAs poliméricas. Estos anticuerpos son capaces de mediar la expulsión y la exclusión viral y pasan a la luz intestinal. El antígeno viral que circula por vía sistémica estimula las células B memoria que poseen receptores de vuelta al bazo.

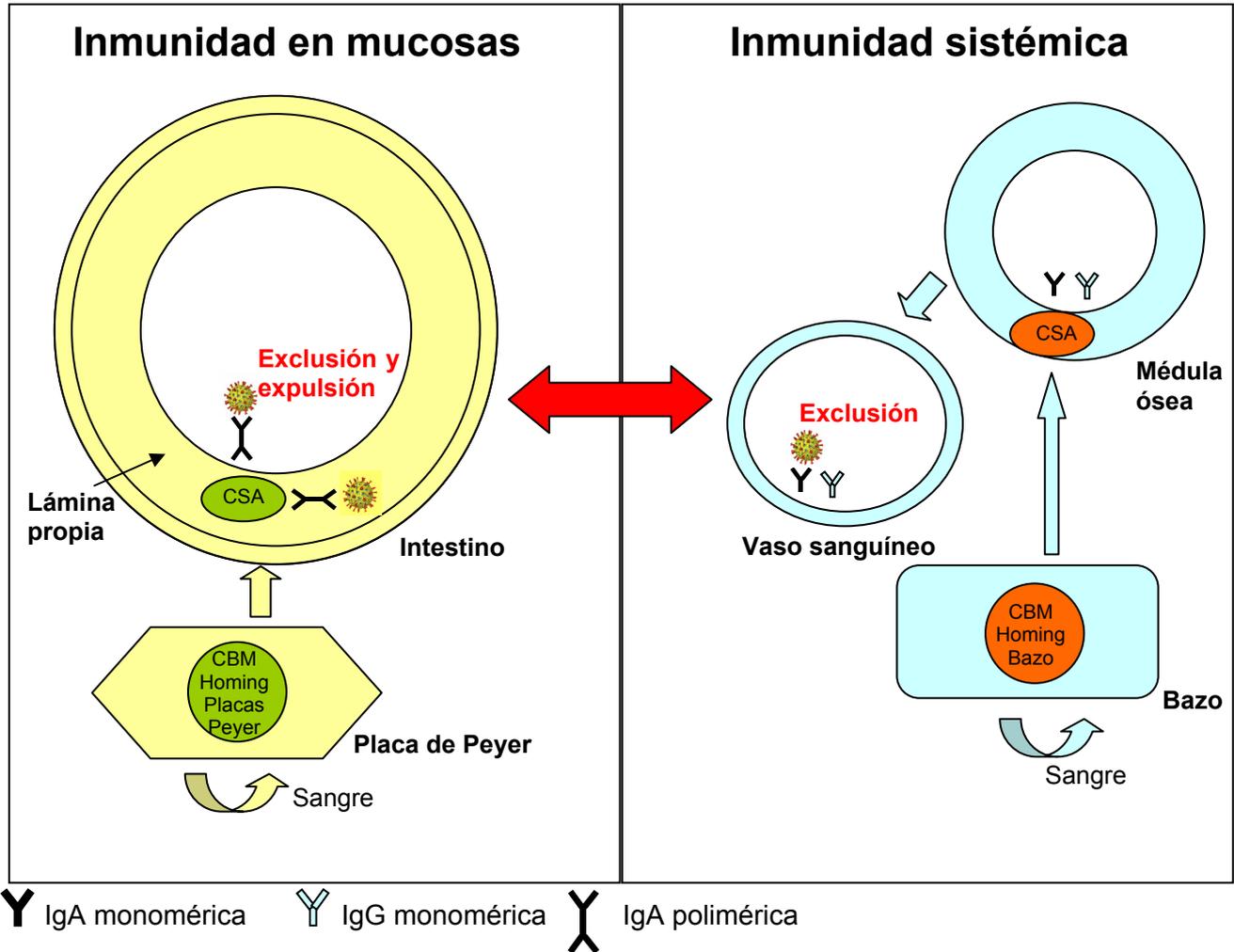


Figura 1.8. Modelo de la inmunidad frente a rotavirus. El sistema inmunitario está compuesto por dos compartimentos: el compartimento sistémico y el de mucosas. En este último, el antígeno de rotavirus estimula a células B para convertirse en células B memoria (CBM) con receptores “homing” específicos y células secretoras de anticuerpos (CSA). Las CBM poseen receptores “homing” específicos que les permiten circular por la sangre y volver a las placas de Peyer. Las CSA se asientan en la lámina propia intestinal y secretan IgAs poliméricas, que son vertidas en la cavidad intestinal. Estos anticuerpos son capaces de mediar los fenómenos de expulsión y exclusión viral. El antígeno vírico en el compartimento sistémico estimula a CBM en el bazo con receptores “homing” específicos que les permiten circular por la sangre y volver al bazo y a CSA que se asientan en la médula ósea y secretan IgAs monoméricas e IgGs. Estos anticuerpos son la principal fuente de anticuerpos séricos. A pesar de esta división en compartimentos inmunes existe una relación entre ellos, como se indica por la flecha verde. Anticuerpos de ambos tipos de inmunidad pueden circular entre ambos compartimentos por mecanismos no esclarecidos totalmente. Entonces, algunos anticuerpos sistémicos pueden potencialmente mediar bajos niveles de exclusión viral e IgAs séricas pueden ser una correlación de IgAs intestinales.

El antígeno en sangre también estimula a las células secretoras de anticuerpos que se localizan en la médula ósea y que secretan IgAs e IgGs monoméricas. Estos anticuerpos son la principal fuente de anticuerpos sistémicos. Puede existir transferencia de anticuerpos desde cualquier compartimento (sangre y cavidades intestinales), pero se desconoce cuáles son los mecanismos. Por tanto, algunos anticuerpos sistémicos pueden potencialmente mediar bajos niveles de exclusión viral intestinal e IgAs séricas pueden correlacionarse con IgAs intestinales. Esta última situación se ha observado específicamente en rotavirus a partir de los 4 meses tras la infección (Hjelt et al., 1985). Aunque se ha documentado la importancia para la protección de los anticuerpos sistémicos frente a la toxina NSP4 que alcanzan el intestino (Bouvet y Fischetti, 1999), no se han realizado estudios de su posible efecto en la protección frente al virus. En nuestro laboratorio se ha estudiado la prevalencia de la producción de anticuerpos anti-NSP4 en España (Rodríguez-Díaz et al., 2005). La mayor capacidad antiviral de las células secretoras de anticuerpos que se localizan en la lámina propia para mediar su efecto antiviral se puede explicar por su capacidad para mediar la expulsión y la exclusión de rotavirus dentro del enterocito y en el lumen intestinal, respectivamente (Bouvet y Fischetti, 1999).

Se han propuesto dos mecanismos de actuación de los anticuerpos: expulsión y exclusión. El mecanismo clásico de exclusión (evitar la infección de enterocitos no infectados) se produce por anticuerpos dirigidos frente a las proteínas de la cápside externa VP4 y VP7. Estos anticuerpos pueden bloquear la infección de los enterocitos cuando están presentes en el lumen del intestino. Anticuerpos dirigidos frente a la proteína NSP4 pueden detener la diarrea pero no la infección dado sus efectos anti-toxina (Ball et al., 1996). Parece ser que anticuerpos IgA anti-rotavirus son uno de los mecanismos más eficaces para proteger frente a rotavirus. Aunque también se ha observado que anticuerpos específicos IgM o IgG presentes en el intestino, o en la sangre en suficientes cantidades, pueden alcanzar el intestino por mecanismos desconocidos y mediar también protección (Kuklin et al., 2001; O'Neal et al., 2000). El mecanismo de expulsión de rotavirus se refleja en la capacidad de los anticuerpos IgA poliméricos anti-VP6 para mediar efecto antiviral (Burns et al., 1996). Se ha hipotetizado que durante la transcitosis de IgAs poliméricas desde la membrana basolateral al lumen del intestino éstas se unen a la proteína VP6 y “expulsan” a la luz intestinal al virus. También se ha visto que las proteínas VP6 (Burns et al., 1996; Choi et al., 2003) y NSP4 (Ball et al., 1996) son dianas de anticuerpos protectores en el modelo de ratón adulto y lactante, respectivamente. Sin embargo, se ha observado que los anticuerpos anti-VP6 no protegen cuando se administran pasivamente a la

cavidad intestinal (Burns et al., 1996). Además, las leches que contienen anticuerpos tampoco protegen a los ratones lactantes (Coste et al., 2000). Las IgAs podrían ser transportadas por los enterocitos de la cripta, ya que son mayoritariamente éstos los que expresan el receptor de inmunoglobulinas poliméricas. Cuando los enterocitos alcanzan el borde en cepillo (lugar de la infección) pueden contener IgAs que pueden mediar la expulsión viral. No obstante, la producción de anticuerpos frente a VP6 que median la expulsión viral sólo se ha demostrado en ratones. Además, se desconoce si estos anticuerpos pueden modular la diarrea inducida por rotavirus. También se ha propuesto otro modelo alternativo y no excluyente que sugiere que los anticuerpos intracelulares inhiben la transcripción de rotavirus (Feng et al., 2002).

En el modelo de ratón adulto se puede inducir una inmunidad heterotípica por las cepas heterólogas RRV (simio) y NCDV (bovina) (Feng et al., 1997). Si se inoculan bajas dosis orales de RRV a ratones estos responden con anticuerpos sistémicos pero no intestinales y estos animales no están protegidos. No obstante, mayores dosis de RRV inducen anticuerpos sistémicos e intestinales y protección. En el caso de la cepa NCDV se necesitan dosis altas para producir protección (replica pobremente en ratón). No se dispone de una explicación clara de estos hallazgos, pero es posible que en el caso de RRV se puede relacionar con el hecho de que este virus puede diseminarse del intestino y que una dosis relativamente baja puede replicar sistémicamente en el ratón (Franco y Greenberg, 1999).

1.3.6.1.2. Respuesta inmunitaria celular

Las células T CD4⁺ son esenciales para el desarrollo de más del 90% de los anticuerpos IgA intestinales específicos de rotavirus, por tanto, su presencia parece ser crítica para el establecimiento de una respuesta de memoria duradera (Buesa et al., 1999; Franco y Greenberg, 1999). Se ha comprobado que en ausencia de células T persiste una infección crónica y de baja replicación (VanCott et al., 2001). Aun más, células murinas T CD8⁺ específicas están implicadas en la resolución de la infección primaria por rotavirus y pueden mediar protección parcial a la reinfección durante un periodo corto de tiempo (Franco y Greenberg, 1999).

1.3.6.2. Protección en niños tras la infección natural

Las primeras infecciones por rotavirus son generalmente las más severas, y la intensidad de los síntomas disminuye con el número de infecciones. La mayor protección conferida tras la infección por rotavirus se produce en la enfermedad de

moderada a grave, es menor en la enfermedad leve y es todavía menor frente a la infección asintomática. No obstante, esta última confiere protección en un grado comparable a la conseguida por la infección sintomática (Velazquez et al., 1996; Velazquez et al., 2000). Dos eventos de infección por rotavirus resultan en una protección completa frente a la enfermedad de moderada a grave, ya sean sintomáticos como asintomáticos. Una única infección natural generalmente confiere protección comparable a las vacunas comercializadas.

No existe un marcador seguro para evaluar la protección. En el estudio de Velázquez et al. (2000) niños con un título de anticuerpos séricos IgA anti-rotavirus superior a 1:800 mostraron un riesgo bajo de sufrir infecciones por rotavirus y estaban protegidos completamente frente a la diarrea de moderada a grave. Sin embargo, los niños con un título de anticuerpos IgG superior a 1:6.400 estaban protegidos frente a la infección por rotavirus pero no frente a la diarrea. Sólo se consiguieron títulos de anticuerpos protectores tras dos infecciones consecutivas por rotavirus, sintomáticas o asintomáticas. En estos estudios se ha visto la tendencia de que es menos probable que ocurran infecciones repetidas con el mismo serotipo G, lo que sugiere protección homotípica. No obstante, una única infección natural ofreció ciertos niveles de protección frente a la enfermedad grave de una cepa G heterotípica, lo cual demuestra la presencia de cierta inmunidad heterotípica. Otros estudios similares confirman estos resultados, siendo incluso necesarios títulos menores de los anticuerpos que se correlacionan con la protección frente a la infección y la enfermedad (O'Ryan et al., 1994b). En el estudio de Hjelt et al. (1987) fueron los niveles de IgA séricos pero no los de IgG séricos, los que se correlacionaron con la enfermedad menos grave. La explicación propuesta por los autores es que la presencia de IgAs séricas frente a rotavirus se correlaciona con la presencia de inmunoglobulinas provenientes del compartimento de mucosas. Siguiendo el modelo propuesto por Franco et al. (2006) estos anticuerpos son probablemente IgAs poliméricas originadas en el intestino y que alcanzan el suero. Algunos estudios han buscado la correlación entre el nivel de anticuerpos IgA fecales y protección frente a la infección natural por rotavirus en niños (Coulson et al., 1992; Matson et al., 1993). En estos estudios hallaron que los títulos de anticuerpos IgA fecales se asociaban con protección a la infección y la enfermedad, pero había un número significativo de niños con unos títulos elevados de IgA fecales que estaban infectados. Una posible explicación de este hecho es que estas IgAs provengan de la leche materna y quizás puedan tener menor eficacia protectora porque no pueden mediar la expulsión viral. Además, se ha visto que los títulos de

anticuerpos fecales decaen más rápidamente que los séricos, pero ambos pueden persistir durante más de un año (Bernstein et al., 1989).

Por último, se ha analizado el papel de los anticuerpos neutralizantes en la protección frente a rotavirus. En el estudio de Chiba et al. (1986) la protección frente a la gastroenteritis causada por rotavirus parece ser específica del serotipo y estar relacionada con los niveles de anticuerpos frente al virus homotípico, aunque también se sugería que se podía inducir inmunidad heterotípica. Otros estudios confirman este supuesto (O'Ryan et al., 1994a). En un estudio posterior de este grupo demostraron que niveles más elevados de IgA e IgG y de anticuerpos homotípicos que reconocen específicamente la región antigénica C de los serotipos G1 y G3, se correlacionan con protección frente a la infección y la enfermedad. Además, esta protección es independiente de los títulos de IgA o IgG séricos específicos (O'Ryan et al., 1994b).

Se puede concluir que las IgAs séricas totales y los anticuerpos neutralizantes séricos homotípicos y heterotípicos parecen correlacionarse mejor con la protección que con los anticuerpos IgG séricos anti-rotavirus inducidos por la infección natural en niños. Considerando los modelos animales, la capacidad de las IgAs séricas anti-rotavirus (que reconocen principalmente a VP6 y sólo median la expulsión viral) para predecir la protección se explicaría porque estos anticuerpos reflejan la producción de anticuerpos intestinales. Por tanto, estos anticuerpos pueden utilizarse como marcador de la protección en sustitución de la detección de anticuerpos anti-VP4 y anti-VP7 (aunque éstos sean potencialmente más protectores), al mediar tanto expulsión como exclusión.

1.3.6.3. Protección conferida por la vacunación

Una vacuna frente a rotavirus debe tener en cuenta unos objetivos específicos, como son:

1. La vacuna debe superar el grado de protección frente a la enfermedad que surge tras la infección natural. Por lo tanto, el programa de vacunación debería prevenir la enfermedad moderada o grave, pero no necesariamente la enfermedad leve asociada con rotavirus.
2. Además de reducir la mortalidad causada por rotavirus, la vacuna debe disminuir los casos de atención primaria y el número de niños que ingresan en el hospital.

3. La vacuna tiene que ser efectiva en países en vías de desarrollo, que son los que soportan la mayor mortalidad originada por rotavirus en el mundo.
4. La vacuna debe conseguir una buena protección heterotípica, para ser efectiva ante la aparición de nuevas variantes o la emergencia de genotipos poco frecuentes.

Las estrategias para desarrollar vacunas frente a rotavirus para su aplicación en humanos han sido tres hasta ahora:

1. La aproximación tradicional de Jenner, es decir, la atenuación basada en la restricción del rango del hospedador (Hoshino y Kapikian, 1994). La capacidad de rotavirus para intercambiar fragmentos genómicos durante las infecciones mixtas ha permitido la producción de vacunas recombinantes, lo que se denomina la aproximación de Jenner modificada. Estos virus recombinantes contienen los genes de la cepa de rotavirus parental animal y algunos genes de la cepa de rotavirus parental humana. Esta nueva generación de vacunas incluyen más de un serotipo G de rotavirus para proporcionar inmunidad homotípica y heterotípica. Éste es el caso de las vacunas RotaShield y Rotateq.
2. Otra estrategia es la atenuación de virus humanos por pases en cultivo celular (Bernstein et al., 1999). Ésta es la estrategia utilizada en la vacuna Rotarix.
3. Por último, se ha propuesto el empleo de cepas de rotavirus recuperadas de recién nacidos infectados pero asintomáticos, ya que estas cepas son menos virulentas de forma natural (Barnes et al., 2002; Glass et al., 2005). Actualmente, se está evaluando la cepa humana atenuada RV3 en Australia.

1.3.6.3.1. Vacuna basada en recombinantes de rotavirus humano y mono Rhesus (RotaShield)

Fue la primera vacuna comercializada globalmente para rotavirus. Es una vacuna recombinante multivalente de administración oral (rotavirus de mono Rhesus). Esta vacuna contiene una mezcla de 4 cepas víricas que representan los genotipos G más comunes (G1 a G4). El gen de VP7 de la cepa de mono Rhesus parental RRV "MMV18006" se ha sustituido por los genes de VP7 de 3 cepas recombinantes entre mono Rhesus y humanos, que contienen el gen de VP7 de los serotipos humanos G1, G2 y G4. La cuarta cepa contiene el serotipo G3, que corresponde al serotipo de rotavirus de mono Rhesus (Kapikian et al., 1996).

Esta vacuna se evaluó en ensayos clínicos en EEUU, Finlandia y Venezuela con una alta eficacia (80-100%) para prevenir la diarrea grave causada por rotavirus (Joensuu et al., 1997; Perez-Schael et al., 1997; Rennels et al., 1996; Santosham et al., 1997).

Después de estos buenos resultados y tras la inclusión de la vacuna en el calendario de vacunación en EEUU, se produjeron algunos casos de invaginación intestinal asociados a la vacuna (CDC, 1999). El periodo de mayor riesgo de invaginación se situaba entre los 3 y los 10 días tras la primera de 3 dosis orales (Kramarz et al., 2001). Un grupo internacional de expertos sugirió una tasa consenso de 1 caso por cada 10.000 niños vacunados, a pesar de que la incidencia global de este suceso adverso era difícil de asegurar (Peter y Myers, 2002). Se desconoce cuál es el mecanismo fisiológico que provoca este fenómeno tras la vacunación. El fabricante (Wyeth) retiró esta vacuna del mercado en 1999 como consecuencia de este raro, pero potencialmente peligroso, efecto adverso. Desafortunadamente, la vacuna no ha sido evaluada en términos de riesgo-beneficio para su aplicación en países con bajos recursos económicos.

1.3.6.3.2. Vacuna basada en recombinantes de rotavirus humano y bovino (Rotateq)

Es una vacuna recombinante pentavalente entre humana y bovina (cepa WC3) y de administración oral que ha sido desarrollada por la farmacéutica Merck (Tabla 1.5). Esta vacuna contiene 5 virus recombinantes vivos: 4 recombinantes que expresan la proteína VP7 de cepas parentales de rotavirus humanos (G1, G2, G3 o G4) asociadas con la proteína VP4 de la cepa parental de rotavirus bovino WC3, que posee el serotipo P7[5]. El quinto recombinante expresa la proteína P1A[8] de una cepa parental de rotavirus humano y la proteína de la cápside G6 de la cepa parental de rotavirus bovino.

Rotateq ya ha sido evaluada en un gran estudio clínico de fase III, que en total incluye a 11 países y más de 70.000 niños (Vesikari et al., 2006). La inmunidad se ha evaluado utilizando como marcador el título de anticuerpos IgA séricos específicos frente a rotavirus. Se han visto tasas del 95% de seroconversión de anticuerpos IgA frente a rotavirus, comparado con el 14% de seroconversión en el grupo placebo. También se ha determinado la eficacia de la vacuna en dos estudios de fase III (Block et al., 2007; Vesikari et al., 2006). En estos estudios, la eficacia frente a la

gastroenteritis causada por rotavirus de cualquier gravedad después de completar un régimen de 3 dosis fue del 74%, y frente a la gastroenteritis grave del 98%. Se ha comprobado que es altamente eficaz para evitar la gastroenteritis causada por el serotipo predominante G1 (75% de eficacia) sin importar la gravedad, y por el serotipo G2 (63% de eficacia). En el resto de serotipos existe una tendencia, pero no es estadísticamente significativa debido al bajo número de pacientes (83% para G3, 48% para G4 y 65% para G9). Además, Rotateq redujo en un 86% la incidencia de visitas médicas, en un 94% de visitas a urgencias, y en un 96% de hospitalizaciones por gastroenteritis causadas por rotavirus. La eficacia frente a la hospitalización por gastroenteritis de cualquier etiología fue del 59%. La eficacia en la segunda temporada epidemiológica de rotavirus tras de la inmunización fue del 63% frente a la gastroenteritis de cualquier gravedad y del 88% frente a la gastroenteritis grave causada por rotavirus.

En cuanto al riesgo de invaginación los datos no sugieren un incremento del riesgo con respecto al placebo tras 42 días de la administración de cada dosis. La vacuna fue introducida en el mercado de EEUU en febrero del 2006, y posteriormente en más de 100 países. En España Rotateq se comercializó en enero de 2007.

1.3.6.3.3. Vacuna basada en rotavirus humano atenuado (Rotarix)

Es una vacuna viva atenuada de rotavirus humano (cepa 89-12) (Tabla 1.5). La atenuación se ha realizado mediante pases en cultivo celular de un aislado humano silvestre originario de Cincinnati (EEUU) (Bernstein et al., 1999). Esta vacuna es una cepa G1P1A[8], por lo que presenta los antígenos de rotavirus humanos de VP4 y VP7 más comunes a nivel mundial. La empresa que la distribuye es GlaxoSmithKline, que ha modificado la vacuna mediante clonación y cultivo celular de la cepa parental 89-12, dando lugar a la vacuna RIX4414 (Rotarix). Se ha comprobado que esta última está clínicamente más atenuada que la cepa parental 89-12.

GlaxoSmithKline también se ha embarcado en estudios de doble ciego controlado con placebo, con más de 90.000 niños de países de Europa, Latinoamérica, Asia y EEUU (Linhares et al., 2008; Phua et al., 2006; Ruiz-Palacios et al., 2006; Vesikari et al., 2007).

	Rotateq (Merck)	Rotarix (GlaxoSmithKline)		
Cepa parental (Serotipo)	Rotavirus bovino cepa WC3 (P7[5]G6)	Rotavirus humano cepa 89-12 (P1A[8]G1)		
Composición	5 recombinantes: 4 con el gen VP7 de los serotipos G1, G2, G3 y G4 1 con el gen P1A[8] de la cepa humana parental con el resto de genes de la cepa WC3	RIX4414, cepa 89-12 de rotavirus humano que se ha atenuado por cultivo celular. Sin recombinantes		
Dosis de administración	3 dosis orales a los 2, 4 y 6 meses de edad	2 dosis orales a los 4 y 8 meses de edad		
Comparación de la eficacia tras la inmunización	Porcentaje de protección frente a la infección grave	98	85	
	Porcentaje de reducción de las hospitalizaciones	63	42	
	Porcentaje de excreción de virus	9	<50	
	Porcentaje de eficacia en la protección frente a la gastroenteritis por rotavirus de diferentes genotipos	G1	75	92
		G2	63	41*
		G3	83*	88
	G4	48*	88	
	G9	65*	88	

* No significativo

Tabla 1.5 Comparación de las vacunas frente a rotavirus comercializadas actualmente.

La tasa de protección frente a la gastroenteritis grave por rotavirus fue del 85% y del 100% frente a la deshidratación grave causada por rotavirus. También ha demostrado ser altamente eficaz para prevenir la gastroenteritis de cualquier gravedad causada por el serotipo predominante G1 (92% eficacia), y los serotipos G3, G4 o G9 (88% eficacia). La protección frente al genotipo G2 (41% eficacia) no es estadísticamente significativa. Aunque Rotarix no ha sido eficaz frente al serotipo G2, ha demostrado una protección cruzada significativa frente a cepas con genotipo que no sean G1 o P[8] usando un meta-análisis de los ensayos de eficacia donde la protección frente a la cepa G2P[4] fue del 81%. Este estudio ha sido confirmado por los resultados de un ensayo europeo con el seguimiento de dos temporadas epidemiológicas. En este estudio la eficacia frente a la gastroenteritis por rotavirus de cualquier gravedad fue del 79%, frente a la enfermedad grave del 90% y frente a la hospitalización debida a rotavirus del 96%. Con respecto a la gastroenteritis grave, la

vacuna tuvo una eficacia del 96% frente a G1P[8] y de un 88% frente a cepas no G1P[8] (Vesikari et al., 2007).

Se ha comprobado que no existe un incremento del riesgo de invaginación intestinal entre los receptores de la vacuna comparados con el placebo, durante 31 días después de cada dosis.

La vacuna ha sido aprobada en 90 países de todo el mundo, se han distribuido más de 11 millones de dosis y ha sido incluida en el calendario vacunal de 5 países latinoamericanos. En España se comercializó en septiembre de 2006.

1.3.6.3.4. Vacunas en proyecto

Rotavirus recombinante humano-bovino

Es una vacuna recombinante tetravalente de rotavirus bovino (BRV-TV). Incorpora 4 virus recombinantes con un único gen de la proteína VP7 de los serotipos humanos G1, G2, G3 o G4 y 10 genes de la cepa de rotavirus bovino UK (G6P[7]).

Se ha realizado un estudio clínico de fase II con la vacuna que ha mostrado una buena respuesta inmunitaria y que no interfiere con la administración de otras vacunas infantiles (Clements-Mann et al., 2001). Antes de la retirada de la vacuna RotaShield se realizó un ensayo con placebo controlado de la vacuna BRV-TV frente a la vacuna RotaShield en Finlandia (Vesikari et al., 2006). En los receptores de la vacuna se detectó una respuesta de anticuerpos séricos del 97%, frente al 94% de los receptores de RotaShield. Ambas vacunas fueron igualmente efectivas con una eficacia del 68-69% frente a la diarrea causada por rotavirus y del 88-100% de eficacia frente a la diarrea grave por rotavirus durante la primera temporada epidémica.

El equipo que desarrolló esta vacuna está planteándose dar una nueva formulación, que consistiría en una vacuna hexavalente para su uso en países en desarrollo, debido a la emergencia de los serotipos G9 y G8 en áreas de estos países (Kapikian et al., 2005).

Recombinantes naturales entre humano-bovino

Estudios observacionales han sugerido que las infecciones por rotavirus en neonatos confieren protección frente a la diarrea originada por la infección. Se han evaluado dos cepas obtenidas de recién nacidos infectados asintóticamente en

Delhi (116E) y Bangalore (I321). Estas cepas presentan los genotipos G9P[10] y G10P[11], respectivamente. Cada cepa es un recombinante entre rotavirus humano y bovino, pero de forma natural: 116E es un rotavirus humano con un segmento génico que codifica la proteína VP4 que deriva de un rotavirus bovino. La cepa I321 es una cepa de rotavirus bovina con dos segmentos génicos no estructurales derivados de una cepa de rotavirus humano (Cunliffe et al., 1997; Dunn et al., 1993).

Estas vacunas en proyecto están siendo desarrollados en la India, bajo el amparo de un consorcio internacional. Se ha realizado un ensayo de fase I de una única dosis o de placebo y los resultados demuestran que ambas son seguras, pero la cepa 116E induce una mayor respuesta inmunitaria que la cepa I321 o el placebo (Bhandari et al., 2006).

Cepas atenuadas recuperadas de recién nacidos

Estas cepas se pueden utilizar como vacuna porque parecen estar atenuadas de forma natural y estudios históricos han mostrado que los recién nacidos infectados asintómicamente han reducido posteriormente la frecuencia y gravedad de la diarrea por rotavirus.

En Australia se ha desarrollado la cepa RV3, que posee un genotipo G3P[6], para evaluar su eficacia como vacuna oral. Se ha comprobado que es segura y se ha realizado un pequeño estudio de fase II con tres dosis de 10^5 ufp de la vacuna (Barnes et al., 2002). El estudio indica que produce una inmunogenicidad relativamente baja, según los niveles de IgA sérica. No obstante, los receptores de la vacuna que desarrollaron una respuesta inmunitaria estuvieron protegidos frente a la enfermedad clínica al año siguiente. Por ello, se han comenzado estudios de fase II con una dosis mayor de 10^7 UFP.

A pesar de la comercialización y distribución mundial de las vacunas Rotateq y Rotarix existen una serie de consideraciones futuras que se deben evaluar:

1. Se recomienda administrar la vacuna en los primeros meses de edad para evitar la aparición de problemas de invaginación intestinal. Pero si la primera dosis se recibe a una edad muy temprana puede tener una baja eficacia debido a la gran presencia de anticuerpos adquiridos de la madre, en este caso, la segunda dosis se podría considerar como la primera dosis efectiva. Por ello, retrasar la primera dosis puede ser conveniente para alcanzar una respuesta inmunológica óptima,

mientras que para conseguir la máxima seguridad es recomendable administrarla a una edad más temprana. También hay que tener en cuenta que un porcentaje importante de niños puede recibir la vacuna a partir de los 3 meses de edad (edad de la primera visita al médico).

2. Son necesarios estudios de vigilancia epidemiológica para observar el impacto de la vacunación en las cepas virales circulantes. Es importante vigilar la selección y sustitución de las cepas circulantes debido a la presión selectiva de la vacuna. Hay que tener en cuenta que rotavirus posee dos mecanismos evolutivos para generar diversidad que pueden conducir a cambios antigénicos, dando lugar a variantes que no sean reconocidas por los anticuerpos. Uno es la variación individual, que se debe a la acumulación de mutaciones puntuales porque la ARN polimerasa dependiente de ARN posee una tasa de mutación relativamente alta por la carencia de actividad exonucleasa. Por otra parte, durante las infecciones mixtas los segmentos génicos pueden reordenarse en una célula originando recombinantes. Estos reordenamientos pueden alterar las interacciones entre proteínas y modificar los epítomos reconocidos por los anticuerpos.
3. También son importantes los estudios para medir la protección cruzada frente a diferentes serotipos de rotavirus, como G9 y G8. Estos estudios serán importantes para asegurar que la vacuna protege a niños de países en desarrollo, donde son prevalentes cepas diferentes.
4. La eficacia de la vacuna se ha demostrado en niños de países industrializados, pero necesita ser probada en países con bajos recursos de Asia y África. Resultados previos con vacunas frente a rotavirus y otras vacunas de administración oral sugieren que existen múltiples factores que pueden afectar adversamente a la actuación de las vacunas. Entre otros factores son importantes la presencia de anticuerpos maternos, la alimentación con leche materna, las infecciones del intestino por bacterias o virus, la administración de la vacuna oral para la poliomielitis y la malnutrición. Hay que tener en cuenta que la disponibilidad de las vacunas depende de la distribución y del mantenimiento, incluyendo la necesidad de una cadena de frío. Hay que promover la investigación de vacunas frente a rotavirus con nuevas formulaciones líquidas o en polvo o de nuevas estrategias vacunales. El objetivo es facilitar el desarrollo de vacunas que sean logísticamente simples de administrar en los países pobres, que ocupen un espacio mínimo en la cadena de frío, que puedan almacenarse fuera de esta cadena de frío por períodos razonables sin pérdida de actividad y que sean compatibles con formatos multidosis.

2. OBJETIVOS

- 2.1. Desarrollar vectores virales recombinantes basados en clones de ADNc infectivos del genoma de coronavirus que expresen eficientemente los genes de rotavirus VP7 y VP2/VP6.
- 2.2. Desarrollar vectores basados en genomas de coronavirus con tropismo entérico y adaptados a ratones, para ser administrados por vía oral y que expresen las proteínas recombinantes de rotavirus a nivel intestinal.
- 2.3. Expresar antígenos de rotavirus utilizando coronavirus como vectores, estudiando especialmente el ensamblaje de partículas análogas a virus o “virus-like particles” (VLPs).
- 2.4. Estudiar la respuesta inmunitaria humoral (IgG sérica y coproanticuerpos IgA) específica de rotavirus, así como la producción de citocinas en ratones inmunocompetentes (Balb/c) e inmunodeficientes (STAT1^{-/-}, deficientes en la respuesta a interferón).
- 2.5. Evaluar la protección conferida por las vacunas recombinantes obtenidas, frente a la infección por rotavirus y frente a la enfermedad diarreica en el modelo de ratón lactante.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Células y cultivo celular

3.1.1. Células

Se han utilizado líneas celulares de diferentes orígenes: porcino (ST), murino (3T3, MC57, Balb Cl.7 y LR7), de simio (MA104), de hámster (BHK) y humano (CMR). La procedencia y aplicación de estas células son:

La línea celular ST (*swine testis*) (McClurkin y Norman, 1966), que deriva de testículo embrionario de cerdo, fue suministrada por el Dr. L. Enjuanes (Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid). Esta línea celular se empleó para el crecimiento del virus TGEV.

La línea celular pAPN-BHK (Delmas et al., 1994) proviene de la línea celular BHK-21 (*baby hamster kidney*), que se ha transformado establemente con el gen que codifica para el receptor celular del TGEV (aminopeptidasa-N porcina). Esta línea fue cedida por el Dr. L. Enjuanes y se utilizó para amplificar el genoma del virus TGEV.

La línea celular MA104 (Matsuno et al., 1977), aislada de riñón de mono verde africano, fue proporcionada por el Dr. T. H. Flewett (Regional Virus Laboratory, East Birmingham Hospital, Birmingham, Inglaterra). En esta línea celular se amplificaron las cepas de rotavirus.

Las células LR7 (Kuo et al., 2000) son fibroblastos de ratón y fueron cedidas por el Dr. P. Rottier (Universidad de Utrecht, Holanda). Estas células se utilizaron para replicar los virus recombinantes.

Las células MC57 y Balb Cl.7 son fibroblastos de ratón y fueron facilitadas por el Dr. L. Whitton (Scripps Research Institute, California, EEUU). En estas células se comprobó la replicación de los virus recombinantes en diferentes líneas celulares.

Las células humanas CMR proceden de la línea celular Caco2, que tiene su origen en un adenocarcinoma de colon humano. Estas células han sido transfectadas con el receptor de MHV para obtener las células CMR (Rossen et al., 1997) y fueron suministradas por el Dr. J. W. Rossen (Universidad de Utrecht, Holanda). Estas células

se emplearon en los estudios de replicación de los virus recombinantes con tropismo murino.

3.1.2. Técnicas de cultivo celular

Todas las células se cultivaron en frascos de 75 cm² (Costar) y mantuvieron en estufa a 37 °C con 5% de CO₂.

El medio de cultivo celular empleado fue medio D-MEM (Gibco) para las células ST, pAPN-BHK, LR7, CMR y MC57. El resto de cultivos celulares, MA104 y Balb Cl.7 se cultivaron en MEM (Gibco). Todas las células se suplementaron con un 10% de suero bovino fetal (SBF) (Gibco) (excepto las células pAPN-BHK que se cultivaron con un 5% de SBF), 1% de bicarbonato sódico (Gibco), 100 UI/ml de penicilina (Gibco), 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco) y 100 UI/ml de tilocina (Gibco). Las células CMR también se suplementaron con 50 µg/ml de geneticina G418 (Sigma) para mantener el gen transformado. La concentración de SBF se redujo al 2% durante las infecciones y transfecciones.

Las células se cultivaron hasta la confluencia, cuando ésta se alcanzaba se procedió a realizar el pase del cultivo celular. La frecuencia de pase y el cambio de frasco variaron con el tipo celular empleado, en general los cultivos se renovaron dos veces por semana excepto las células CMR que fue de una vez por semana. El protocolo seguido fue:

- ◆ El medio de cultivo se descartó.
- ◆ Las células se lavaron dos veces con PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7'3).
- ◆ Se añadió 1 ml de tripsina 0'25%-EDTA (Gibco), se dejaron tripsinizar a 37 °C hasta que se despegaron las células.
- ◆ Las células se resuspendieron en medio fresco y pasaron a un frasco nuevo o se descartaron. El pase varió con el tipo celular, desde 1:10 en las células LR7 hasta 1:3 en las células CMR.

Las líneas celulares se conservaron en nitrógeno líquido. Para ello los frascos se cultivaron hasta su confluencia y se realizaron los siguientes pasos:

- ◆ Las células se despegaron con tripsina y se resuspendieron en medio de cultivo.
- ◆ La suspensión celular se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos.

-
- ◆ El sedimento celular se resuspendió en 1 ml de SBF con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) como crioconservante en un criovial de 1'5 ml.
 - ◆ Los crioviales se colocaron en un baño de isopropanol (Cryo 1°C Freezing Container de Nalgene) en el congelador de -80 °C para que la temperatura descendiera gradualmente.
 - ◆ Al día siguiente, los crioviales se almacenaron en nitrógeno líquido.

3.2. Virus

3.2.1. Coronavirus

3.2.1.1. TGEV

El virus TGEV fue proporcionado por el Dr. L. Enjuanes. La cepa empleada en este trabajo proviene del grupo de aislados Purdue, originarios de Indiana en 1946 (Doyle y Hutchings, 1946). El aislado se adaptó para replicar en cultivos celulares (Haelterman y Pensaert, 1967) y fue cedido al laboratorio del Dr. L. Enjuanes. En dicho laboratorio, el virus se ha pasado en cultivo 115 veces en células ST y clonado 5 veces seguidas. El clon seleccionado se denominó PUR46-CC120-MAD (PUR46-MAD).

Este virus se replicó y tituló en células ST. El protocolo seguido para amplificar el virus fue el descrito previamente por Correa et al. (1988):

- ◆ Frascos de 75 cm² con células confluentes, se infectaron en medio D-MEM con 2% de SBF (Gibco) y DEAE-dextrano (80 µg/ml) (Sigma) a una multiplicidad de infección (moi) de 0'1-1 unidades formadoras de placa (ufp) por célula.
- ◆ La adsorción se realizó a 37 °C durante 1 hora.
- ◆ Se añadió medio de mantenimiento (D-MEM con 2% de SBF) y los frascos se incubaron en estufa a 37 °C hasta que el efecto citopático observado era del 80-90%.
- ◆ Los frascos infectados se congelaron y descongelaron rápidamente tres veces en el congelador de -80 °C. El sobrenadante con el lisado celular se recogió y centrifugó a 300 g durante 5 minutos para eliminar restos celulares. El sobrenadante resultante se dividió en alícuotas que se congelaron a -80 °C.

El virus se tituló según el método descrito previamente por Correa et al. (1988), que consiste en la formación de placas de lisis en monocapas de células ST en medio semi-sólido. Los pasos seguidos fueron:

-
- ◆ Las células se cultivaron hasta la confluencia y se infectaron con distintas diluciones del virus en medio D-MEM con 2% de SBF.
 - ◆ Se dejó 1 hora de adsorción a 37 °C y después se retiró el inóculo.
 - ◆ Se añadió medio D-MEM con DEAE-dextrano (80 µg/ml) y agar al 0,6%, se dejó solidificar y se incubó en estufa a 37 °C.
 - ◆ Las monocapas infectadas se fijaron a las 48 horas post-infección (hpi) con formaldehído al 10% y se tiñeron con cristal violeta.

Se contaron las placas de lisis y el título viral se expresó como ufp/ml.

3.2.1.2. Virus recombinantes basados en el genoma de TGEV

Los virus recombinantes se han desarrollado en el laboratorio del Dr. L. Enjuanes. Estos virus presentan el genoma de TGEV del aislado PUR46-MAD, con la excepción del gen S. Los virus recombinantes con tropismo porcino que expresan las proteínas de rotavirus, contienen el gen S de la cepa PTV (S_{PTV}), que es una cepa con tropismo respiratorio. Estos virus proceden del vector pBAC-rTGEV-FL. Los virus recombinantes con tropismo murino poseen un gen S quimérico entre el gen S del aislado de TGEV PUR-C11 (S_{C11}) (Almazan et al., 2000; Gonzalez et al., 2002) (con tropismo entérico) y el gen S de MHV cepa A59.

Los virus recombinantes con tropismo murino se replicaron y titularon en células LR7.

Se utilizó el mismo protocolo de replicación que para el virus TGEV.

Los virus se titularon mediante inmunofluorescencia indirecta.

3.2.2. Rotavirus

3.2.2.1. Cepa de rotavirus bovino RF

La cepa de rotavirus RF fue proporcionada por el Dr. J. Cohen (Laboratoire de Virologie et d'Immunologie Moleculaire, INRA, Domaine de Vilvert, France). Este virus es el donante de los genes que codifican las proteínas de rotavirus que han sido clonadas en el genoma del TGEV.

La cepa RF se replicó en células MA104 de la siguiente manera:

- ◆ Antes de inocular las células se activó el virus en presencia de tripsina (10 µg/ml de tripsina tipo IX de Sigma) durante 30 minutos a 37 °C. La tripsina escinde la proteína VP4 en VP5* y VP8* facilitando la adsorción y la entrada del virus a la célula.
- ◆ Las células MA104 se infectaron en medio MEM sin SBF y con 0'5 µg/ml de tripsina tipo IX (Sigma). La adsorción viral se realizó durante 1 hora a 37 °C.
- ◆ Después de la adsorción el inóculo se retiró y se añadió medio MEM sin suero con 0'5 µg/ml de tripsina. Las células inoculadas se incubaron en estufa a 37 °C, hasta que el efecto citopático era del 80-90%.
- ◆ Los frascos infectados se congelaron y descongelaron rápidamente tres veces. El sobrenadante de esta infección se recogió y se centrifugó a 300 g durante 5 minutos para eliminar restos celulares. El sobrenadante resultante se dispensó en alícuotas y se congeló a -80 °C.

El título viral se determinó mediante inmunofluorescencia indirecta.

3.2.2.2. Cepa de rotavirus murino EDIM

La cepa de rotavirus murino EDIM (*epizootic diarrhea of infant mice*), procedente del laboratorio del Dr. R. Ward (Children's Hospital, Cincinnati, Ohio, EEUU), se empleó en los ensayos de protección en ratón lactante. Para ello se determinó la dosis que produce diarrea en el 50% de los animales inoculados (DD₅₀), mediante la inoculación oral de ratones lactantes con diluciones seriadas del virus.

3.3. Animales

Se utilizaron dos líneas de ratones, ratones inmunocompetentes Balb/c (Charles River) y ratones inmunodeficientes STAT1^{-/-}, deficientes en respuesta a interferón (Lassnig et al., 2005), que fueron cedidos por el Dr. L. Enjuanes.

Se emplearon ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad, en jaulas adecuadas con 5 ratones por jaula.

Una vez inoculados, los ratones se mantuvieron en una cabina de seguridad con presión negativa (UA-I de EuroAire), para evitar la diseminación de los virus recombinantes al ambiente.

3.4. Generación de los vectores recombinantes

La generación de los vectores virales ha sido posible gracias a la construcción en el laboratorio del Dr. L. Enjuanes de un ADNc infectivo que codifica el genoma completo de TGEV. Debido al tamaño del genoma, superior a 36 Kb, este ADNc se ha ensamblado como un cromosoma artificial bacteriano (BAC) (Almazan et al., 2000; Gonzalez et al., 2002). Este vector codifica la secuencia completa del aislado de TGEV PUR46-MAD (Penzes et al., 2001). Para manipular un genoma viral tan grande se han introducido sitios únicos de restricción para endonucleasas en el extremo 5' de cada unidad génica. Además, ha sido necesario duplicar las TRS que preceden cada gen, porque estos se hallan solapados (Ortego et al., 2003). El vector se ha denominado pBAC-TGEV-S_{PTV}-RS.

Este trabajo ha sido desarrollado en el laboratorio del Dr. L. Enjuanes.

3.4.1. Clonación de los genes que expresan las proteínas de rotavirus en el genoma de TGEV

Los genes que expresan las proteínas de rotavirus VP7 (ORF9), VP2 (ORF2) y VP6 (ORF6) se amplificaron por PCR a partir de los plásmidos pcDNA-RfORF9, pcDNA-RfORF2 y pcDNA-RfORF6, respectivamente (proporcionados por J. Cohen).

Para amplificar la ORF9 y la ORF6, se utilizaron cebadores que introdujeron sitios de restricción en los extremos 3' y 5' del producto de PCR para las enzimas de restricción *Mlu* I y *Blp* I (Tabla 3.1).

Oligonucleótidos ^(a)	Secuencia ^(b)
5'-ORF9-VS	5'-GC <u>ACGCGT</u> CATTACAGGTCCTTGT <u>ATGG</u> ACTATATAATTTACAGATTTCTGCTTATAGTGATCTTGGCC-3'
3'-ORF9-RS	5'-GCGCG <u>GCTAAG</u> CTACACTCTATAGTAGAACGCCGACGAAT-3'
5'-ORF6-VS	5'-GC <u>ACGCGT</u> CATTACAGGTCCTTGT <u>ATGG</u> ATGTCCTGTACTCCTTGTCATAAACTCTTAAAGATGC-3'
5'-ORF6-RS	5'-GCGCG <u>GCTAAG</u> CTCATTGACAAGCATGCTTCTAATGG-3'

(a) VS ("virus sense"), sentido viral o polaridad positiva; RS ("reverse sense"), sentido antiviral o polaridad negativa.

(b) Cada uno de los oligonucleótidos incluye los sitios de restricción *Mlu* I y *Blp* I, respectivamente (nucleótidos señalados en cursiva y subrayados). Los codones de iniciación están subrayados. La TRS correspondiente al gen 3a de TGEV se indica en cursiva.

Tabla 3.1 Oligonucleótidos utilizados para la clonación de la ORF9 y ORF6 de rotavirus en el genoma del TGEV.

En el caso de la ORF2 se optó por una estrategia de clonación en dos pasos, para evitar la aparición de mutaciones durante la amplificación por PCR debido a su gran tamaño (2'7 Kb). Inicialmente, se amplificó el extremo 5' de la ORF2 mediante PCR utilizando los oligonucleótidos BamMluORF2a-VS y BsgI-ORF2a-RS (Tabla 3.2). El producto de PCR resultante se digirió con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Bsg* I y clonó en los sitios correspondientes dentro del plásmido pcDNA-RfORF2. Este plásmido se denominó pcDNA5*Mlu*-Rf2. Posteriormente, se amplificó el extremo 3' de la ORF2 por PCR utilizando los oligonucleótidos XcmBlpORF2b-VS y BbsI-ORF2b-RS (Tabla 3.2). El producto final de PCR se digirió con las enzimas de restricción *Xcm* I y *Bbs* I y se clonó en los sitios correspondientes del plásmido pcDNA5*Mlu*-Rf2, generando el plásmido pcDNA5*Mlu3Blp*-Rf2, que contiene la ORF2 completa flanqueada por los sitios de restricción *Mlu* I y *Blp* I.

Oligonucleótidos ^(a)	Secuencia ^(b)
5'-BamMluORF2a-VS	5'-GCGGATCCACGCGTCATTACAGGTCCTGTATGGCGTACAGGAAACGTGGA GCGCG-3'
3'-BsgI-ORF2a-RS	5'-CACAAGGATTCAAATTGTCATG-3'
5'-XcmBIPORF2b-VS	5'-AAGCCAACCCCACTGTGGCTAAGCCCCCAATTCTGCAGATATCCATCAC-3'
3'-BbsI-ORF2b-RS	5'-GCGCCGTACAGGGCGCGTGGGG-3'

(a) VS (“virus sense”), sentido viral o polaridad positiva; RS (“reverse sense”), sentido antiviral o polaridad negativa.

(b) El oligonucleótido 5'-BamMluORF2a-VS incluye los sitios de restricción *Bam* HI (nucleótidos señalados en cursiva y subrayados) y *Mlu* I (nucleótidos con doble subrayado) y la TRS del gen 3a de TGEV. El oligonucleótido 5'-XcmBIPORF2b-VS contiene los sitios de restricción *Xcm* I (nucleótidos señalados en cursiva y subrayados) y *BIP* I (nucleótidos con doble subrayado).

Tabla 3.2. Oligonucleótidos utilizados para la clonación de la ORF2 de rotavirus en el genoma de TGEV.

A continuación, la ORF2, la ORF6 y la ORF9 se digirieron con las enzimas *Mlu* I y *BIP* I. Los productos de digestión se clonaron en el plásmido denominado pACNR1180-TGEV-S_{PTV}-RS, reemplazando los genes 3a y 3b que no son esenciales para la replicación de TGEV. El resultado fue la obtención de los plásmidos intermedios pACNR1180-TGEV-S_{PTV}-RS-Δ3ab-ORF2, pACNR1180-TGEV-S_{PTV}-RS-Δ3ab-ORF6 y pACNR1180-TGEV-S_{PTV}-RS-Δ3ab-ORF9, respectivamente. Dichos plásmidos se digirieron con las enzimas *Mlu* I y *Bam* HI y los fragmentos obtenidos se clonaron en el plásmido pBAC-TGEV-S_{PTV}-RS-Δ3ab para generar los plásmidos pBAC-TGEV-S_{PTV}-RS-Δ3ab-ORF2, pBAC-TGEV-S_{PTV}-RS-Δ3ab-ORF6 y pBAC-TGEV-S_{PTV}-RS-Δ3ab-ORF9, respectivamente.

A la hora de generar un vector viral bicistrónico basado en el genoma de TGEV que expresara las proteínas VP2 y VP6 de rotavirus, fue necesario originar una TRS adicional a partir del gen N de TGEV, a la que se denominó TRS_{22N} (Alonso et al., 2002). La ORF6 se amplificó nuevamente por PCR utilizando un nuevo par de oligonucleótidos; 5'-BIP-22NORF6-VS y 3'-SwaORF6-RS (Tabla 3.3).

Oligonucleótidos ^(a)	Secuencia ^(b)
5'-Blp-22NORF6-VS	5'-CCGCCGCTAAGCAAAAATTATTACATATGGTATAACTAAAGAAAATG GATGTCCTGTACTCCTTGTC-3'
3'-Swa-ORF6-RS	5'-GCGCATTAAATCATTGACAAGCATGCTTCTAATGG-3'

(a) VS ("virus sense"), sentido viral o polaridad positiva; RS ("reverse sense"), sentido antiviral o polaridad negativa.

(b) El oligonucleótido 5'-Blp-22NORF6-VS contiene el sitio de restricción *Blp* I (nucleótidos subrayados) y 22 nucleótidos de la secuencia 5' que flanquea el gen N (TRS_{22N}) (nucleótidos señalados en cursiva). El oligonucleótido 3'-SwaORF6-RS incluye el sitio de restricción *Swa* I (nucleótidos en cursiva y subrayados).

Tabla 3.3. Oligonucleótidos utilizados para la clonación de las ORF2 y ORF6 de rotavirus en el genoma de TGEV.

El fragmento de PCR obtenido, se clonó en los sitios de restricción *Blp* I y *Swa* I del plásmido pACNR1180-S_{PTV}-RS-Δ3ab-ORF2, generando el plásmido intermedio pACNR1180-S_{PTV}-RS-Δ3ab-ORF2-TRS_{22N}-ORF6. Dicho plásmido se digirió posteriormente con las enzimas *Mlu* I y *Bam* HI, y el fragmento obtenido (que contiene las ORF2 y ORF6 de rotavirus) se clonó en el pBAC-TGEV-S_{PTV}-RS-Δ3ab, generando el vector bicistrónico pBAC-TGEV-S_{PTV}-RS-Δ3ab-TRS_{3a}-ORF2-TRS_{22N}-ORF6. Este último contiene la ORF2 de rotavirus bajo la TRS del gen 3a de TGEV y la ORF6 bajo el promotor TRS_{22N} de TGEV.

3.4.2. Cambio de tropismo de los vectores virales basados en el genoma de TGEV

El cambio de tropismo se ha realizado mediante la creación de una nueva proteína S quimérica entre MHV-A59/TGEV-C11 (Figura 3.1). Previamente, fue necesario eliminar el sitio de restricción de *Mlu* I del gen S de MHV-A59 (nucleótido 3264) generando una mutación silenciosa. Para generar dicha mutación, el gen S del virus MHV-A59 se amplificó mediante una PCR solapante. En una primera PCR se utilizaron los oligonucleótidos S-MHV-2452-VS y S-MHV-3277(C)-RS (Tabla 3.4), este último incluye una mutación puntual (G₃₂₆₄→C), que generan un fragmento de PCR del nucleótido 2.452 al 3.277 del gen S de MHV-A59. En una segunda PCR los oligonucleótidos S-MHV-3254-(C)-VS, que incluye una mutación puntual (G₃₂₆₄→C), y

S-MHV-3803-RS (Tabla 3.4) se utilizaron para generar un fragmento de PCR del nucleótido 3.254 al 3.803 del gen S de MHV. Finalmente, a partir de los productos resultantes de ambas PCR y utilizando los oligonucleótidos S-MHV-2452-VS y MHV-S-3803-RS, se obtuvo un producto final que incorpora una mutación puntual (G₃₂₆₄→C) en el nucleótido 3.264.

Oligonucleótidos ^(a)	Secuencia ^(b)
S-MHV-2452-VS	5'-GTTGCTAGTGCATTAATGC-3'
S-MHV-3277(C)-RS	5'-GAAATTAATACGGGTGGTTTGGC-3'
S-MHV-3254(C)-VS	5'-GCCAAACCACCCGTATTAATTC-3'
S-MHV-3803-RS	5'-AACATACCAAGGCCATTC-3'
S-MHV-Hind-Pac-1-VS	5'-CGAAGCTT AATTA AGAAGGGTAAGTTGCTCATTAGAAATAATGGTAA GTTACTAACTTTGGTAACCACTTCGTTAACACACCATGCTGTTTCGTGT TTATTCTATTTTTG-3'
S-MHV-867-RS	5'-GGTATAACTACTACGACAATC-3'
S-C11-VS	5'-AAATGGCCTTGGTATGTGTGG-3'
3'-S-C11-Mlu-Bam-RS	5'-GCGGATCC ACGCGT AAGTTTAGTTCTTAAAGAC-3'

(a) VS ("virus sense"), sentido viral o polaridad positiva; RS ("reverse sense"), sentido antiviral o polaridad negativa.

(b) El oligonucleótido S-MHV-Hind-Pac-1-VS contiene los sitios de restricción de *Hind* III (nucleótidos subrayados) y *Pac* I (nucleótidos en negrita). El oligonucleótido 3'-S-C11-Mlu-Bam-RS contiene los sitios de restricción de *Mlu* I (nucleótidos subrayados) y *Bam* HI (nucleótidos en negrita).

Tabla 3.4. Oligonucleótidos utilizados para la clonación del gen quimérico de la espícula murina/porcina.

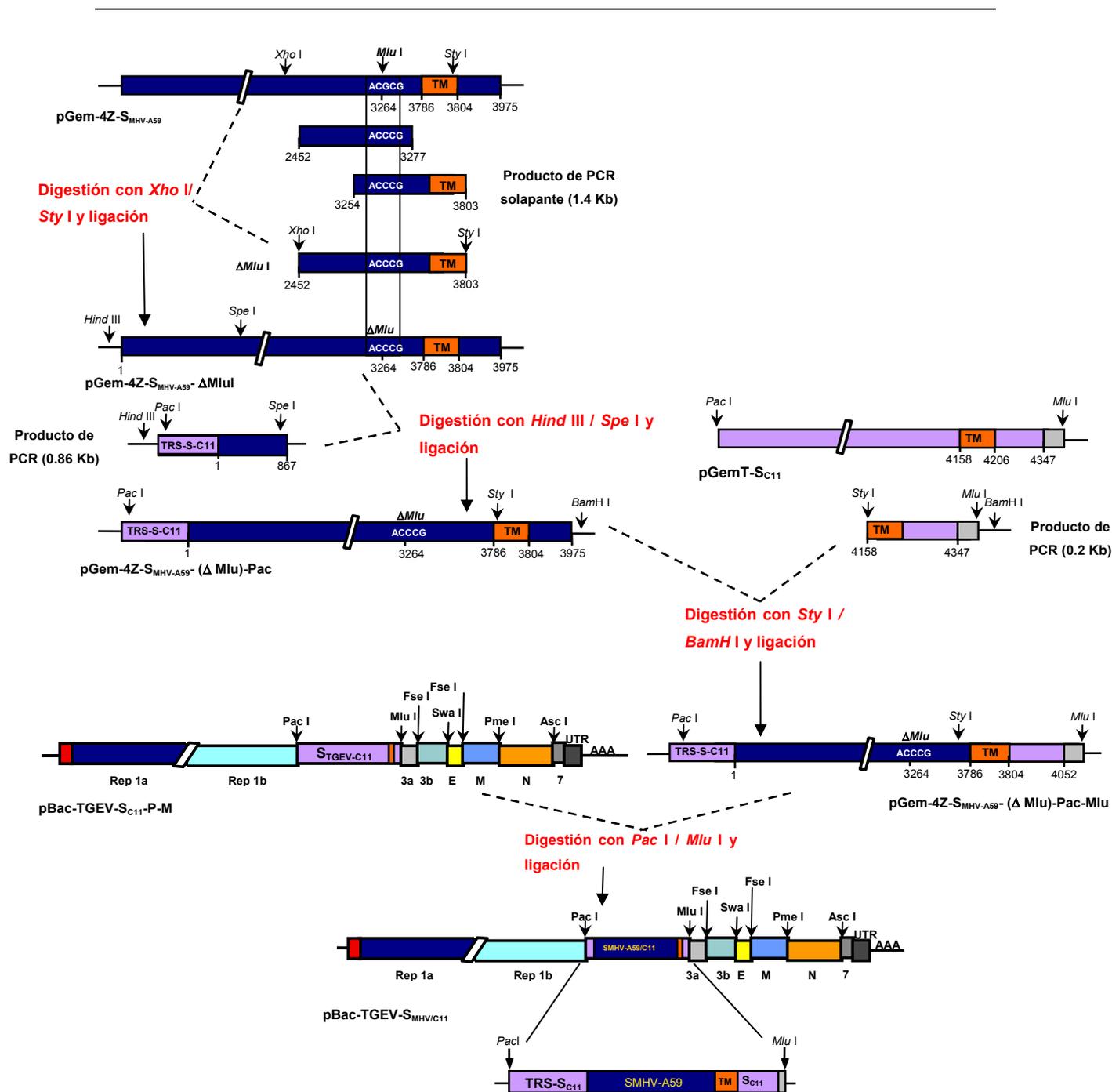


Figura 3. 1. Construcción del vector viral con tropismo murino. El ADNc que codifica el gen S de MHV (pGem-4Z-S_{MHV-A59}) contiene una secuencia que es reconocida por el enzima de restricción *Mlu* I y que fue necesario eliminar mediante una PCR solapante. Después, se insertó mediante PCR el inicio del gen 3a de TGEV y se añadió el sitio de restricción del enzima *Pac* I dando lugar al ADNc pGem-4Z-S_{MHV-A59}-(ΔMlu)-Pac. A partir del ADNc que contiene el gen S de TGEV cepa C-11 (pGemT-S_{C11}), se amplificó por PCR la secuencia transmembrana de TGEV y el extremo 5' del gen, y se añadió el sitio de restricción para la enzima *Mlu* I. Este amplificado se clonó en el ADNc pGem-4Z-S_{MHV-A59}-(ΔMlu)-Pac originando el ADNc pGem-4Z-S_{MHV-A59}-(ΔMlu)-Pac-Mlu. El gen quimérico se clonó en el plásmido

pBac-TGEV-S_{C11}-P-M que contiene el genoma completo de TGEV, utilizando los enzimas de restricción *Pac* I y *Mlu* I.

El ADN amplificado se digirió con las enzimas *Xho* I y *Sty* I y se clonó en el plásmido pGem-4Z-S_{MHV-A59} digerido por las mismas enzimas, con el fin de obtener el plásmido pGem-4Z-S_{MHV-A59}- Δ MluI.

Para generar el plásmido pGem-4Z-S_{A59-C11}-PacI-MluI, se introdujeron los sitios únicos de restricción de *Pac* I y *Mlu* I en el gen S quimérico murino/porcino. El par de oligonucleótidos S-MHV-Hind-Pac-1-VS (que incluye los sitios de restricción para *Hind* III y *Pac* I, 71 nucleótidos del extremo 5' del gen S de TGEV y los primeros 27 nucleótidos del gen S de MHV-A59) y el S-MHV-867-RS se utilizaron para generar un fragmento de PCR que comprende del nucleótido 1 al 867 del gen S de MHV-A59. El producto de PCR se digirió con las enzimas *Hind* III y *Spe* I y se clonó en el plásmido pGem-4Z-S_{MHV-A59}- Δ MluI digerido por las mismas enzimas, generando el plásmido pGem-4Z-S_{MHV-A59}- Δ MluI-PacI.

Por otro lado, utilizando los oligonucleótidos S-C11-VS y 3'-S-C11-Mlu-Bam-RS (Tabla 3.4), se generó un fragmento de PCR que incluye desde el nucleótido 4.158 al 4.347 del gen S de TGEV-C11. El producto de PCR se digirió con las enzimas *Sty* I y *Bam* HI y se clonó en el plásmido pGem-4Z-S_{MHV-A59}- Δ MluI-PacI digerido con las mismas enzimas, para finalmente generar el plásmido pGem-4Z-S_{MHV-A59}- Δ MluI-PacI-MluI.

Para generar el plásmido pBAC-TGEV-S_{MHV-C11} que codifica el genoma de TGEV de longitud completa y que incluye el gen quimérico S_{MHV-C11}, el plásmido pGem-4Z-S_{MHV-A59}- Δ MluI-PacI-MluI se digirió con los enzimas *Pac* I y *Mlu* I y el gen S_{MHV-C11} se clonó en el plásmido pBAC-TGEV-S_{C11}-P-M digerido con las mismas enzimas (Ortego et al., 2003).

3.4.3. Transfección de clones infectivos de TGEV y rescate de virus recombinantes

Una vez obtenidos los plásmidos que codifican para los virus recombinantes derivados del genoma de TGEV, se transfectaron células pAPN-BHK crecidas al 40-60% de confluencia en placas de 35 mm de diámetro (TPP). Se utilizaron 10 μ g del

plásmido que codifica el ADNc completo del virus TGEV bajo el control del promotor de Citomegalovirus (CMV) y 15 µl de lipofectina en medio Optimem (Gibco), siguiendo las instrucciones del fabricante. A las 6 horas post-transfección las células se tripsinizaron y se plaquearon sobre monocapas de células ST, añadiendo medio D-MEM con SBF al 2%. A las 72 horas (o al observarse efecto citopático) el sobrenadante se recogió y se infectaron células ST para amplificar el virus recuperado a partir del ADNc. Después de 3 pases, los virus se clonaron tres veces mediante purificación de placas de lisis.

3.5. Inmunofluorescencia indirecta

Se ha realizado inmunofluorescencia indirecta en cultivo celular y cortes histológicos de secciones de órganos. El protocolo seguido en este último caso se especifica en el apartado de inmunohistoquímica. El protocolo general de inmunofluorescencia empleado para los diferentes tipos celulares fue el siguiente:

- ◆ Las células se cultivaron sobre cubreobjetos redondos (Marienfeld GmbH & Co. KG) en placas de 24 pocillos (Costar), a una concentración adecuada para formar una monocapa confluyente a las 24 horas (para las células CMR fue de 48 horas).
- ◆ La monocapa celular se infectó con las diluciones del virus en medio con 2% de SBF y se realizó la adsorción a 37 °C durante una hora.
- ◆ Después de la adsorción se retiró el inóculo y se añadió el medio de mantenimiento adecuado para cada tipo celular (MEM o D-MEM con 2% de SBF).
- ◆ El cultivo celular infectado se incubó en estufa el tiempo establecido para cada infección.
- ◆ Las células se lavaron con PBS y se fijaron con metanol:acetona durante 15 minutos en frío para microscopía de fluorescencia y con paraformaldehído 4% en PBS para microscopía láser confocal. En este último caso, se realizó un paso adicional para permeabilizar las células con Tritón X-100 (Sigma) 0'1% en PBS durante 30 minutos.
- ◆ Se realizaron dos lavados con PBS y se incubó el anticuerpo primario diluido en PBS con 1% albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) durante 1 hora a 37 °C.
- ◆ Se lavó 3 veces con PBS y se incubó con el segundo anticuerpo anti-IgG (específico del primer anticuerpo) marcado con el fluorocromo deseado durante una hora a 37 °C. Los anticuerpos utilizados se muestran en la (Tabla 3.5).
- ◆ Se realizaron 5 lavados en PBS y se tiñó con el colorante de contraste azul de Evans, para reducir el ruido de fondo y resaltar la fluorescencia. Este colorante no se

utilizó para microscopía confocal para no interferir en la adsorción del fluoróforo de marcaje.

◆ Finalmente, se realizó un montaje en portaobjetos con glicerol tamponado (Light Diagnostics).

Las lecturas se realizaron con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600, y las imágenes fueron capturadas con una cámara Nikon Coolpix 4500 con un adaptador para el ocular. Para las observaciones con microscopía confocal se utilizó el microscopio Confocal Leica TCS SP con procesador de imágenes Leica Lite.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Policlonal IgG de oveja anti-rotavirus diluido a 1/200 (Silenius Laboratorios).	Anti-IgG de oveja FITC diluido a 1/200 (Sigma).
Monoclonal IgG de ratón anti-VP2 diluido a 1/200. Cedido por el Dr. J. Cohen.	
Monoclonal IgG de ratón anti-VP6 (clon 2F3E7) diluido a 1/200. Obtenido en nuestro laboratorio.	
Monoclonal IgG de ratón anti-VP7 diluido a 1/200. Cedido por el Dr. J. Cohen.	Anti-IgG de ratón FITC diluido a 1/500 (Sigma).
Monoclonales IgG de ratón anti-TGEV (3DC10 y 3DH10) diluidos a 1/50. Cedidos por el Dr. L. Enjuanes.	
Monoclonal IgG de ratón anti-S de MHV diluido a 1/200. Cedido por el Dr. J. Fleming.	
Policlonal IgG de cabra anti-rotavirus diluido a 1/200 (Chemicon-Millipore).	Anti-IgG de cabra Cy5 diluido a 1/150 (Zymed-Invitrogen).

Tabla 3.5. Anticuerpos primarios y secundarios conjugados con distintos marcadores y diluciones empleadas en ensayos de inmunofluorescencia.

3.6. Microscopía electrónica

3.6.1. Preparación de muestras

Las muestras para microscopía electrónica procedían de cultivos celulares infectados con los virus recombinantes. Para obtener las muestras se realizaron los siguientes pasos:

- ◆ Células confluentes cultivadas en placa de 6 pocillos (Nunc), se infectaron a una *moi* de 1 uff por célula.
- ◆ Se lavó la capa celular infectada con PBS a las 8 horas post-infección y se fijó con una mezcla de paraformaldehído 2% (Sigma) y glutaraldehído 2'5% (Merck) en PBS durante una hora.
- ◆ La capa celular se despegó mecánicamente mediante un rascador de cultivo celular (Costar) y las células se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos.
- ◆ Se realizó la fijación con tetraóxido de osmio (Electron Microscopy Sciences) o tetraóxido de osmio y glucosa para el inmunomarcaje.
- ◆ Las muestras fijadas se incluyeron en resina Epoxi (Durcupan), dejando polimerizar en estufa a 60 °C.
- ◆ Se realizó el retallado de una zona seleccionada del bloque obtenido y se llevó a cabo un corte ultrafino de 60-80 nm con el ultramicrotomo (Leica UC6) con cuchilla de diamante (Diatome).
- ◆ Los cortes se coloraron en rejillas de ojal de cobre para la muestra sin marcaje y de oro para la muestra con marcaje.

Las muestras se observaron con el microscopio electrónico de transmisión JEOL modelo JEM-1010 (100 KV), con cámara digital MegaView III y software de adquisición de imágenes "AnalySIS".

3.6.2. Inmunomarcaje con oro coloidal

Las muestras fijadas en rejillas de oro se procesaron para realizar un inmunomarcaje con un anticuerpo específico del siguiente modo:

- ◆ Las rejillas se incubaron con el anticuerpo primario (monoclonal IgG de ratón anti-VP6 de rotavirus) durante 1 hora a 37 °C.

-
- ◆ Se lavó con PBS y se incubó con el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con oro coloidal 10 nm (Sigma) durante una hora a 37 °C.
 - ◆ Se realizó la tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo (Electron Microscopy Sciences).

3.7. Extracción de ácidos nucleicos y RT-PCR

3.7.1. Obtención de muestras y extracción de ARN

La extracción de ácidos nucleicos se realizó a partir de cultivos celulares y de macerados de órganos de los ratones inoculados.

Los órganos de ratones inoculados con el vector viral se extrajeron quirúrgicamente y se realizó un macerado al 10% (p/v) en PBS con antibióticos (100 UI/ml de penicilina (Gibco) y 100 µg/ml estreptomina (Gibco) y antifúngicos (10 U/ml de nistatina (Sigma), con un homogenizador manual. Los macerados resultantes se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos en microcentrífuga para eliminar restos de grasas. El sobrenadante se conservó a -80 °C hasta su análisis. Las muestras procedentes de cultivos celulares se procesaron directamente.

El ARN se extrajo con Trizol-LS (Invitrogen) partiendo de 100 µl del macerado de órganos o del sobrenadante del cultivo celular. Se siguieron las instrucciones del fabricante:

- ◆ Se mezclaron 300 µl de Trizol-LS con 100 µl de muestra y se incubaron 5 minutos.
- ◆ Se añadió 80 µl de cloroformo y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- ◆ Se centrifugó a 12.000 g 15 minutos a 2-8 °C. Se recuperó la fase acuosa, donde se encuentra el ARN.
- ◆ Se añadió 200 µl de alcohol isopropílico a la fase acuosa y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente.
- ◆ Se centrifugó a 12.000 g 10 minutos a 2-8 °C. El ARN precipita formando un sedimento gelatinoso en el fondo del tubo.
- ◆ El sobrenadante se descartó y el ARN se lavó con 400 µl de etanol 75% de agua DEPC (Sigma).
- ◆ Se centrifugó a 7.500 g durante 5 minutos a 2-8 °C.
- ◆ El sedimento de ARN se secó ligeramente a 35-45 °C.

◆ El ARN se disolvió en 50 µl de agua libre de RNAasas, mediante el paso de la solución a través de una punta de pipeta e incubando 10 minutos a 55-65 °C.

A las muestras procedentes del macerado de órganos se le añadió inhibidor de RNAasas (RNAsin de Promega).

3.7.2. Reacciones de RT y PCR

El ARN obtenido se procesó mediante reacciones de retrotranscripción (RT) y de amplificación (PCR) con cebadores específicos (Tabla 3.6).

Los cebadores utilizados para detectar los diferentes genes y sus características se muestran en la Tabla 3.7.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio (0'5 µg/ml).

A

RT con la enzima AMV		
ARN	5 μ l	
Cebador <i>Reverse</i> 10 μ M	1 μ l	Ciclo previo a 65 °C 5 min.*
Agua DEPC	3 μ l	
Tampón 5X	3 μ l	
dNTPs 10 mM	0'5 μ l	Ciclo a 42 °C 35 min.
AMV 10 UI/ μ l (Promega)	0'5 μ l	
Agua DEPC	2 μ l	
TOTAL	15 μ l	

*En el caso de ARN de rotavirus el ciclo previo fue de 97 °C 5 min.

B

PCR con la enzima Taq polimerasa		
ADNc	5 μ l	
Tampón 10X	5 μ l	
Cl ₂ Mg 50mM	2 μ l	Ciclo inicial a 94 °C 2 min.
dNTPs 10mM	0'5 μ l	40 ciclos de:
Taq Polimerasa 5 UI/ μ l (Biotools)	0'5 μ l	Desnaturalización a 94 °C 1 min.
		Hibridación a t ^a variable 1 min, 20 seg.
		Extensión a 72 °C 2 min.
Cebador <i>Forward</i> 10 μ M	3 μ l	Ciclo final de extensión a 72 °C 10 min.
Cebador <i>Reverse</i> 10 μ M	3 μ l	
Agua milliQ	31 μ l	
TOTAL	50 μ l	

Tabla 3. 6. Reacciones de retrotranscripción (RT) y amplificación del ADN (PCR). Se indican las cantidades necesarias de reactivo para una reacción. A. RT. B. PCR.

A			
Secuencia detectada	Cebador <i>Forward</i>	Cebador <i>Reverse</i>	Tamaño del amplificado (pb)
Gen N de coronavirus	Leader15	TN224	309
Gen VP7 de rotavirus clonado en el virus rTGEV _{S-MHV} -VP7	Leader15	VP7-RF	228
Gen VP6 de rotavirus clonado en el virus rTGEV _{S-MHV} VP2/VP6	Leader15	VP6-4	253
Gen de la 3-Gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa de ratón (Control de la extracción de ARN)	GAPDH-F	GAPDH-R	350

B		
Nombre	Secuencia	Localización en el genoma (nt)
Leader 15	5' GTGAGTGTAGCGTGGCTATATCTCTTC 3'	Secuencia líder de los ARNs de coronavirus (15-41)
TN224	5' CCTTCACCATGCGATAGC 3'	Gen N de coronavirus (224-241)
VP7-RF	5' CTGCATACGCAGTATCCATTG 3'	Gen VP7 de rotavirus RF (233-253)
VP6-4	5' GGTAATTACCAATTCCTCCAG 3'	Gen VP6 de rotavirus (166-187)
GAPDH-F	5' TGC ATC CTG CACCACCAA CT 3'	Gen GAPDH de ratón (502-520)
GAPDH-R	5' TGC CTGCTT CACCACCTTC 3'	Gen GAPDH de ratón (832-850)

Tabla 3.7. Aplicación y características de los cebadores empleados para analizar los virus recombinantes. A. Cebadores utilizados para detectar genes de TGEV, de rotavirus clonados en el genoma de TGEV y de ratón. También se indica el tamaño del fragmento que amplifican. **B.** Características de los cebadores empleados.

3.8. Inmunohistoquímica

3.8.1. Preparación de cortes histológicos

Los estudios histológicos se realizaron en ratones deficientes STAT1^{-/-} debido a que la deficiencia en la respuesta al interferón permite una mayor replicación viral (Durbin et al., 1996; Meraz et al., 1996).

Se inocularon 4 ratones homocigóticos STAT1^{-/-} por vía intragástrica e intranasal con 2×10^6 uff del virus rTGEV_{S-MHV}. Al segundo y tercer día post-inoculación se sacrificaron dos ratones cada día y se extrajeron fragmentos de los intestinos delgado y grueso, hígado, bazo y pulmón. Las secciones se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS. Tras la fijación las muestras se incluyeron en parafina. Después de la inclusión se obtuvieron bloques de parafina en el procesador Leica ASP 300 S. A partir de los bloques se obtuvieron cortes de 2 μ m de grosor con el microtomo (Leica RM 2155). Los cortes se montaron en portaobjetos con poli-lisina (Polysine, Menzel-Glaser), para la correcta fijación del corte.

3.8.2. Inmunohistoquímica

Una vez fijados los cortes en cubreobjetos, éstos se trataron de la siguiente forma:

- ◆ Las muestras se desparafinaron en estufa a 65 °C durante 1 hora y después se pasaron por diluciones de xilol graduales.
- ◆ Las muestras se hidrataron pasando por diluciones graduales de alcoholes (100°, 60° y 70°) y se lavaron con agua destilada.
- ◆ Los portaobjetos se incubaron en tampón citrato 10 mM (citrato sódico 10 mM, pH 6) a 98 °C durante 40 minutos para realizar el desenmascaramiento antigénico.
- ◆ En el caso del marcaje con peroxidasa (HRP), se inhibió la peroxidasa endógena durante 30 minutos con metanol conteniendo 3% de H₂O₂.
- ◆ Antes de la incubación con el anticuerpo primario (anti-N de TGEV), se bloqueó el colágeno con suero fisiológico con 20% de SBF. El anticuerpo se incubó una hora a temperatura ambiente.
- ◆ Después de lavar en PBS, se añadió el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con HRP del kit de Envision (EnVisionTM+ System, HRP, DAKO) o marcado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma). En el marcaje con HRP se realizó el revelado con diaminobencidina (DAB)

◆ Por último, en el caso del marcaje con HRP se realizó un contraste con hematoxilina de Harris. Los portaobjetos se deshidrataron en diluciones graduales de alcoholes y xiloles para realizar el montaje con Entellan (Merck). En el caso del marcaje con fluoresceína, se realizó un contraste con azul de Evans y el montaje se hizo con glicerol tamponado (Light Diagnostics).

3.9. Inmunizaciones

En los estudios de inmunización se utilizaron ratones hembras Balb/c y STAT1^{-/-} inoculadas con 10⁶ uff/ratón de virus recombinante procedente de la infección de cultivos celulares. Cada grupo de inoculación estaba formado por 5 ratones. El suero de cada animal se analizó previamente mediante ELISA para confirmar su negatividad para anticuerpos anti-rotavirus.

Los inóculos víricos se administraron por tres vías: intragástrica, intragástrica-intranasal e intraperitoneal. Por la vía intragástrica se inocularon 200 µl con una sonda adecuada (Harvard Apparatus). Por la vía mixta intragástrica-intranasal se inocularon 10 µl con una micropipeta a animales anestesiados. Por último, por la vía intraperitoneal se inocularon 100 µl empleando jeringuillas de 1 ml con una aguja de 28 gauge a animales previamente anestesiados.

La pauta de inoculación consistió en tres dosis a intervalos de 15 días. Las muestras de suero se obtuvieron 15 días después de cada inoculación. Las muestras de heces se recogieron 20 días después de cada inoculación (Figura 3.2). El suero se obtuvo por centrifugación a 3.000 rpm de la sangre obtenida mediante la punción en el seno maxilar. Las muestras de suero se conservaron a -30 °C hasta su análisis. Las heces se congelaron suspendidas en PBS a una concentración de 100 mg/ml. Para su análisis estas muestras se homogeneizaron y se centrifugaron a 5.000 rpm en microcentrífuga. Los sobrenadantes se analizaron por enzimoimmunoensayo.

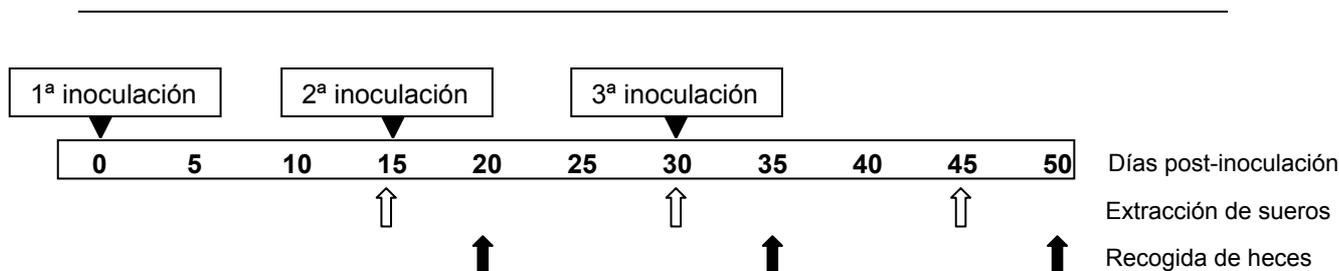


Figura 3.2. Esquema de inoculaciones y posterior extracción de sueros y recogida de heces de ratones Balb/c y STAT1^{-/-} inoculados por diferentes vías con los virus recombinantes con tropismo modificado por el ratón.

3.10. Determinación de anticuerpos

3.10.1. Niveles de anticuerpos

El análisis de los anticuerpos séricos y fecales se realizó por la técnica de enzimoimmunoensayo, previamente descrita por Colomina et al. (1998) con modificaciones:

- ◆ Placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar) se tapizaron durante 2 horas con 10 µg/ml del antígeno purificado en tampón carbonato/bicarbonato 0'1 M a pH 9'6. Las placas se guardaron a 4 °C hasta su utilización.
- ◆ Los lavados y diluciones se realizaron con PBS-Ca (0'9 mM Cl₂Ca) con 0'5% de Tween-20 (PBS-T-Ca), porque esta concentración de calcio mantiene la estructura nativa de la proteína VP7 (Dormitzer et al., 1994).
- ◆ El análisis de anticuerpos séricos de tipo IgG o IgA se realizó diluyendo los sueros en PBS-T-Ca con 1% BSA. La determinación de IgA en heces se realizó utilizando 50 µl de los sobrenadantes de las heces y 50 µl de PBS-Ca.
- ◆ Para detectar los anticuerpos de las muestras, se emplearon anticuerpos anti-IgA o anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa (Sigma) a una dilución 1/2.000.
- ◆ El revelado se realizó con o-fenilenediamina (OPD) y H₂O₂. Después de una incubación de 10 minutos, la reacción se detuvo con H₂SO₄ 3M.

La lectura de la absorbancia se determinó en espectrofotómetro (384 plus SPECTRAmax, Molecular Devices con el programa SoftMax Pro) a 492 nm.

3.10.2. Titulación de anticuerpos neutralizantes

Se ha realizado la titulación de anticuerpos neutralizantes IgG séricos anti-rotavirus mediante el método de reducción de focos infectivos de rotavirus RF, por inmunoperoxidasa. El protocolo seguido fue:

- ◆ Células MA104 se cultivaron en 0'1 ml de medio MEM 10% SBF en pocillos de microplacas de 96 pocillos (Costar), a una concentración de 2×10^5 células/ml. Se incubó 24 horas a 37 °C.
- ◆ El inóculo de rotavirus se activó con tripsina tipo IX a 10 µg/ml (Sigma) durante 30 minutos a 37 °C. La dilución del virus se preparó en medio MEM sin SBF.
- ◆ Los sueros se descomplementaron a 56 °C durante 30 minutos. Las diluciones seriadas del suero se prepararon diluidas en medio MEM sin SBF, comenzando por la dilución 1/8.
- ◆ La dilución del virus se preparó para contar 50-100 focos por pocillo.
- ◆ 50 µl de la dilución del suero se incubaron junto con 50 µl de la dilución del virus durante una hora a 37 °C.
- ◆ Las células se lavaron una vez con medio de cultivo. La dilución del virus con la dilución del suero se inoculó a los pocillos y se incubó durante una hora a 37 °C.
- ◆ Los inóculos se aspiraron y las células se lavaron una vez con medio sin suero. Se añadió 100 µl de medio con tripsina tipo IX (Sigma) a 1 µg/ml.
- ◆ La placa se incubó a 37 °C durante 18 horas.
- ◆ El medio de cultivo se aspiró y las células se fijaron con metanol:acetona.
- ◆ El fijador se retiró y las células se lavaron con PBS.
- ◆ Se agregaron 100 µl/pocillo del anticuerpo primario (monoclonal anti-VP6 2F3E7) diluido a 1/200 en PBS con 1% BSA (Sigma). Se incubó a 37 °C durante una hora.
- ◆ El anticuerpo se aspiró y las células se lavaron 3 veces con 100 µl de PBS.
- ◆ Se agregaron 100 µl/pocillo del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma) diluido a 1/2.000 en PBS con 1% BSA. Se incubó a 37 °C durante una hora.
- ◆ El conjugado se aspiró y las células se lavaron 3 veces con PBS.
- ◆ Se añadió 50 µl de sustrato DAB (Fast DAB de Sigma).

Se realizó un recuento del número total de focos en cada pocillo. El título de neutralización se estableció como la dilución del suero que reduce más del 50% de focos de peroxidasa, con respecto a un control del virus incubado sin la dilución del suero.

3.11. Purificación de antígeno vírico

3.11.1. Purificación de antígeno de coronavirus

Para purificar antígeno de coronavirus se realizó el siguiente protocolo:

- ◆ Monocapas de células ST se infectaron con TGEV. A las 42 horas post-infección se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación.
- ◆ La suspensión se clarificó centrifugando 20 minutos a 7.500 rpm con el rotor TA 14-50 de la centrífuga TJ-25 (Beckman Coulter).
- ◆ El sobrenadante obtenido se ultracentrifugó (rotor basculante SW28, centrífuga Beckman L8-70M) a 25.000 rpm durante una hora en un colchón de sacarosa al 31% en TEN (Tris-HCl 0'01 M pH 7'4, EDTA 1 mM, NaCl 1M) con Tween-20 al 0'2% (v:v).
- ◆ El precipitado se resuspendió en 1 ml de TEN con Tween-20 al 0'05% y se depositó en un gradiente de sacarosa (30-42%) en TEN.
- ◆ Se centrifugó a 25.000 rpm durante dos horas en ultracentrífuga.
- ◆ Las fracciones del gradiente se recogieron y se diluyó una alícuota a 1/20 con NaOH 0'1 N porque inactiva al virus. La densidad óptica se midió a 260 nm. Se recogieron las fracciones que forman el primer pico de absorbancia y el segundo (virus inactivado) y se añadió TEN.
- ◆ El sobrenadante se centrifugó en ultracentrífuga durante una hora a 25.000 rpm. El sedimento se resuspendió en 1 ml de TNE (Tris-HCl 0'01 M pH 7'4, EDTA 1 mM, NaCl 0'1M). y se congeló a -80 °C hasta su uso.

La concentración de proteínas se determinó mediante la lectura de la densidad óptica a 260 nm (Helios Unicam spectrophotometer, Unicam Spectrometry) de una dilución 1/60 en NaOH 0'1 N y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de proteínas (mg/ml)} = 0'1 \times \text{Absorbancia a } 260\text{nm} \times \frac{1}{\text{dilución}}$$

3.11.2. Purificación de antígeno de rotavirus

El antígeno de rotavirus se purificó como sigue:

- ◆ Células MA104 se infectaron con la cepa RF de rotavirus. Cuando el efecto citopático fue superior al 90% se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación.
- ◆ La suspensión resultante se clarificó centrifugando a 12.000 rpm durante 25 minutos, en rotor TA 14-50 de la centrífuga TJ-25 (Beckman).
- ◆ El sobrenadante con virus extracelular se separó y el sedimento se resuspendió en 0'5 ml de tampón TNC (Tris 0'05 M, ClNa 0'15 M, Cl₂Ca 0'05 M).
- ◆ Se realizó una extracción con tricloro-trifluoro-etano (Fluka) para extraer el virus intracelular.
- ◆ Las dos extracciones se juntaron y se centrifugaron durante 2 horas en ultracentrífuga a 50.000 rpm a 5 °C (rotor 70.1 Ti, centrífuga Beckman L8-70M).
- ◆ Finalmente, el sedimento se resuspendió en 300 µl de tampón TNC (0'05 M Tris-HCl, 0'15 M NaCl, 0'01 M Cl₂Ca).

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (BioRad) y finalmente se conservó congelado a -80 °C.

3.12. Detección de citocinas

Los niveles de 10 citocinas se determinaron a partir de cultivos celulares de esplenocitos y sueros de ratones inoculados con los virus recombinantes. Se inocularon un grupo de 3 ratones con el virus rTGEV_{S-MHV} y otro grupo de 6 ratones con el virus rTGEV_{S-MHV-VP7} (Figura 3.3). La dosis viral en ambos casos fue de 10⁶ uff/ratón.

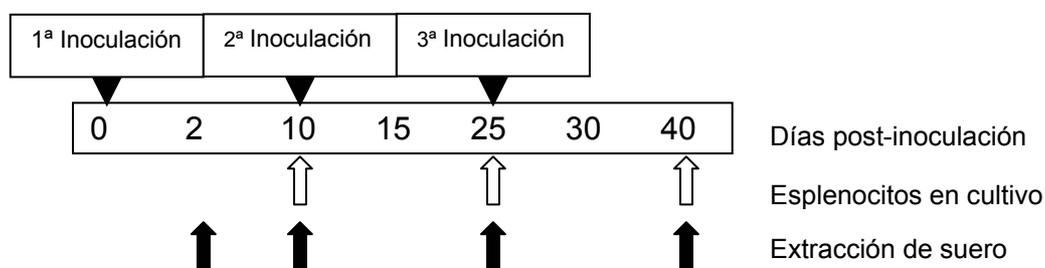


Figura 3.3. Esquema de inoculaciones y posterior extracción de sueros y obtención de esplenocitos de ratones Balb/c inoculados con los virus rTGEV_{S-MHV} y rTGEV_{S-MHV-VP7}.

3.12.1. Obtención de muestras

3.12.1.1. Obtención del suero

La sangre de los ratones inoculados con los virus recombinantes se extrajo a los dos días post-inoculación. El suero se obtuvo por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 minutos en microcentrífuga de la sangre obtenida mediante punción en el seno maxilar.

3.12.1.2. Cultivo de esplenocitos

Los ratones inoculados con los virus recombinantes se sacrificaron a los 10 días post-inoculación y se les extrajo el bazo. A continuación se realizaron los siguientes pasos:

- ◆ El bazo se lavó con medio RPMI (Gibco) 2% SBF y se disgregó con un tamiz celular (Sigma). Se obtuvieron células individuales que se resuspendieron en medio RPMI 10% de SBF.
- ◆ Las células se centrifugaron a 300 g durante 7 minutos. El sedimento celular se resuspendió en 5 ml de solución de lisis de eritrocitos (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 y 1 mM Na_2EDTA a pH 7.3).
- ◆ Los tubos se centrifugaron y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en medio AIM-V (Gibco). Se realizó un recuento de células viables en cámara de Neubauer con azul Tripán. La concentración celular se ajustó a 2.5×10^6 células/pocillo de una placa de 24 pocillos.

Las células se estimularon con el virus rTGEV (2×10^6 uff), rotavirus cepa RF (5×10^6 uff), concanavalina A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como control positivo y sin estimular. Se recogieron alícuotas a los 2 y 5 días post-infección.

3.12.2. Determinación de la concentración de citocinas por citometría de flujo

La determinación de citocinas se realizó mediante un inmunoensayo con microesferas fluorescentes (FlowCytomix Mouse Th1/Th2 10 plex, Bender MedSystems). Se siguieron las instrucciones del fabricante:

- ◆ El tampón de dilución se preparó a 1/10 en agua destilada. A partir de éste se prepararon el conjugado de la biotina y de las microesferas a la dilución 1/20 cada una

y el estándar. Este último es un polvo liofilizado que se reconstituyó a la dilución indicada y se diluyó a 1/20, después se realizan diluciones seriadas 1/4 desde el estándar 2 al estándar 7.

- ◆ Los pocillos de la placa se remojaron con el tampón de dilución.
- ◆ En cada pocillo se añadió 25 µl de los estándares, de la muestra o del tampón para el blanco.
- ◆ Se añadió 25 µl de las microesferas a todos los pocillos.
- ◆ Se agregaron 50 µl de la mezcla del conjugado de biotina.
- ◆ La placa se cubrió para protegerla de la luz e se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
- ◆ Los pocillos se lavaron dos veces con tampón usando el filtrador de vacío de microplacas (Biomek® FX Filtration Systems, Beckman Coulter).
- ◆ Se añadió 100 µl de tampón de dilución y 50 µl de estreptoavidina-ficoeritina a una dilución 1/30 en tampón de dilución.
- ◆ La placa se cubrió para protegerla de la luz y se incubó durante una hora a temperatura ambiente.
- ◆ Los pocillos se lavaron dos veces con tampón de dilución usando el filtrador de vacío de microplacas.
- ◆ Se agregaron 200 µl del tampón de dilución y se mezclaron los componentes por aspiración repetida en cada pocillo. El contenido de cada pocillo se transfirió a una microplaca de 96 pocillos de poliestireno.

La lectura se realizó por citometría de flujo en un citómetro capaz de leer directamente la microplaca de 96 pocillos (Cytomics FC 500 MPL Flow Cytometry System con Software MXP, Beckman Coulter).

3.13. Estudios de protección

Se obtuvieron ratones recién nacidos del cruzamiento de 2 ratones Balb/c hembra, inmunizadas con el virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 por la vía intraperitoneal y de dos hembras inmunizadas por la vía intragástrica-intranasal, con machos no inoculados. Las camadas de crías de 5 a 7 días de edad se inocularon oralmente con 10 µl de EDIM o RF. La dosis de EDIM fue 10 veces la dosis diarreica 50 (DD₅₀), que se determinó mediante la inoculación oral de ratones lactantes con diluciones seriadas del virus. La dosis de RF fue de 2 x 10⁶ uff/ratón, que induce diarrea en el 90% de los ratones inoculados (Coste et al., 2000).

Se examinó la presencia de diarrea durante 4 días después de la inoculación. Se consideró diarrea la emisión de heces líquidas o pastosas, de aspecto brillante y amarillo tras un suave masaje abdominal al ratón, junto a la presencia de material fecal en la piel alrededor del ano.

3.14. Análisis estadístico

Se han aplicado pruebas no paramétricas para detectar la presencia o ausencia de diferencias significativas en los estudios de análisis de anticuerpos y de producción de citocinas. Para comparar muestras independientes se utilizó la prueba de Mann-Whitney. En el caso de muestras apareadas se empleó la prueba de rangos de Wilcoxon. En todos los casos se consideró un nivel de significatividad del 0'05. Para realizar los cálculos estadísticos se recurrió al programa de análisis estadístico SPSS (Lead Technologies, Inc.).

4. RESULTADOS

4.1. Diseño de virus recombinantes basados en el genoma de TGEV que codifican las proteínas VP7 y VP2/VP6 de rotavirus

Este trabajo se basa en la aplicación de un ADNc infeccioso que contiene el genoma completo del virus TGEV (pBAC-TGEV_{S-PTV-RS}), desarrollado en el laboratorio del Dr. L. Enjuanes. El ADNc infeccioso de TGEV se utilizó como vector de expresión de la ORF9 de rotavirus, que codifica la proteína estructural VP7. Simultáneamente, se desarrolló otro virus vector que contiene la ORF2 y la ORF6 de rotavirus, que expresa las proteínas estructurales VP2 y VP6, respectivamente, con el objetivo de producir VLPs de rotavirus.

En este vector viral se han delecionado los genes no esenciales 3a y 3b para reemplazarlos por el gen o los genes heterólogos, permitiendo una mayor capacidad de clonación.

4.1.1. Generación de virus recombinantes que expresan la proteína VP7 de rotavirus

4.1.1.1. Construcción de un ADNc infeccioso de TGEV que codifica la ORF9 de rotavirus

El gen heterólogo ORF9 de rotavirus se insertó en el ADNc infeccioso de TGEV para expresar la proteína VP7 mediante las técnicas descritas en Material y métodos (apartado 3.4.1). Los genes no esenciales 3a y 3b se deleccionaron, pero fue necesario conservar la TRS del gen 3a de TGEV para que la secuencia heteróloga se transcribiera (Figura 4.1). El vector generado se denominó pBAC-TGEV_{S-PTV-RS-Δ3ab-TRS_{3a}-VP7}.

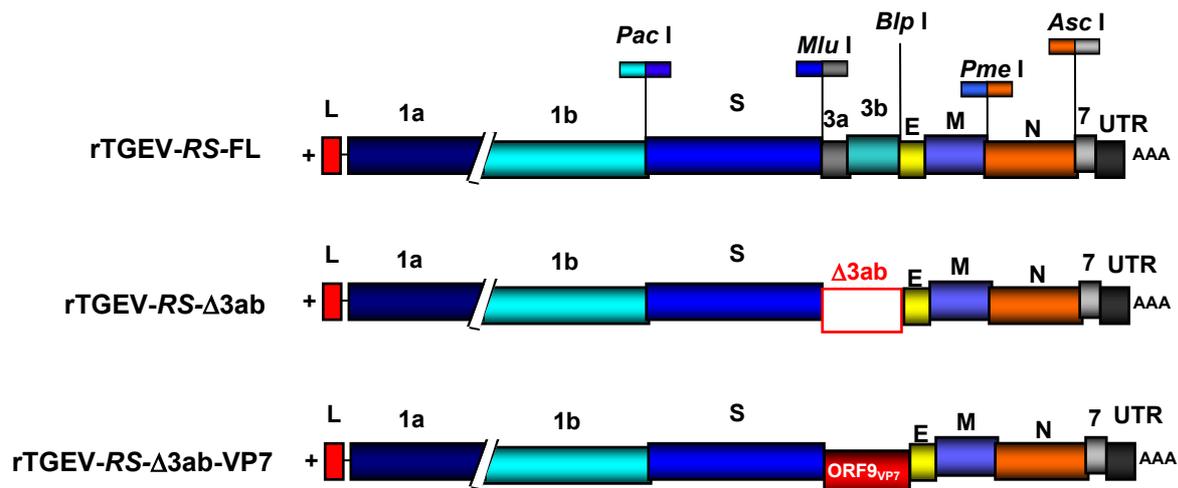


Figura 4.1. Esquema del vector viral derivado del genoma de TGEV que codifica la ORF9 de rotavirus. Se muestran los diferentes vectores virales utilizados para generar el vector viral con el gen ORF9 de rotavirus. Este gen se clonó reemplazando la delección de los genes no esenciales 3a y 3b de TGEV, y se encuentra bajo el control de la TRS del gen 3a de TGEV. Los genes de TGEV se indican en la parte superior del esquema del genoma como 1a, 1b (ORF 1a/1b), S, E, M, N y 7, UTR. También se indican los sitios correspondientes a las enzimas de restricción (*Mlu* I y *Blp* I) utilizadas para la clonación del gen heterólogo de rotavirus.

4.1.1.2. Obtención de virus recombinantes que expresan la proteína VP7 de rotavirus

El plásmido pBAC-TGEV_{S-PTV}-RS- $\Delta 3ab$ -TRS_{3a}-VP7 se transfectó en células PAPN-BHK. A las 48 horas post-transfección se recuperaron virus recombinantes del sobrenadante celular. Los virus recombinantes se amplificaron mediante tres pases sucesivos en células ST. A continuación, se clonaron tres veces mediante el aislamiento de placas de lisis en medio semi-sólido, para obtener un clon purificado que expresara establemente la proteína VP7. El virus recombinante rTGEV_{S-PTV}-VP7 se amplificó cinco veces y la cinética de crecimiento se analizó en células ST (Figura 4.2). El virus mostró una cinética de crecimiento similar a la del virus parental, llegándose a obtener títulos de hasta 3×10^7 ufp/ml a las 48 horas post-infección.

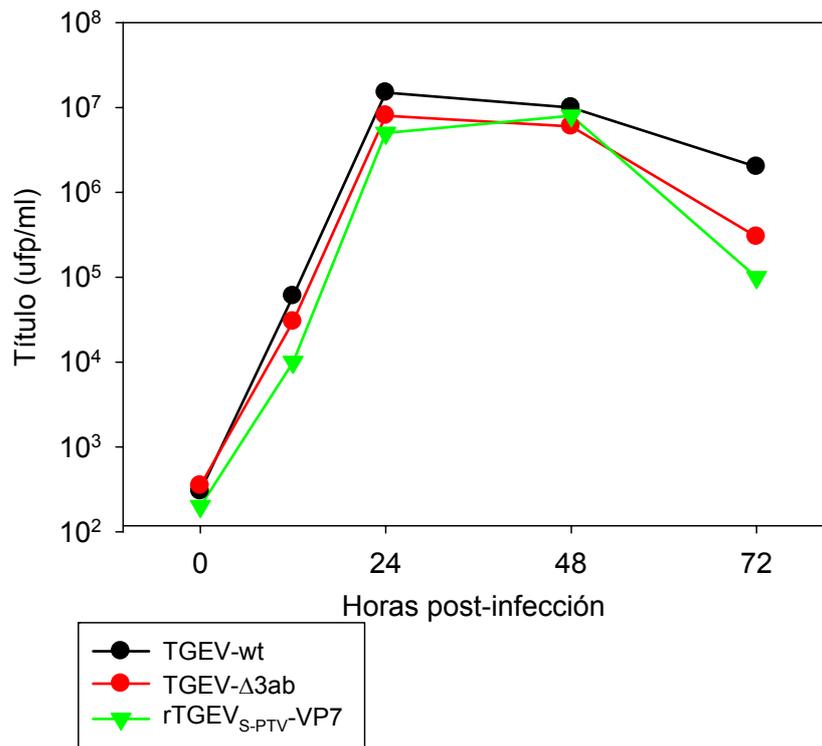


Figura 4.2. Cinética de crecimiento del virus rTGEV_{S-PTV}-VP7 en cultivo de células ST. La gráfica muestra la cinética de crecimiento del virus rTGEV_{S-PTV}-VP7 después de tres rondas de purificación mediante el aislamiento en placas de lisis. A las horas indicadas se tomó una alícuota que se tituló mediante la formación de placas de lisis. Como controles se incluyeron los virus TGEV_{S-PTV}-Δ3ab y TGEV-wt.

En cada paso de amplificación y purificación, se extrajo el ARN de las células ST infectadas con el virus recombinante para analizar la presencia del gen heterólogo mediante RT-PCR. Los primeros 224 nucleótidos del ARN subgenómico del gen N de coronavirus se amplificaron como control, para ello se utilizaron los oligonucleótidos Leader15 y TN224. Se observaron amplificadores del tamaño esperado. Para comprobar la presencia de la ORF9 de rotavirus se amplificó el gen utilizando los oligonucleótidos Leader15 y 3'-ORF9-RS (Figura 4.3 A). Inesperadamente, se observó que el gen de VP7 generó dos ARNs subgenómicos (ARNm VP7 y VP7.2) cuando se transcribía bajo el control de la TRS 3a de TGEV. La explicación de este hecho es que en la secuencia de la ORF9 de rotavirus se encuentra un motivo de secuencia similar a la secuencia conservada (CS) 5'-CUAAAC-3' y sus secuencias flanqueantes 5' y 3' (esta secuencia se localiza en las TRS que preceden a todos los genes de TGEV y en el extremo 3' de la secuencia líder). Estas secuencias CS son importantes porque se ha demostrado que son un factor determinante en la regulación de la transcripción de coronavirus

cuando se encuentran en un contexto de secuencia apropiado (Lai y Cavanagh, 1997; Sawicki y Sawicki, 1990). También se evaluó la expresión de la proteína heteróloga VP7 de rotavirus mediante inmunofluorescencia indirecta en las diferentes rondas de amplificación y purificación (Figura 4.3 B).

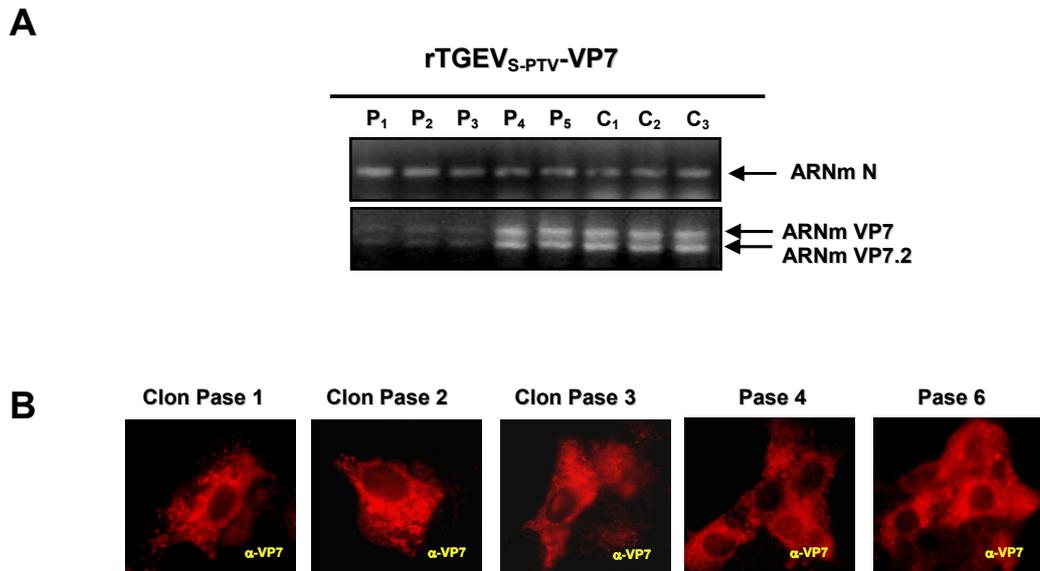


Figura 4.3. Estabilidad del gen ORF7 y de su expresión en el vector viral rTGEV_{S-PTV}-VP7. En cada ronda de amplificación y purificación del virus rTGEV_{S-PTV}-VP7 se analizó la presencia del gen de rotavirus mediante RT-PCR, y su expresión por inmunofluorescencia indirecta. **A.** RT-PCR para detectar la ORF9 de rotavirus. Se utilizaron oligonucleótidos que hibridan en la secuencia líder de TGEV y en la ORF9 de rotavirus. El gen N de coronavirus se detectó como control de la extracción de ARN y de la RT-PCR. Para ello, se utilizó un oligonucleótido directo que hibrida en la secuencia líder y uno reverso que hibrida en el gen N de TGEV. **B.** Ensayo de inmunofluorescencia indirecta en cultivo celular para comprobar la expresión de la proteína VP7. Se utilizó un suero policlonal específico frente a rotavirus para detectar la proteína VP7 de rotavirus.

En conclusión, el vector viral rTGEV_{S-PTV}-VP7 expresó establemente el gen ORF9 que codifica la proteína estructural VP7 de rotavirus.

4.1.2. Generación de virus recombinantes que expresan las proteínas VP2/VP6 de rotavirus

4.1.2.1. Construcción de un ADNc infeccioso de TGEV que codifica las ORF2 y ORF6 de rotavirus

Los genes heterólogos ORF2 y ORF6 de rotavirus, que codifican las proteínas estructurales VP2 y VP6, respectivamente, se clonaron en el báculo denominado pBAC-TGEV_{S-PTV-RS-FL}, reemplazando los genes no esenciales 3a y 3b (Figura 4.4). Se generó un ADNc infeccioso bicistrónico que codifica el virus recombinante rTGEV_{S-PTV-VP2/VP6}. Este virus expresa la ORF2 de rotavirus bajo el control de la TRS del gen 3a de TGEV y la ORF6 de rotavirus bajo la TRS modificada genéticamente del gen N de TGEV (TRS_{22N}) (Figura 4.4). La TRS_{22N} se insertó inmediatamente después del codón de parada de la ORF2 de rotavirus.

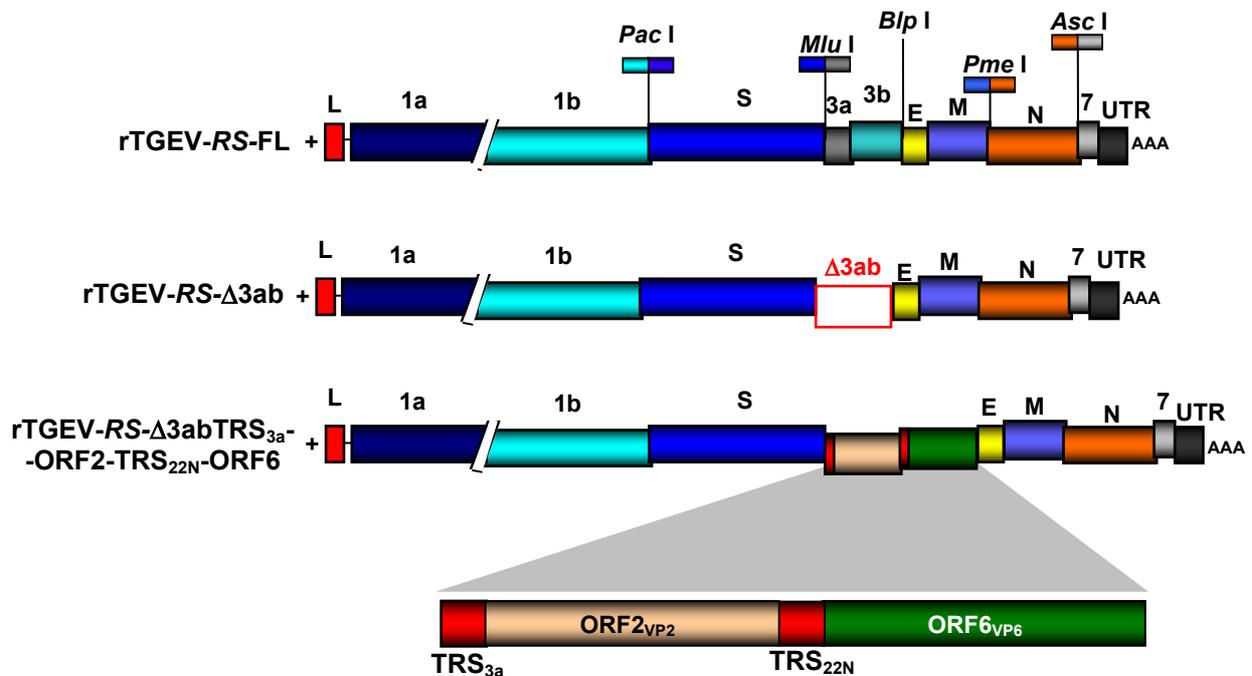


Figura 4.4. Esquema del vector bicistrónico derivado del genoma de TGEV que codifica la ORF2 y la ORF6 de rotavirus bajo el control de diferentes TRS. Se indica la posición de la ORF2 y la ORF6 de rotavirus reemplazando la delección de los genes no esenciales 3a y 3b de TGEV. Se muestra una ampliación de los genes de rotavirus clonados para señalar que la expresión de cada gen de rotavirus está controlada por una TRS diferente: la TRS 3a en el caso de la ORF2 y la TRS 22N en el de la ORF6. Los genes de TGEV se indican en la parte superior del esquema del genoma como 1a, 1b (ORF 1a/1b), S, E, M, N y 7, UTR. También se indican los sitios correspondientes a las enzimas de restricción situados entre los genes de TGEV y utilizados para clonar las proteínas de rotavirus.

4.1.2.2. Obtención de virus recombinantes que expresan las proteínas VP2/VP6 de rotavirus

Células pAPN-BHK se transfectaron con el báculo pBAC-TGEV_{S-PTV}-RS- Δ 3ab-TRS_{3a}VP2-TRS_{22N}VP6. A las 48 horas post-transfección se recuperaron los virus recombinantes del sobrenadante celular. La producción viral se amplificó mediante cinco pases sucesivos en células ST. El virus se clonó tres veces mediante aislamiento de placas virales en medio semi-sólido para obtener un clon purificado y que expresara establemente las VLPs de rotavirus. Se analizó la cinética de crecimiento en cultivo celular y se comprobó que el virus recombinante mostraba una cinética de crecimiento más lenta que el virus parental. El máximo título viral alcanzado fue 2×10^6 ufp/ml, a las 48 hpi (Figura 4.5).

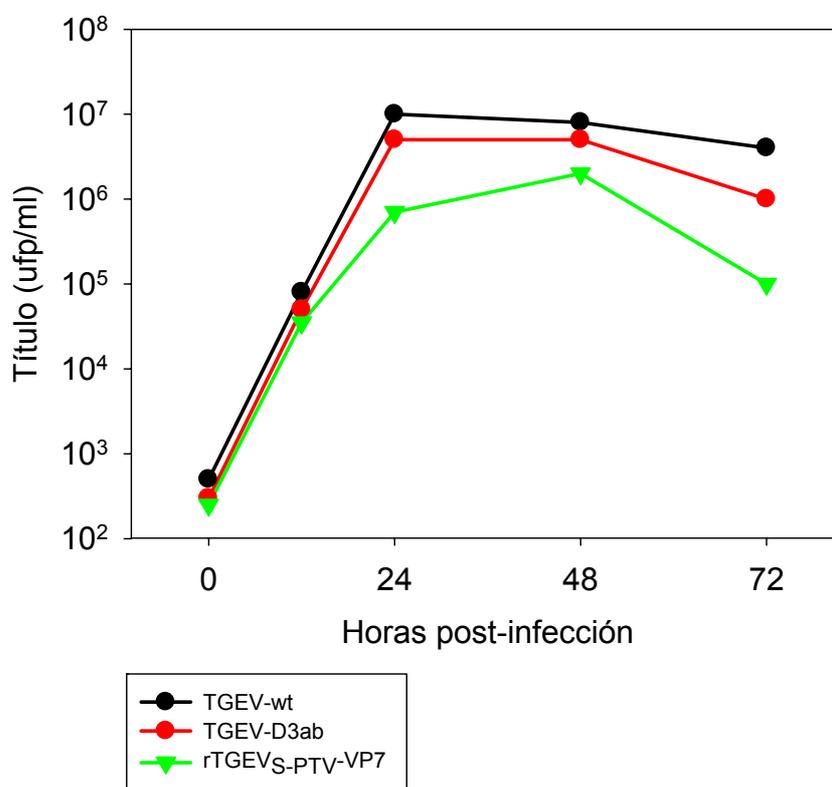


Figura 4.5. Cinética de crecimiento del virus rTGEV_{S-PTV}-VP2/VP6 en cultivo de células ST. Se representa la cinética de crecimiento del virus rTGEV_{S-PTV}-VP2/VP6 después de tres rondas de purificación mediante el aislamiento en placas de lisis en células ST. A las horas indicadas se tomó una alícuota que se tituló mediante la formación de placas de lisis. Los virus TGEV_{S-PTV}- Δ 3ab y TGEV-wt se incluyeron como controles.

El ARN total de células ST infectadas con el virus recombinante rTGEV_{S-PTV}-VP2/VP6, se extrajo para analizar la presencia de los genes heterólogos por RT-PCR. El gen N de coronavirus se detectó como control. Para comprobar la presencia de los genes de rotavirus se utilizó el oligonucleótido Leader15 para ambos genes; el oligonucleótido 3'-Swa-ORF6-RS para el gen ORF6 y 3'-BsgI-ORF2a-RS para el gen ORF2. Los productos de PCR mostraron los tamaños esperados para el gen N y los ARNm pertenecientes a los genes heterólogos (Figura 4.6).

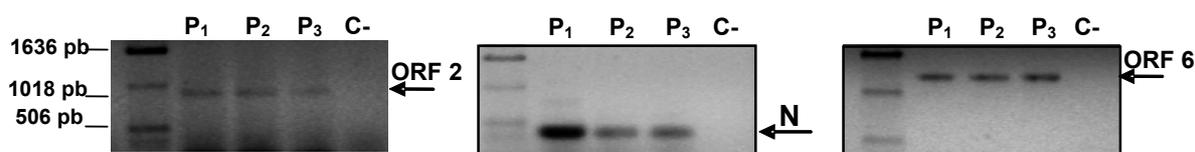


Figura 4.6. Análisis de los ARNs subgenómicos de los genes heterólogos de rotavirus por RT-PCR. En cada pase se aisló el ARN total de células ST infectadas con el virus recombinante rTGEV_{S-PTV}-VP2/VP6, con el fin de verificar la estabilidad de la transcripción de la ORF2 y la ORF6 de rotavirus. Para la detección del ARNm de las secuencias heterólogas, se utilizó un oligonucleótido único que hibrida en la secuencia líder de los ARNs subgenómicos de coronavirus y un oligonucleótido específico de cada gen heterólogo.

La expresión de las proteínas estructurales VP2 y VP6 de rotavirus por el vector viral, se analizó a las 16 hpi mediante microscopía confocal en células ST infectadas con el virus recombinante. Se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos frente a las proteínas heterólogas VP2 y VP6 de rotavirus, y frente a la proteína N de TGEV. Para reconocer al virus TGEV silvestre, se utilizó un suero policlonal específico frente a TGEV (Figura 4.7). Ambas proteínas heterólogas se expresaron eficientemente en células infectadas con el virus recombinante.

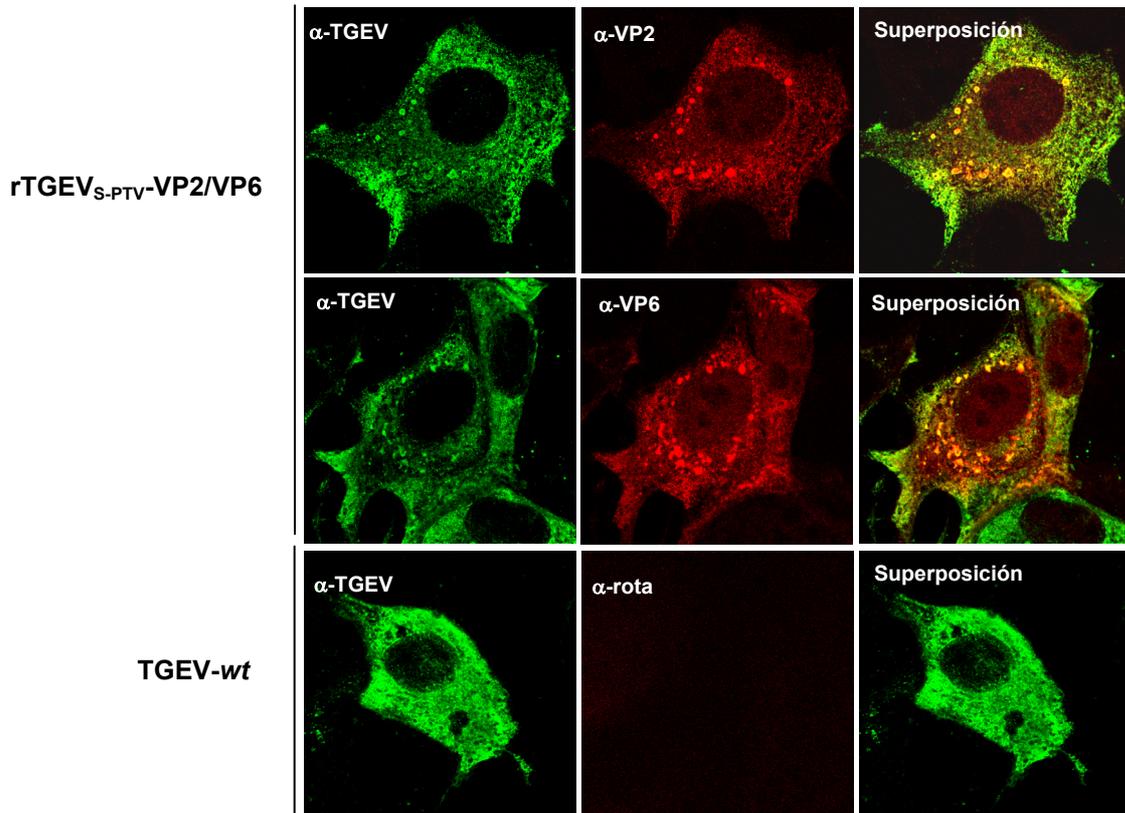


Figura 4.7. Análisis de la expresión de las proteínas estructurales VP2 y VP6 de rotavirus mediante inmunofluorescencia en cultivos celulares infectados con el virus rTGEV_{S-PTV}-VP2/VP6. Células ST se infectaron con los virus rTGEV_{S-PTV}-VP2/VP6 y TGEV-*wt*, con una moi de 1. Las monocapas se fijaron a las 16 hpi. La expresión de las proteínas VP2 y VP6 de rotavirus, se analizó por inmunofluorescencia con microscopía láser confocal utilizando anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas de rotavirus y de TGEV.

La formación y el ensamblaje de VLPs de rotavirus se comprobó mediante microscopía electrónica en células ST infectadas con el virus recombinante rTGEV_{S-PTV}-VP2/VP6 (Figura 4.8). Se observó una gran acumulación de VLPs de rotavirus en células infectadas por el virus recombinante. Las VLPs de rotavirus expresadas por el virus mostraron una morfología similar a las VLPs expresadas en otros vectores de expresión, como baculovirus (Crawford et al., 1994; Kim et al., 2002).

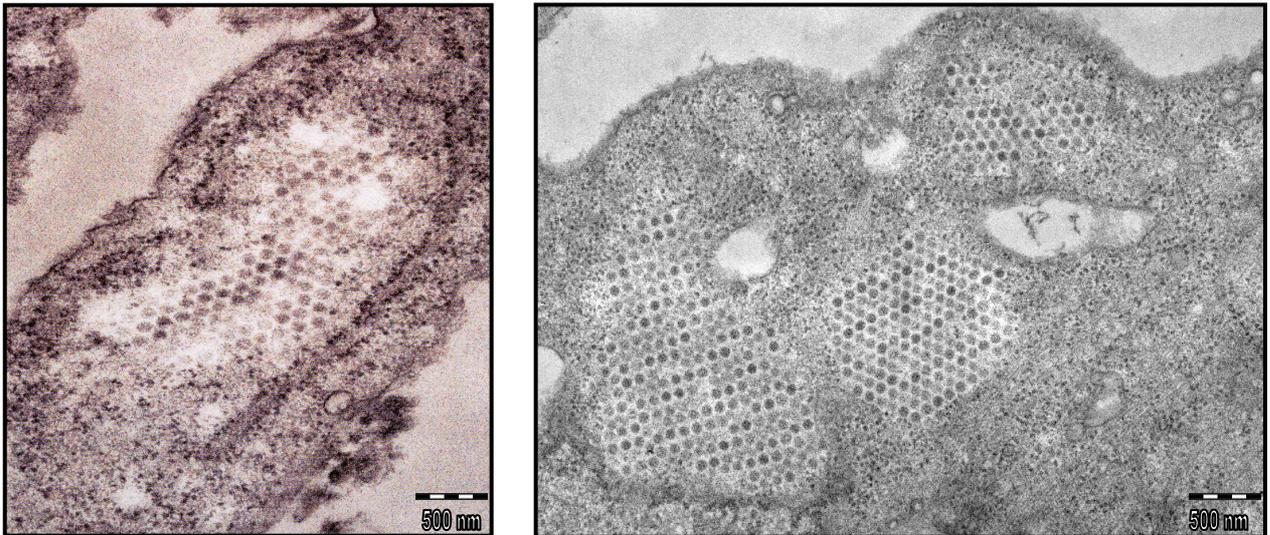


Figura 4.8. Detección de partículas de doble capa de rotavirus producidas por el vector viral recombinante rTGEV_{S-PTV}-VP2/VP6 en células ST, mediante microscopía electrónica. Células ST se infectaron con el virus rTGEV_{S-PTV}-VP2/VP6. La producción y ensamblaje de VLPs de rotavirus se analizó mediante microscopía electrónica.

Como conclusión, el vector viral bicistrónico basado en el genoma de TGEV rTGEV_{S-PTV}-VP2/VP6 expresó simultáneamente dos genes heterólogos de rotavirus (ORF2 y ORF6). Para ello, se reemplazaron los genes no esenciales 3a y 3b de TGEV por los genes heterólogos, que se expresaron por primera vez bajo dos TRS diferentes. La expresión de estas dos proteínas originó VLPs de rotavirus.

4.2. Cambio de tropismo de los vectores recombinantes basados en el genoma de TGEV (rTGEV_{S-MHV})

Una vez comprobada la expresión eficaz de proteínas heterólogas por el vector basado en el virus porcino TGEV, se modificó el tropismo del vector para adaptarlo a un modelo animal de fácil manejo y amplia utilización, como es el modelo en ratón.

4.2.1. Diseño de vectores virales basados en el coronavirus TGEV con tropismo para la especie murina

La sustitución del gen S de TGEV por el gen S del virus de la hepatitis del ratón (MHV), permitirá evaluar en el modelo murino la respuesta inmunitaria frente a antígenos expresados por un vector viral basado en TGEV.

Ambos virus pertenecen a dos grupos taxonómicos distintos de la clasificación de coronavirus, ya que TGEV pertenece al género α y MHV al género β . Esta clasificación implica diferente procesamiento de la proteína de la espícula. Por ello, el diseño de un vector con tropismo modificado se basó en la comparación de secuencias entre los genes S de los virus MHV-A59 y TGEV-C11. Se decidió construir una proteína quimérica (S_{MHV-A59/TGEV-C11}) con el extremo amino-terminal con el dominio globular de la proteína S del MHV y con el extremo carboxilo-terminal de TGEV, para facilitar la interacción de este dominio con el resto de las proteínas virales. Esta proteína quimérica se diseñó para que no se interrumpieran ninguno de los motivos de superenrollamiento (“coiled-coil”) presentes en la proteína S (Figura 4.9 A). La proteína quimérica resultante posee la región globular de origen murino, que es la zona de unión al receptor celular, pero conserva la región transmembrana de la proteína S del virus TGEV. Esta región es la responsable de la interacción con las otras proteínas estructurales del virus. Además, se tuvo en cuenta que la proteína quimérica se expresara bajo el control de la secuencia consenso de la TRS del gen S porcino. Esta secuencia asegura el reconocimiento de la TRS por parte de la replicasa de TGEV. Posteriormente, se sustituyó el gen S del ADNc infeccioso de TGEV por el gen S quimérico utilizando los sitios únicos de restricción *Pac* I y *Mlu* I presentes en el genoma de TGEV (Figura 4.9 B).

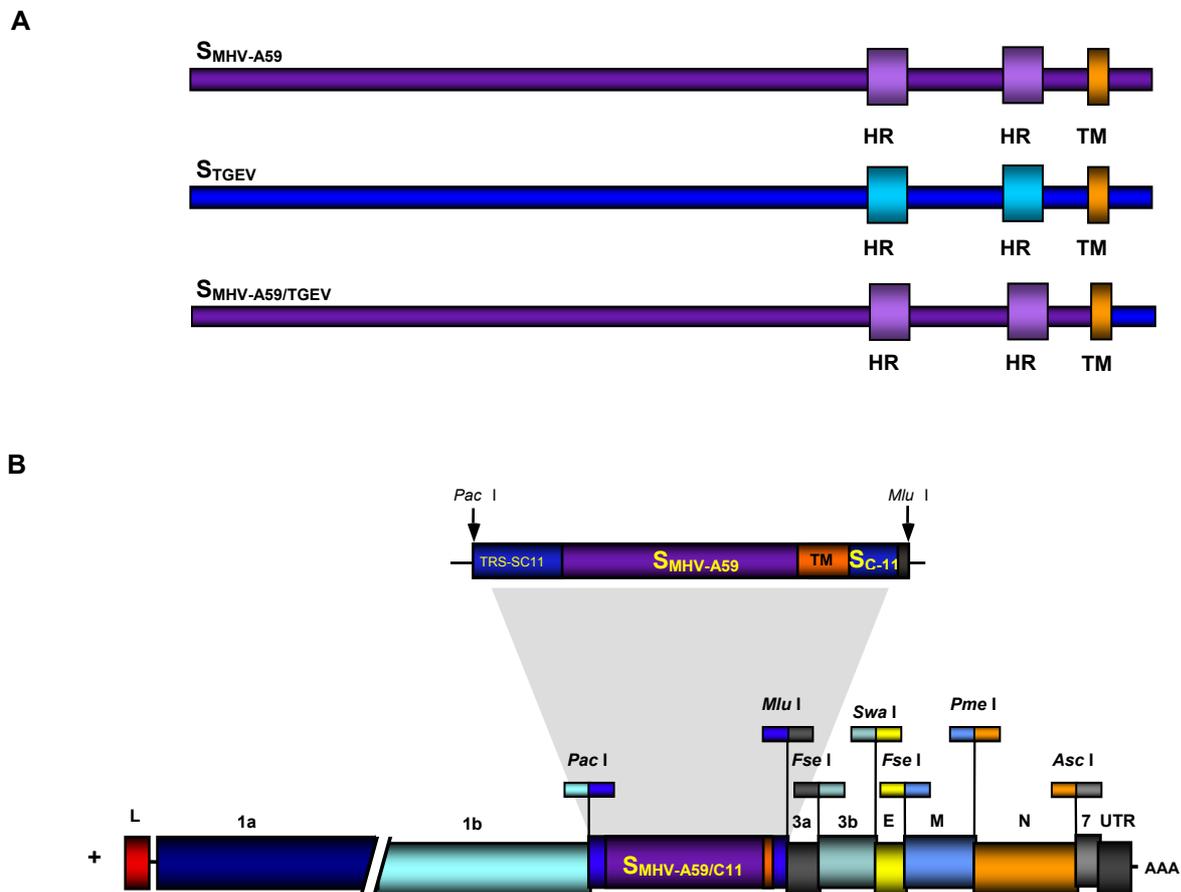


Figura 4.9. Esquema de la construcción del ADNc infeccioso de TGEV que presenta un gen S quimérico entre TGEV (porcino) y MHV (murino). **A.** Estructura de los genes S de TGEV (S_{TGEV}), de MHV ($S_{MHV-A59}$) y del gen S quimérico entre TGEV y MHV ($S_{MHV-A59/TGEV}$). Se señala en su secuencia los motivos de superenrollamiento (HR) y el dominio transmembrana (TM). Los colores indican la coincidencia en la secuencia y la procedencia de los motivos de superenrollamiento y transmembrana que incluyen el gen quimérico. **B.** Esquema del genoma de TGEV que contiene el gen S quimérico $S_{MHV-A59/TGEV}$. Los genes de TGEV se indican en la parte superior del esquema del genoma como 1a, 1b (ORF 1a/1b), S, E, M, N y 7, UTR. También se indican los sitios correspondientes a las enzimas de restricción (*Pac I* y *Mlu I*) utilizadas para el intercambio del gen S de TGEV por el quimérico $S_{MHV-A59/TGEV}$.

4.2.2. Obtención de virus con la proteína S quimérica ($S_{\text{MHV-A59/TGEV}}$) a partir de un ADNc infeccioso

Células pAPN-BHK se transfectaron con el ADNc infeccioso pBAC-TGEV_{S-MHV-A59/TGEV}-RS-FL para obtener el virus recombinante TGEV que contiene la proteína S quimérica ($S_{\text{MHV-A59/TGEV}}$). Las células se tripsinizaron a las 6 horas post-transfección, y se depositaron sobre monocapas de células murinas LR7 para seleccionar los virus recombinantes con capacidad de infectar células de ratón (Figura 4.10). El virus se amplificó mediante tres pases sucesivos del sobrenadante en células LR7, observándose un efecto citopático marcado desde el primer pase.

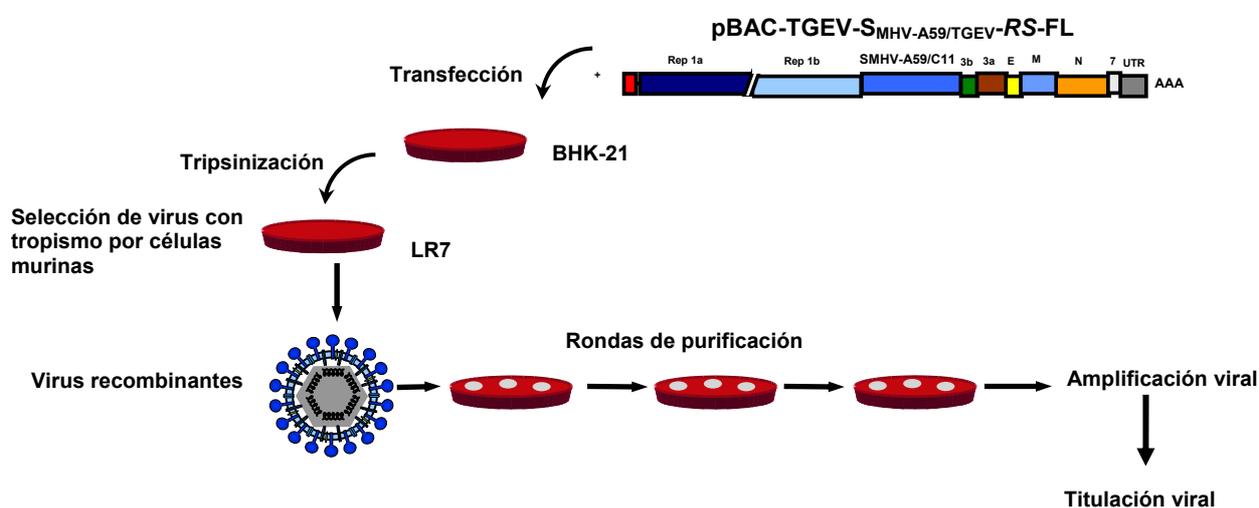


Figura 4.10. Esquema de la obtención del virus recombinante con tropismo por células de ratón a partir de un ADNc infeccioso basado en el genoma del coronavirus TGEV.

4.2.3. Generación de vectores virales basados en el genoma de TGEV con tropismo por el ratón y que expresan proteínas de rotavirus

Una vez obtenido el vector con tropismo murino, se modificó el tropismo de los vectores que expresaban las proteínas VP7 y VP2/VP6 de rotavirus. Partiendo de los vectores rTGEV_{S-PTV}-VP7 y rTGEV_{S-PTV}-VP2/VP6, se sustituyó el gen que codifica la proteína S porcina (S_{PTV}) por la proteína S quimérica $S_{\text{MHV-A59/TGEV}}$, utilizando los sitios de restricción *Pac* I- *Mlu* I. (Figura 4.11).

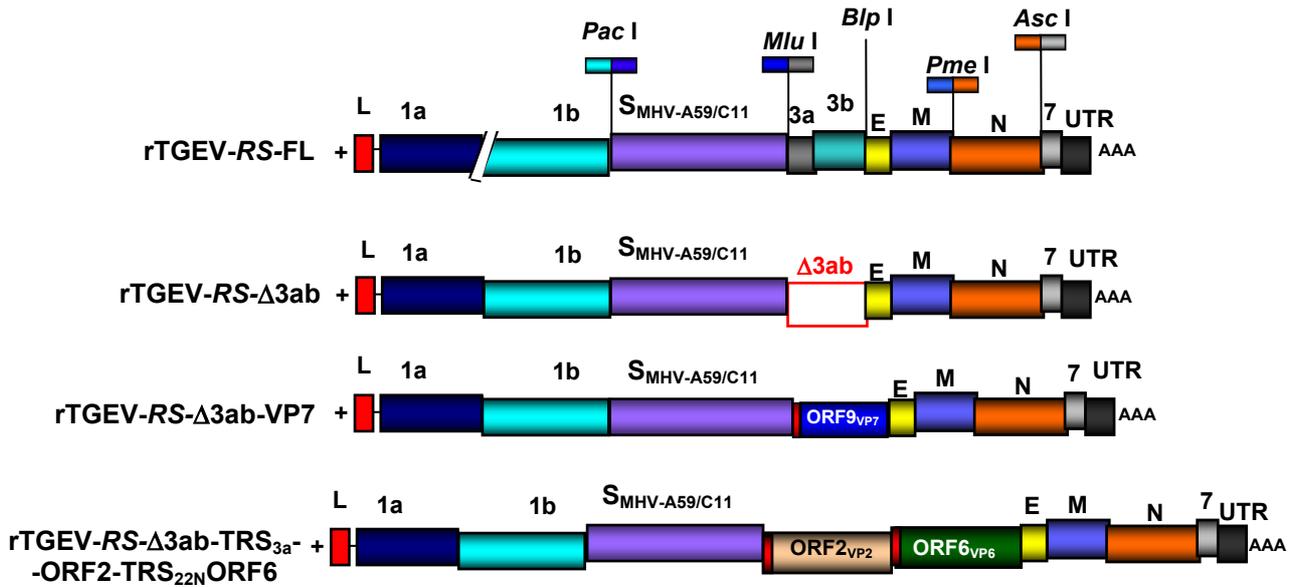


Figura 4.11. Esquema de los vectores derivados del genoma de TGEV que poseen el gen S quimérico S_{MHV-A59/TGEV} y que codifican las ORF de rotavirus. Se indican las posiciones de las ORFs de rotavirus en la delección de los genes no esenciales 3a y 3b de TGEV. Estas ORFs se expresan bajo el control de diferentes TRS de distintos genes de TGEV (TRS 3a para la ORF9 y ORF2, y TRS 22N para la ORF6). Los genes de TGEV se indican en la parte superior del esquema del genoma como 1a, 1b (ORF 1a/1b), S, E, M, N y 7, UTR. También se indican los sitios correspondientes a las enzimas de restricción (*Mlu* I y *Bln* I) utilizadas para la clonación del gen heterólogo de rotavirus.

El ADNc infeccioso de ambos vectores virales se transfectó en células pAPN-BHK y la progenie viral se amplificó mediante pases sucesivos en células murinas LR7. La expresión de las proteínas de rotavirus por los virus recombinantes se comprobó mediante microscopía láser confocal, tras tres pases de amplificación (Figura 4.12). Se observó claramente que las células murinas LR7 infectadas con los virus recombinantes expresaban las proteínas de rotavirus correspondientes.

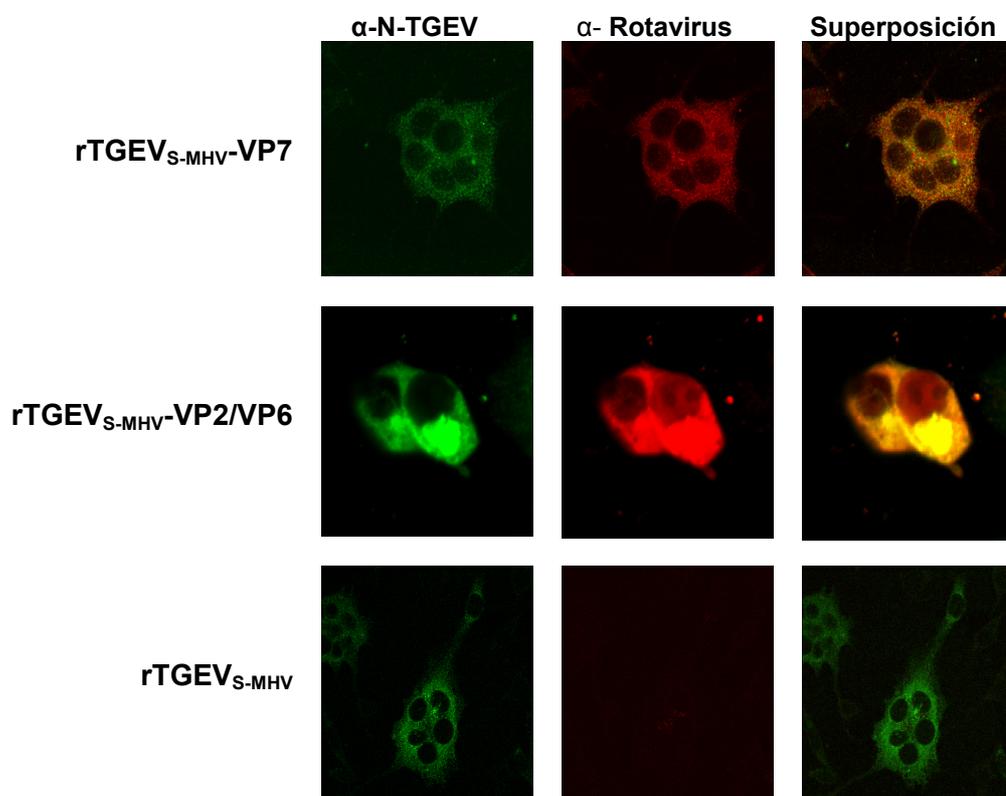


Figura 4.12. Detección de las proteínas de rotavirus en cultivo celular, producidas por los virus recombinantes con tropismo modificado mediante inmunofluorescencia láser confocal. Cultivos de células LR7 se infectaron con los virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 y rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6. Las células se fijaron y se incubaron con un anticuerpo monoclonal específico anti-N de TGEV y un suero policlonal anti-rotavirus.

4.3. Replicación “in vitro” del virus TGEV con tropismo murino (rTGEV_{S-MHV})

El coronavirus de origen porcino TGEV modificado genéticamente para adquirir tropismo murino (rTGEV_{S-MHV}), infectó eficientemente células de origen murino (LR7). Se consiguieron títulos virales elevados (10^7 - 10^8 ufc/ml) (Figura 4.13 A). El virus también replicó en células humanas transfectadas con el receptor del virus MHV (células CMR) (Figura 4.13 B).

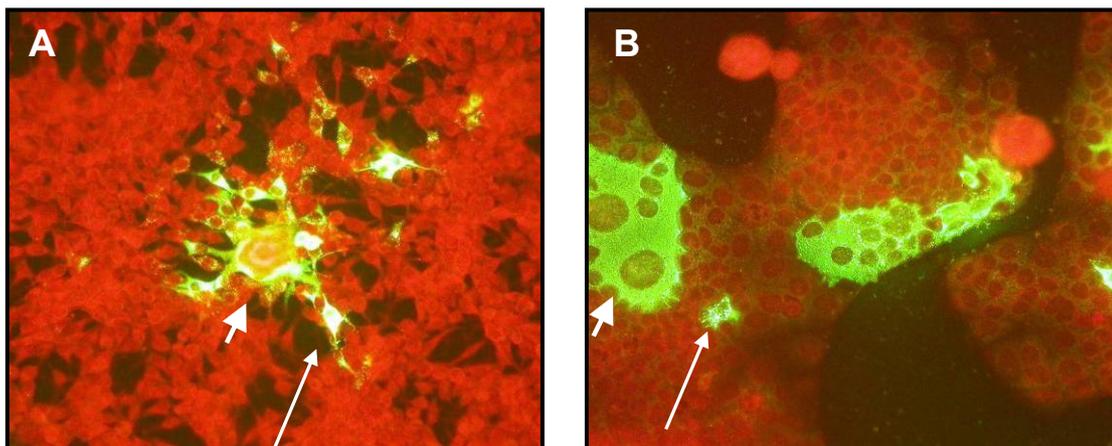


Figura 4.13. Detección por inmunofluorescencia del virus rTGEV_{S-MHV} en diferentes cultivos celulares. Cultivos celulares se infectaron, se fijaron y se realizó una inmunofluorescencia con el anticuerpo 3HDC10 anti-N de TGEV para detectar la presencia del virus. **A.** Células LR7 a las 20 horas post-infección. **B.** Células CMR a las 24 horas post-infección. En ambos casos se observan células infectadas aisladas (flecha larga) y sincitios celulares debidos a la replicación viral (flecha corta).

El virus recombinante rTGEV_{S-MHV} se amplificó y se compararon sus cinéticas de crecimiento con la del virus parental MHV-A59 en células LR7. El virus con tropismo modificado mostró la misma cinética de crecimiento que el virus parental, pero con títulos virales unas diez veces menores que el virus murino (Figura 4.14 A). Este hecho sugiere que el virus recombinante, con la proteína S de origen murino, puede infectar y replicar en células LR7, aunque no tan eficientemente como el virus que infecta a ratones. Asimismo, no se observó la replicación del virus rTGEV_{S-MHV} en células porcinas ST (Figura 4.13 B). Este suceso confirmó que la sustitución de la proteína S de TGEV por la proteína quimérica S_{MHV-A59/TGEV} confiere al virus TGEV la capacidad de infectar y replicar en células de ratón y, simultáneamente, anula la de infectar células porcinas.

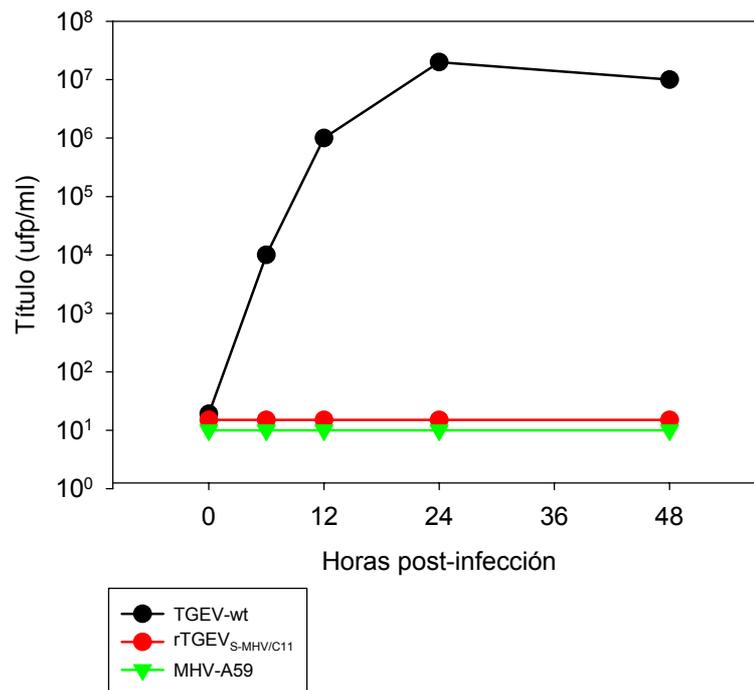
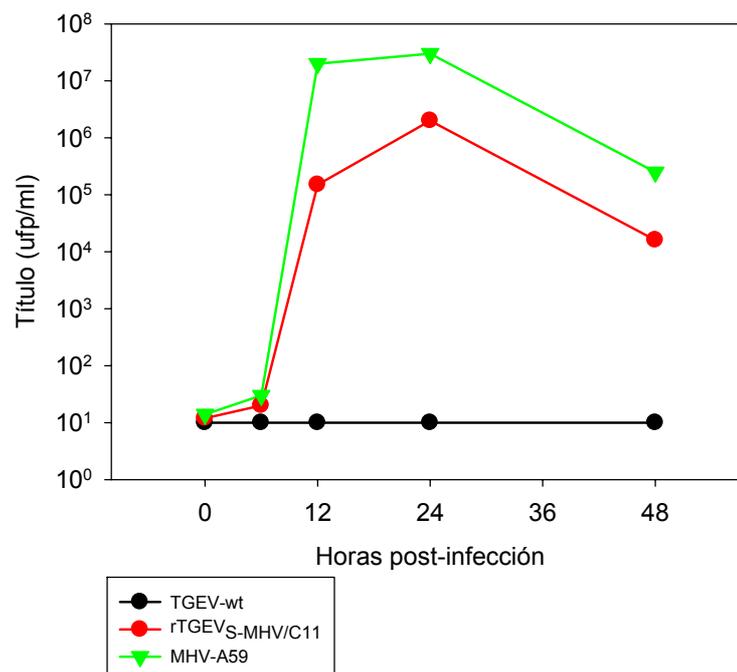
A**B**

Figura 4.14. Cinética de crecimiento del virus rTGEV_{S-MHV} en diferentes cultivos celulares. Se realizó una cinética de crecimiento del virus recombinante comparándolo con el virus TGEV silvestre y el virus MHV. **A.** Cinética de crecimiento en células de ratón LR7. **B.** Cinética de crecimiento en células porcinas ST. La sustitución de la proteína S por la proteína quimérica anula la capacidad del virus recombinante de infectar células de origen porcino.

El tamaño de las placas de lisis producidas por el virus con tropismo modificado $rTGEV_{S-MHV}$, se analizó en células LR7 y ST. Las placas de lisis obtenidas en células LR7, fueron de menor tamaño que las producidas por el virus MHV-A59 (Figura 4.15). Como era previsible, el virus recombinante no generó placas de lisis en células ST, mientras que el virus parental TGEV sí que las produjo. También se estudió el efecto citopático producido por este virus al infectar ambos tipos celulares. Los resultados confirmaron los vistos en la formación de placas de lisis. El virus recombinante no produjo sincitios o efecto citopático alguno en células ST (Figura 4.15). Sin embargo, sí que se observaron sincitios en células LR7, aunque de menor tamaño. La explicación es que el virus recombinante muestra una cinética de crecimiento más lenta que el virus MHV en células LR7.

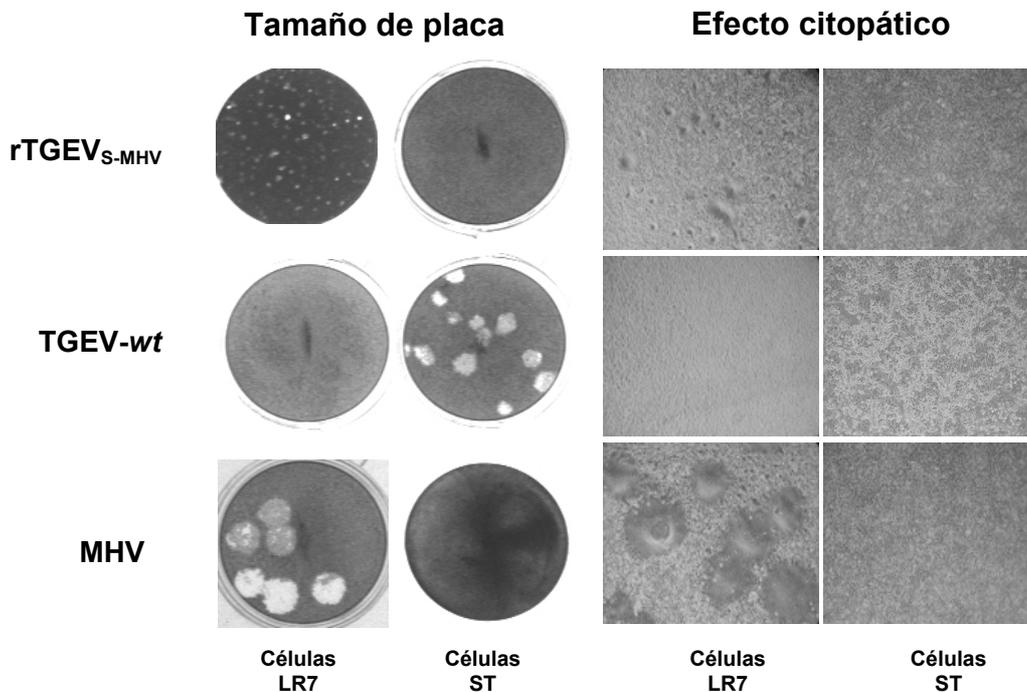


Figura 4.15. Estudio del tamaño de las placas de lisis y del efecto citopático producido por el virus $rTGEV_{S-MHV}$. La infección de células LR7 por el virus $rTGEV_{S-MHV}$ produce el mismo efecto citopático y placas de lisis con la misma forma que el virus parental MHV, aunque las placas son de menor tamaño. Células ST y LR7 se infectaron con los virus TGEV-*wt* y MHV, respectivamente, como controles positivos para comparar el efecto citopático y tamaño de las placas de lisis.

La presencia de la parte de origen murino de la proteína de la espícula del virus recombinante, se confirmó mediante un ensayo de inmunofluorescencia en células LR7. Se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos frente a la proteína S de MHV y frente a la proteína N de TGEV. Se observó fluorescencia utilizando el anticuerpo específico frente a la zona globular de la proteína S de MHV (Figura 4.16). Este resultado confirmó que se estaba produciendo una proteína quimérica entre MHV y TGEV, aunque el genoma del virus fuera de TGEV.

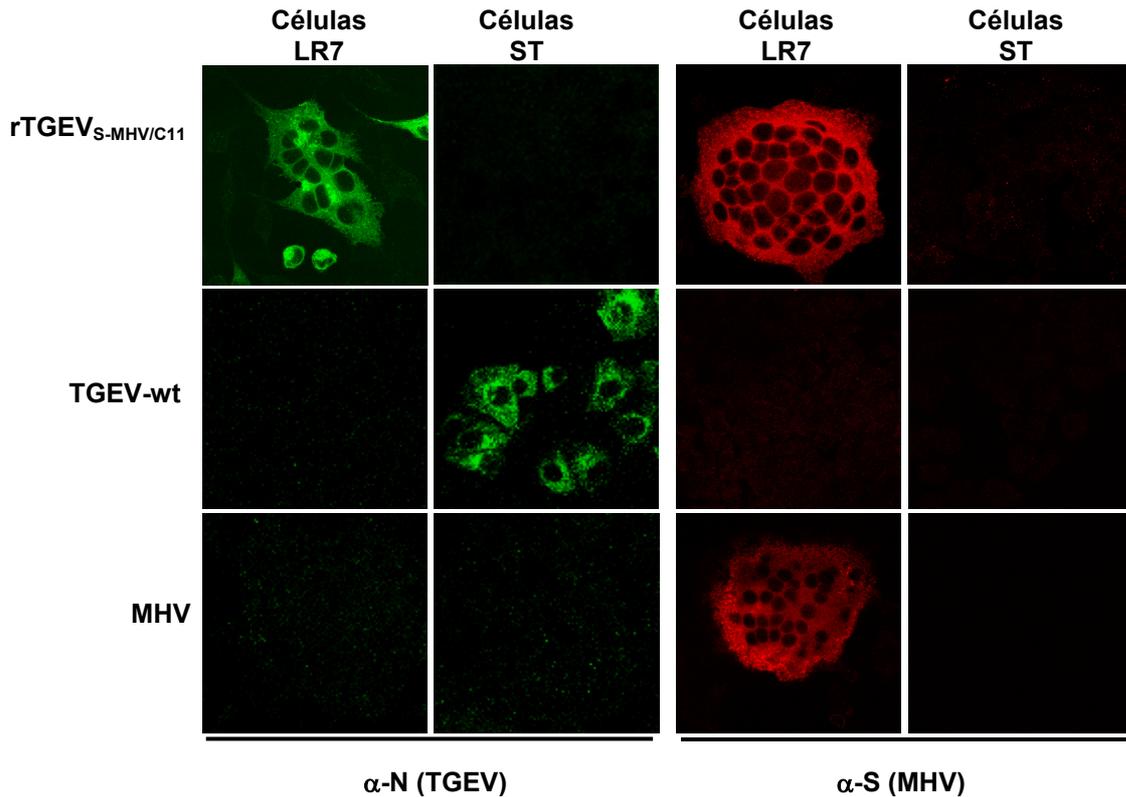


Figura 4.16. Detección del virus rTGEV_{S-MHV} y de la proteína S quimérica por inmunofluorescencia en cultivo celular. Células LR7 se infectaron con el virus rTGEV_{S-MHV}. Las células se fijaron a las 16 hpi y se realizó una inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales específicos frente a las proteínas N de TGEV y S de MHV, para detectar la presencia del virus y de la proteína S quimérica, respectivamente. Células LR7 y ST infectadas con los virus MHV y TGEV, respectivamente, se utilizaron como controles positivos. Como controles negativos se utilizaron células LR7 y ST infectadas con los virus TGEV y MHV, respectivamente.

Finalmente, el virus recombinante se purificó por aislamiento en placas de lisis y el gen S quimérico (S_{MHV-A59/TGEV}) se secuenció, obteniéndose la secuencia esperada (resultado no mostrado).

La sustitución del dominio globular de la proteína S del virus TGEV por el dominio globular de la proteína S del virus MHV, originó proteínas S quiméricas funcionales que forman parte del virión de TGEV. Estos resultados confirman que la proteína S es un determinante esencial en el tropismo específico de especie de coronavirus.

4.4. Cinética de la replicación del virus rTGEV_{S-MHV} en diferentes tipos celulares

Una vez confirmado el cambio de tropismo, se analizó la replicación del virus en distintas líneas celulares de fibroblastos de ratón (LR7, 3T3, MC57 y Balb Cl.7) y células CMR para seleccionar la línea celular más adecuada para la producción viral (Figura 4.17). El virus rTGEV_{S-MHV} alcanzó el título más elevado en la línea celular murina LR7, tras 24 horas de infección. En esta línea celular se logró obtener un título de 6×10^7 uff/ml. El título en la línea celular CMR fue, aproximadamente, un orden de magnitud menor. El resto de líneas celulares alcanzaron títulos tres órdenes de magnitud menores.

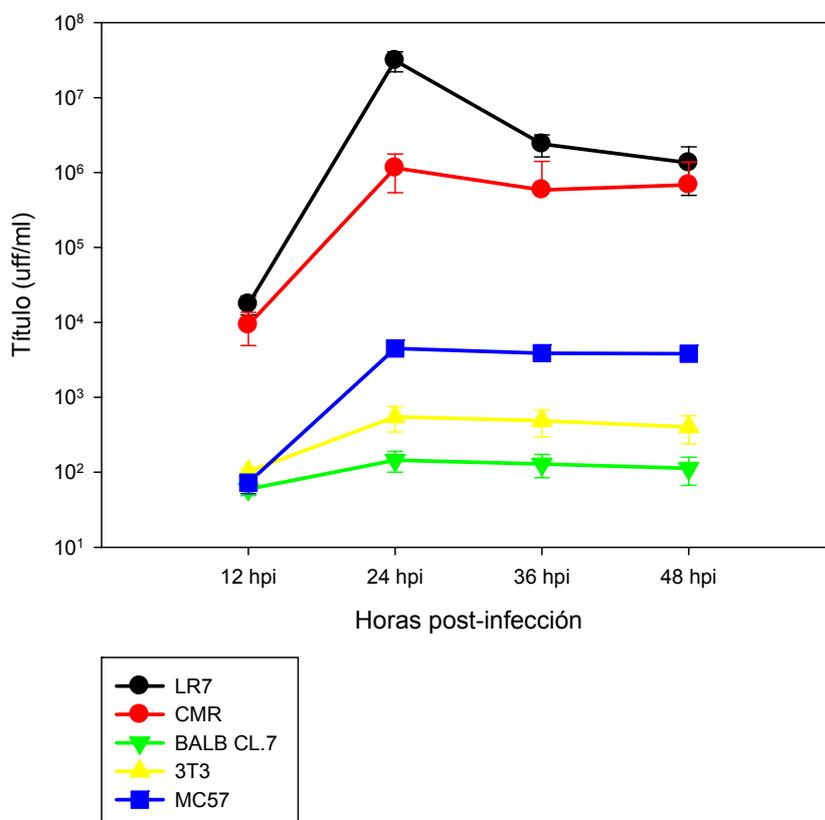


Figura 4.17. Cinética de la replicación del virus rTGEV_{S-MHV} en diferentes líneas celulares. Diferentes líneas celulares se infectaron con una moi de 1. El sobrenadante se recogió a las

12, 24, 36 y 48 horas post-infección y una alícuota se tituló por inmunofluorescencia con un anticuerpo frente al virus (anti-N de TGEV).

4.5. Cinética de la replicación y la producción de la proteína heteróloga por los virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 y rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6

Las condiciones de replicación viral se optimizaron en células LR7, porque en esta línea celular se obtuvieron los títulos virales más elevados y, por tanto, una mayor producción de proteínas heterólogas. La producción de las proteínas heterólogas por los virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 y rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6, se comprobó mediante inmunofluorescencia en cultivo celular (Figura 4.18). Los dos sistemas virales mostraron diferentes patrones de fluorescencia. El virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 presentó una fluorescencia difusa perinuclear o que abarcó todo el citoplasma. El virus rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6 produjo un patrón en forma de agregados intracitoplasmáticos que corresponden a la acumulación de dichas proteínas.

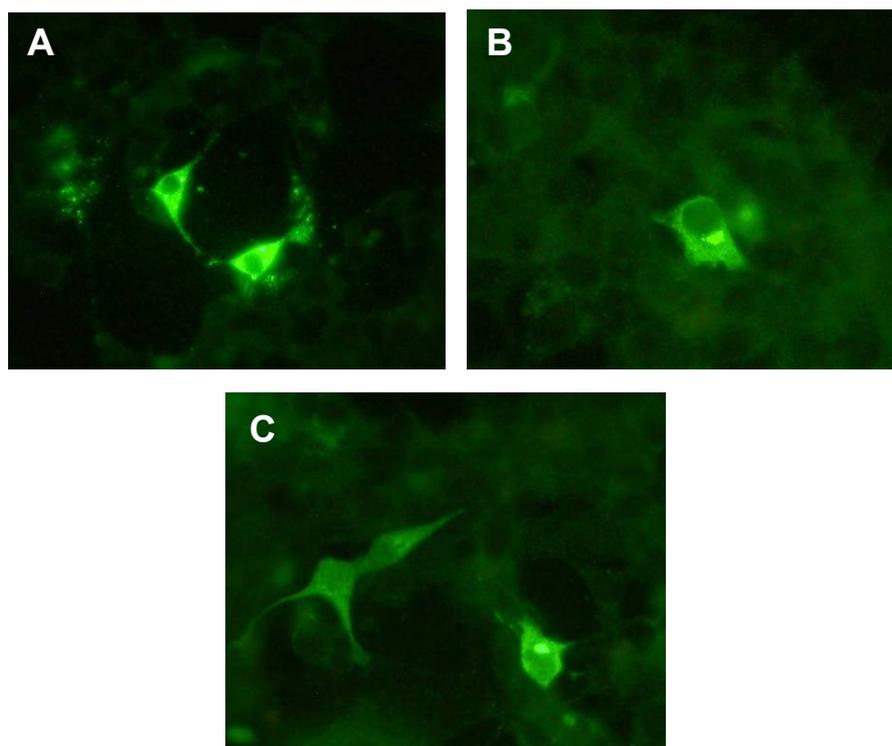


Figura 4.18. Análisis de la expresión de las proteínas heterólogas de rotavirus por los virus recombinantes rTGEV_{S-MHV}-VP7 y rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6 en células LR7. A. Infección con el virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 y revelado con un anticuerpo monoclonal anti-VP7. **B.** Infección con el virus rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6 y revelado con un anticuerpo monoclonal anti-VP2. **C.** Infección con el virus rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6 y revelado con un anticuerpo monoclonal anti-VP6.

Se realizó una cinética de la infección y de la producción de las proteínas heterólogas con ambos virus. La máxima replicación viral se produjo a las 20 horas para el virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 (Figura 4.19 A) y 22 horas para el virus rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6 (Figura 4.19 B). En ambos casos la máxima producción de las proteínas se observó a las 22 horas.

En el caso del virus vector rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6, se analizó la producción de las proteínas de rotavirus y la formación de VLPs en cultivo celular. La expresión de las proteínas de rotavirus en células infectadas, se examinó mediante marcaje con anticuerpos específicos y microscopía láser confocal (Figura 4.20). Las proteínas heterólogas se expresaron en el citoplasma de células infectadas. La detección de VLPs se realizó mediante inmunomicroscopía electrónica con oro coloidal. Acúmulos de partículas de oro coloidal se observaron en el citoplasma celular, especialmente en zonas ricas en ribosomas, lo que sugiere la síntesis en estos lugares de la proteína VP6 y posiblemente de VP2 (Figura 4.21). Sin embargo, no se observaron VLPs con claridad, a diferencia de lo que sucede cuando estas proteínas son expresadas por el vector con tropismo porcino rTGEV_{S-PTV}-VP2/VP6.

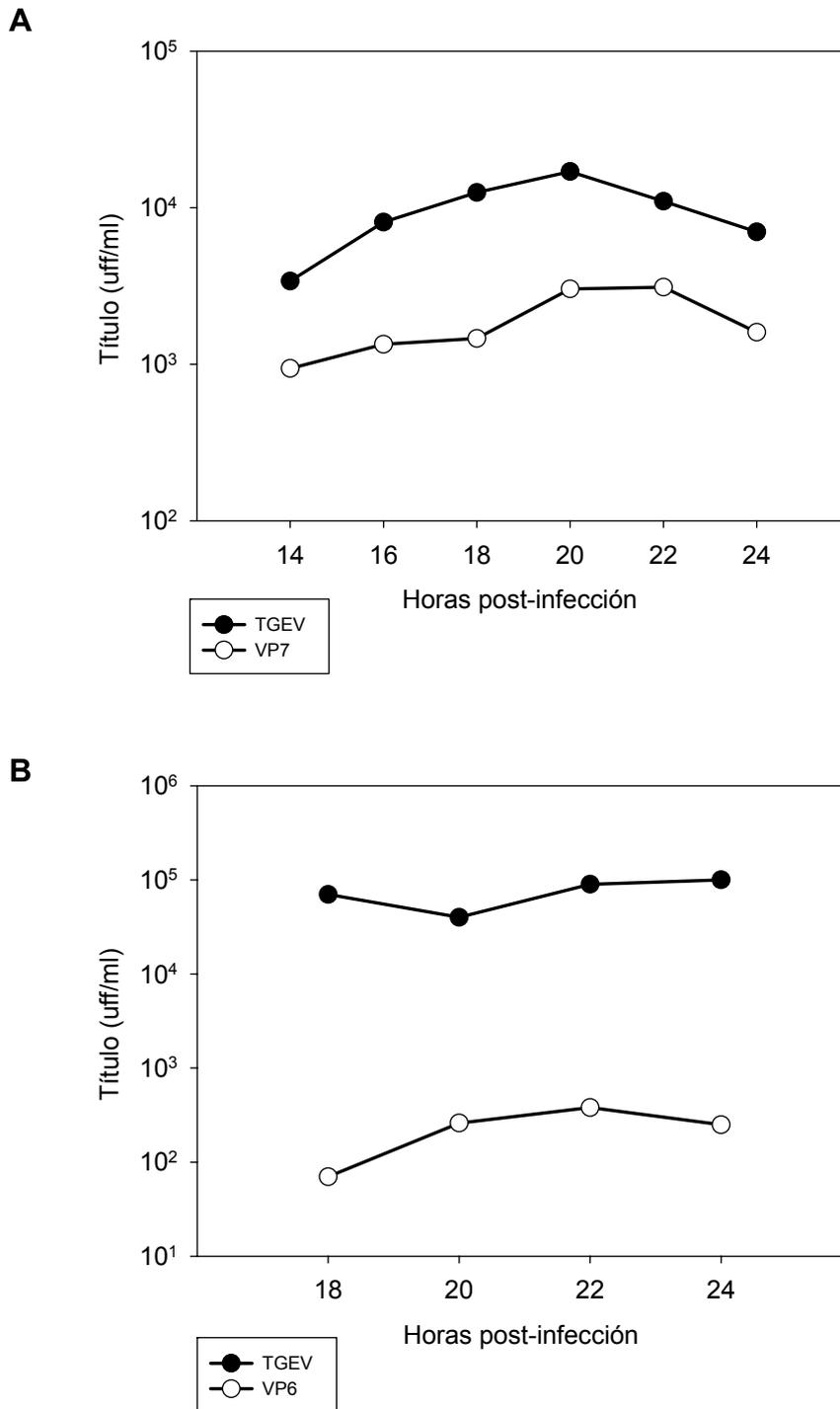


Figura 4.19. Cinética de la infección y la producción de proteína heteróloga por los virus recombinantes en células LR7. A. Virus rTGEV_{S-MHV}-VP7. **B.** Virus rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6. Frascos de cultivo celular se infectaron con una moi de 1. Los frascos se congelaron a diferentes horas post-infección y una alícuota se tituló mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo específico para el virus TGEV, suero policlonal frente a la proteína VP7 y un anticuerpo monoclonal para la proteína VP6.

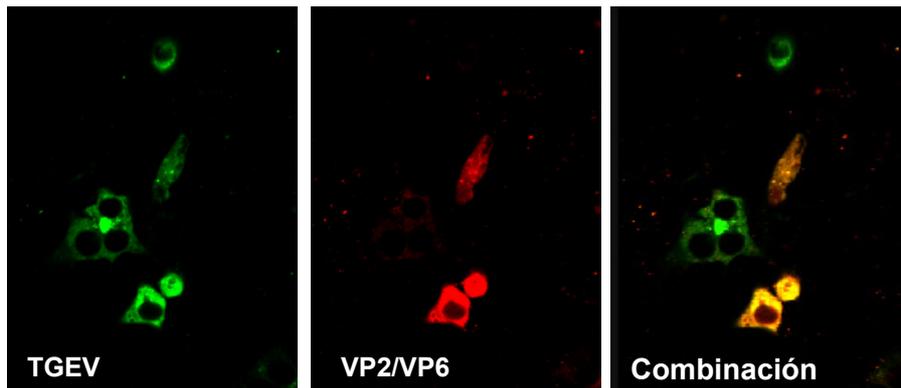


Figura 4.20. Análisis por inmunofluorescencia láser confocal de la expresión de las proteínas heterólogas VP2 y VP6 y de la proteína viral N, producidas por el virus rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6 en cultivo celular. Células LR7 se infectaron con el virus rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6 a una moi de 1. Las células se fijaron a las 22 horas y se realizó una inmunofluorescencia con el anticuerpo monoclonal anti-TGEV y suero policlonal anti-rotavirus. Se realizó el revelado con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína y un anticuerpo anti-IgG de cabra marcado con Cy5, respectivamente.

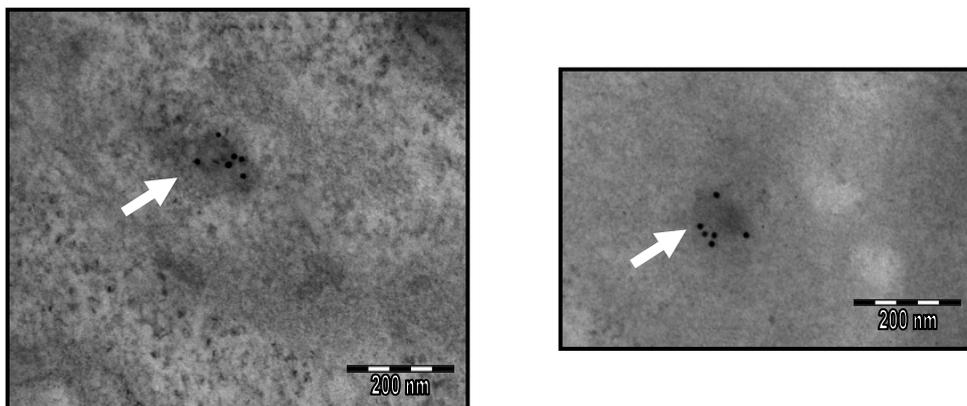


Figura 4.21. Estudio de la formación de VLPs mediante inmunomicroscopía electrónica en cultivos celulares infectados por el virus rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6. Cultivos de células LR7 se infectaron con el virus rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6, se fijaron a las 8 hpi y se prepararon para microscopía electrónica. Se realizó un marcaje con el anticuerpo primario anti-VP6 y se reveló con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con oro coloidal (10 nm). Agregados de partículas de oro coloidal se observaron en el citoplasma celular en torno a zonas electrodensas (Flechas blancas).

4.6. Obtención de un clon estable de los virus recombinantes

Se realizaron rondas de plaqueo para aislar un clon del virus que expresara establemente las proteínas heterólogas (Figura 4.22). Los clones se aislaron por el método de dilución límite en placas de 96 pocillos. Este método se escogió por dos motivos: primero, por la dificultad del virus de formar calvas en placas con agar y segundo, porque este método permitía obtener mayor número de clones. Los clones que producían las proteínas heterólogas se seleccionaron. Para ello, la presencia del gen en el genoma viral se confirmó mediante extracción de ARN y RT-PCR, y después la expresión de la proteína heteróloga se comprobó por inmunofluorescencia indirecta.

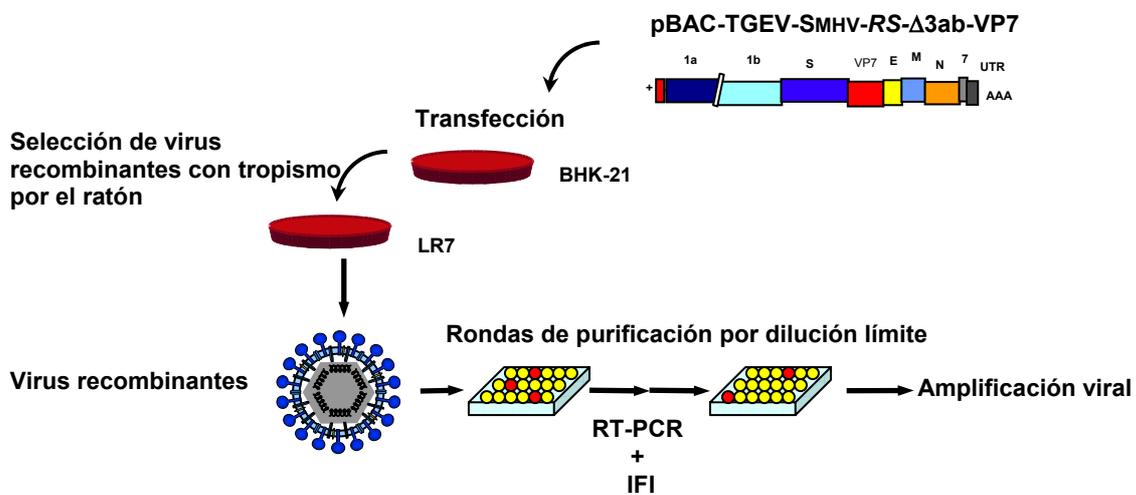
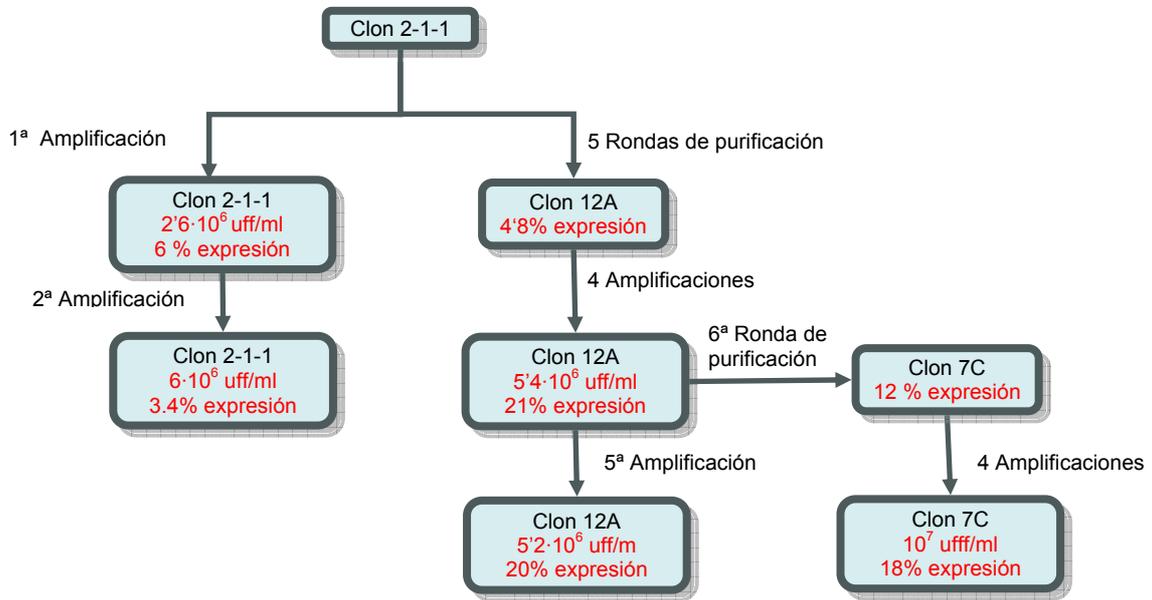


Figura 4.22. Esquema de la purificación de clones de los virus recombinantes que expresaban proteínas de rotavirus a partir del ADNc infeccioso basado en TGEV.

En el caso del virus rTGEV_{S-MHV-VP7}, se realizaron cinco rondas de selección debido a los bajos niveles de expresión de la proteína VP7. Finalmente, se obtuvo un clon estable con una expresión del 20% (Figura 4.23 A). Para asegurar la estabilidad del clon se realizaron cinco amplificaciones y una nueva ronda de plaqueo, confirmando por inmunofluorescencia que el nivel de expresión se mantenía constante.

En el caso del virus rTGEV_{S-MHV-VP2/VP6}, en la cuarta ronda de plaqueo se obtuvo un clon con una expresión de la proteína VP6 del 5%. Pero al amplificar el clon la expresión se redujo por debajo del 1% (Figura 4.23 B).

A



B

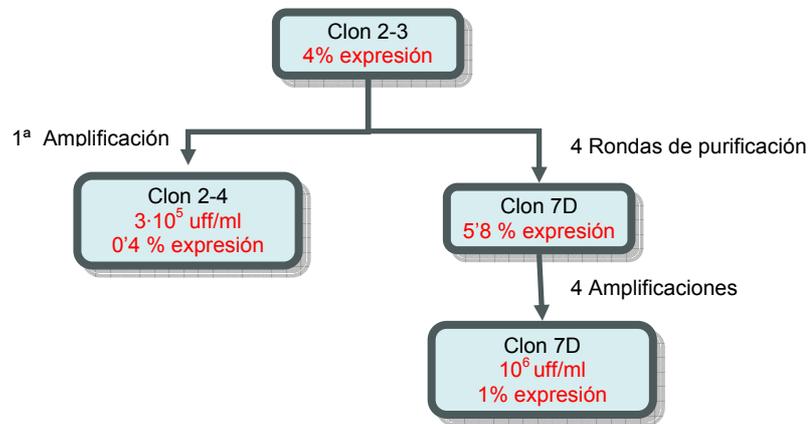


Figura 4.23. Esquema de la obtención de clones y amplificadas de los vectores virales. En cada ronda de purificación o amplificación se indica, si procede, el clon obtenido, el título viral alcanzado y el porcentaje de expresión de las proteínas heterólogas. **A.** Virus rTGEV_{S-MHV}-VP7. **B.** Virus rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6.

4.7. Replicación “in vivo” del virus rTGEV_{S-MHV}

Dos grupos de ratones se inocularon para comprobar la capacidad infectiva en el modelo animal de ratón del virus con tropismo modificado. Un grupo de ocho ratones Balb/c y otro grupo de doce ratones STAT1^{-/-} (con la inmunidad comprometida por la deficiencia en la proteína STAT1), se inocularon con el virus rTGEV_{S-MHV} por la vía combinada intragástrica-intranasal. La dosis viral fue de 2×10^6 uff/ratón del virus murinizado. Después de cada inoculación dos ratones se sacrificaron en los días indicados en las Tablas 4.1 y 4.2, y se extrajeron órganos (bazo, hígado, intestino y pulmón) y suero. El ARN total se extrajo y la presencia de ARN subgenómico viral se comprobó mediante reacción de RT-PCR con los cebadores Leader15 y TN224. Se utilizó un control de la extracción de ARN para cada muestra de órganos empleando los cebadores GAPDH-F y GAPDH-R, que amplifican un fragmento de un gen constitutivo de ratón (Figura 4.24). El ARN subgenómico viral se detectó en varios órganos en ambas líneas de ratones (Tabla 4.1 y Tabla 4.2). En los ratones Balb/c el ARN viral se encontró en intestino, hígado y bazo hasta los 4 días post-inoculación, mientras que en ratones STAT1^{-/-} el ARN viral se detectó en los mismos órganos, pero hasta 6 días post-inoculación en intestino delgado y grueso. La presencia de virus viable se confirmó mediante el aislamiento de virus en cultivos celulares.

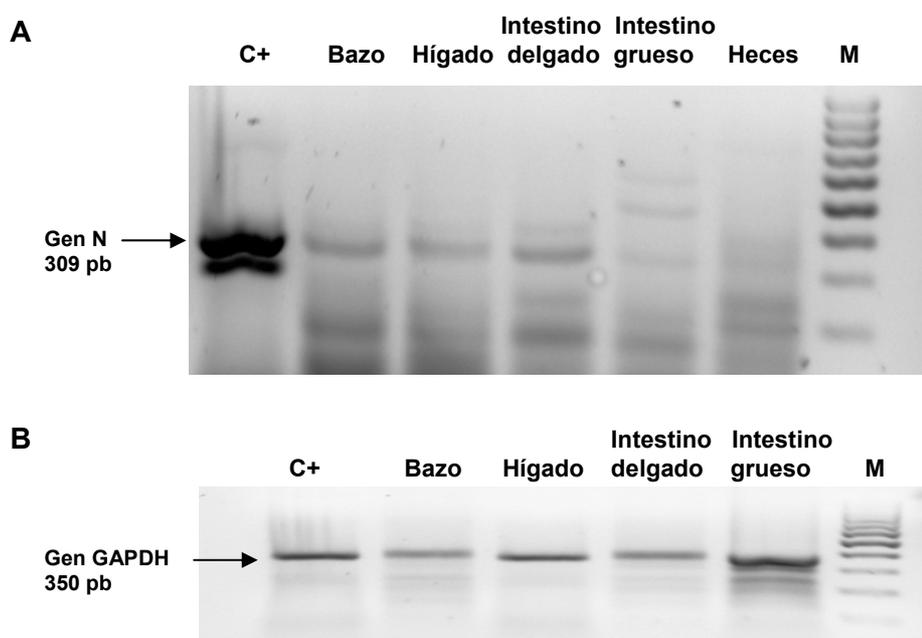


Figura 4.24. Detección de ARN viral y celular por RT-PCR en el macerado de órganos de ratones STAT1^{-/-} inoculados con el virus rTGEV_{S-MHV} el tercer día post-inoculación. Un

grupo de 12 ratones STAT1^{-/-} se inocularon con el virus rTGEV_{S-MHV} y se sacrificaron durante los 6 días siguientes. Se extrajeron órganos y se maceraron para extraer el ARN total. Por último, se realizó una reacción de RT-PCR con cebadores específicos. Se muestran los resultados del tercer día post-inoculación. **A.** Muestras analizadas con los cebadores Leader15 y TN224 (amplifican 309 pb del gen N de TGEV) para comprobar la presencia de ARN subgenómico viral. **B.** Control de la extracción de ARN de órganos utilizando los cebadores GAPDH-F y GAPDH-R que amplifican 350 pb del gen constitutivo de la enzima 3-gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa de ratón.

	Bazo	Hígado	Intestino	Pulmón	Suero	Heces
Día 1	+ débil	-	-	-	+	+ débil
Día 2	-	+	+	-	+ débil	+ débil
Día 3	-	+ débil	-	-	+ débil	-
Día 4	-	+ débil	-	-	-	-

Tabla 4.1. Detección de ARN viral por RT-PCR en el macerado de órganos de ratones Balb/c inoculados con rTGEV_{S-MHV}. Un grupo de 8 ratones Balb/c se inocularon con el virus rTGEV_{S-MHV} y 2 ratones por día se sacrificaron durante los 4 días siguientes. Los órganos se extrajeron y del macerado se realizó la extracción de ARN y RT-PCR con cebadores específicos.

	Bazo	Hígado	Intestino delgado	Intestino grueso	Sangre total y suero	Heces
Día 1	-	-	+ débil	+ débil	-	+ débil
Día 2	+	+	+	+ débil	-	+ débil
Día 3	+	+	+	+ débil	-	-
Día 4	+	-	+	+ débil		
Día 5	+ débil	-	+	+ débil		
Día 6	-	-	+ débil	+ débil		

Tabla 4.2. Detección de ARN viral por RT-PCR del extracto de órganos de ratones STAT1^{-/-} inoculados con rTGEV_{S-MHV}. Un grupo de 12 ratones STAT1^{-/-} se inocularon con el virus rTGEV_{S-MHV} y 2 ratones por día se sacrificaron durante los 6 días siguientes. Los órganos se extrajeron y del macerado se realizó la extracción de ARN y RT-PCR con cebadores específicos.

Dos ratones STAT1^{-/-} se inocularon por vía intragástrica-intranasal con el virus rTGEV_{S-MHV} para verificar que la presencia de ARN viral en los órganos se correspondía con la presencia de virus viable que replicaba en dichos órganos. Los ratones se sacrificaron a las 48 y 72 horas y se extrajeron fragmentos de intestino, bazo, hígado y pulmón. La replicación viral se comprobó a nivel del intestino delgado mediante inmunohistoquímica en cortes histológicos. Los resultados mostraron replicación viral a nivel de la submucosa intestinal (Figura 4.25).

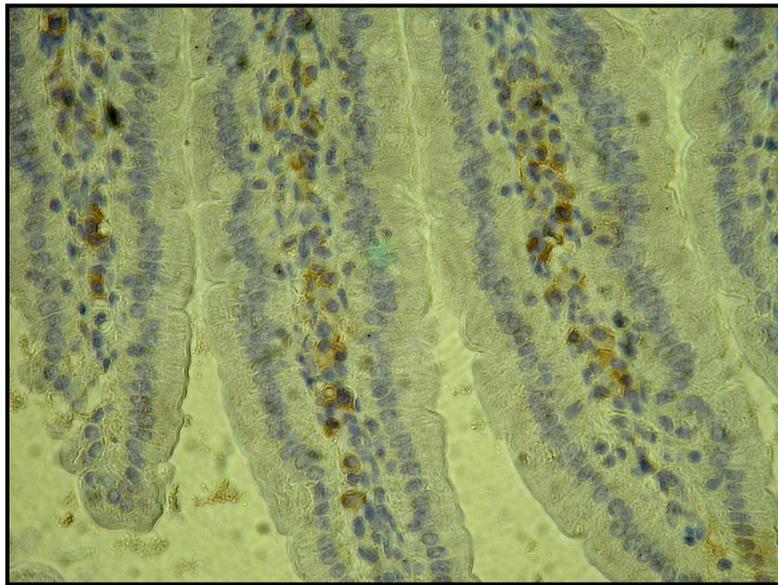


Figura 4.25. Estudio de la replicación viral en intestino delgado por inmunohistoquímica en cortes histológicos de ratones STAT1^{-/-} inoculados con el virus rTGEV_{S-MHV} a las 48 horas post-infección. Cortes de intestino delgado 20X. Los cortes se incubaron con un anticuerpo monoclonal frente a la proteína N de TGEV y se revelaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con HRP (EnVisionTM+ System, HRP, DAKO). Por último, se realizó una tinción de contraste con hematoxilina de Harris.

Posteriormente, se verificó la presencia de antígeno vírico mediante inmunofluorescencia sobre cortes histológicos de intestino, bazo, hígado y pulmón (Figura 4.26), confirmándose que el virus replica en estos órganos.

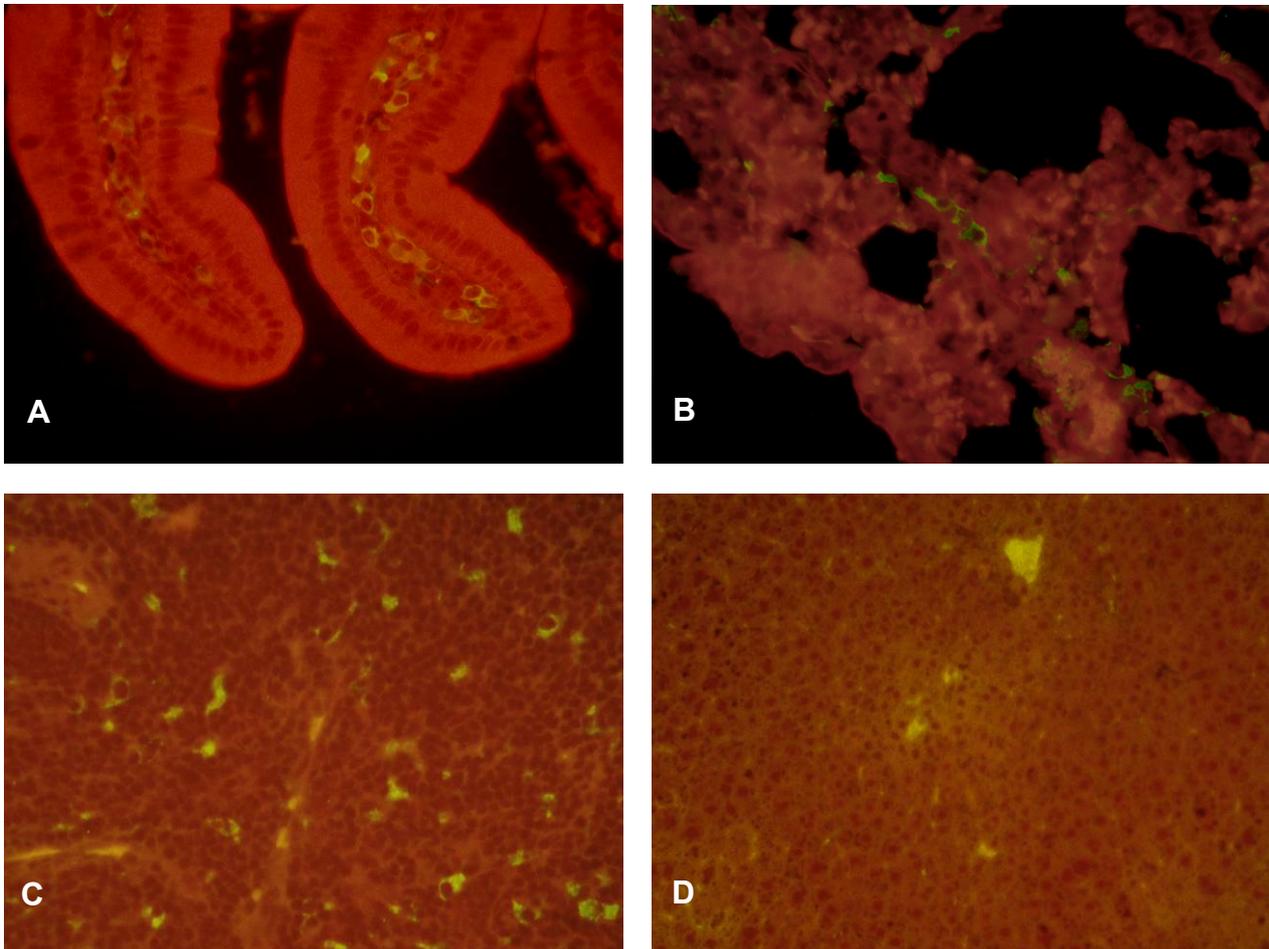


Figura 4.26. Detección del virus rTGEV_{S-MHV} por inmunofluorescencia en cortes histológicos de órganos de ratones STAT1^{-/-} inoculados con el virus rTGEV_{S-MHV} a las 48 horas post-infección. A. Cortes de intestino delgado. **B.** Corte de pulmón. **C.** Corte de bazo. **D.** Corte de hígado. Los cortes se incubaron con un anticuerpo monoclonal frente a la proteína N de TGEV y se revelaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína.

4.8. Estudios de inmunización en ratones

Una vez comprobado que el virus con tropismo modificado expresaba proteínas de rotavirus e infectaba ratones, se realizaron los estudios de inmunización en el modelo animal del ratón. Dichos estudios se basaron en la aplicación del vector rTGEV_{S-MHV}-VP7, dado que se consiguió un clon que expresaba establemente la proteína de rotavirus (Clon 12A). Los estudios se realizaron en ratones Balb/c y STAT1^{-/-}, aunque en éstos últimos el desarrollo de una respuesta inmunitaria está dificultado, como se ha comprobado en este trabajo.

4.8.1. Estudio de la respuesta inmunitaria humoral

Varios grupos de ratones Balb/c se inocularon con el virus rTGEV_{S-MHV}-VP7, para comprobar la respuesta inmunitaria humoral frente al virus vector y la proteína VP7 de rotavirus. Se inocularon tres dosis del virus a intervalos de 15 días (Figura 3.2 del apartado de Material y métodos). Un grupo control de 5 ratones Balb/c se inoculó intragástricamente con el virus rTGEV_{S-MHV} (2×10^6 uff/ratón) y tres grupos de 5 ratones Balb/c se inocularon con el virus rTGEV_{S-MHV}-VP7, que expresaba establemente la proteína VP7 (clon 12A) (10^6 uff/ratón) por tres vías (vía intragástrica, intragástrica-intranasal e intraperitoneal). Por último, un grupo de 5 ratones STAT1^{-/-} se inoculó intragástricamente con el virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 (10^6 uff/ratón).

4.8.1.1. Anticuerpos anti-TGEV

Se analizó la respuesta inmunitaria específica de anticuerpos frente al virus vector con tropismo modificado. Se observó una respuesta estadísticamente significativa de anticuerpos séricos de clase IgG anti-TGEV a títulos altos en los ratones inoculados por las vías intragástrica-intranasal (2.500) e intraperitoneal (2.500), y a títulos menores en los ratones inoculados solamente por la vía intragástrica (500) (Figura 4.27).

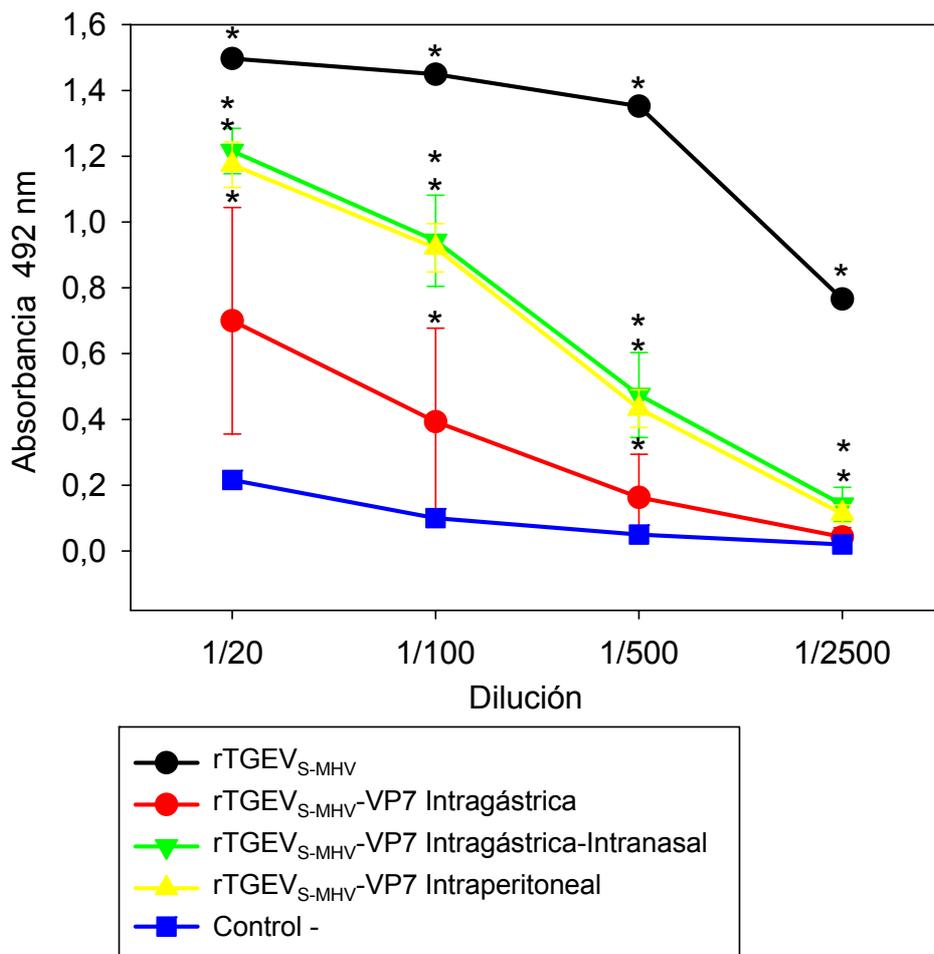


Figura 4.27. Niveles de anticuerpos IgG anti-TGEV en sueros de ratones Balb/c inoculados por diferentes vías (intragástrica, intragástrica-intranasal e intraperitoneal) con tres dosis de rTGEV_{S-MHV}-VP7 y rTGEV_{S-MHV}. El símbolo * indica una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el grupo inoculado y el grupo control.

La inducción de una respuesta inmunitaria en mucosas por el virus vector también se analizó. Un grupo de 6 ratones se inocularon intragástricamente con el virus rTGEV_{S-MHV} para comprobar la producción de anticuerpos de clase IgA específicos anti-TGEV en el suero y en el contenido intestinal (Figura 4.28). En el suero se observó una producción significativa de anticuerpos IgA específicos a partir de la segunda inoculación (Figura 4.28 A). En el contenido intestinal se observó la producción de anticuerpos en dos de los seis ratones analizados (Figura 4.28 B).

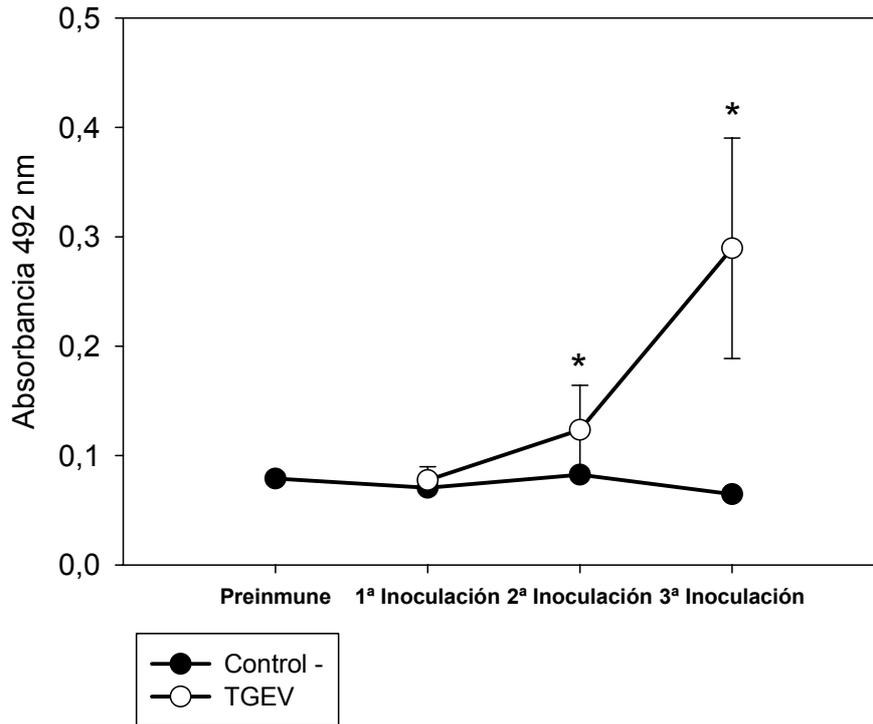
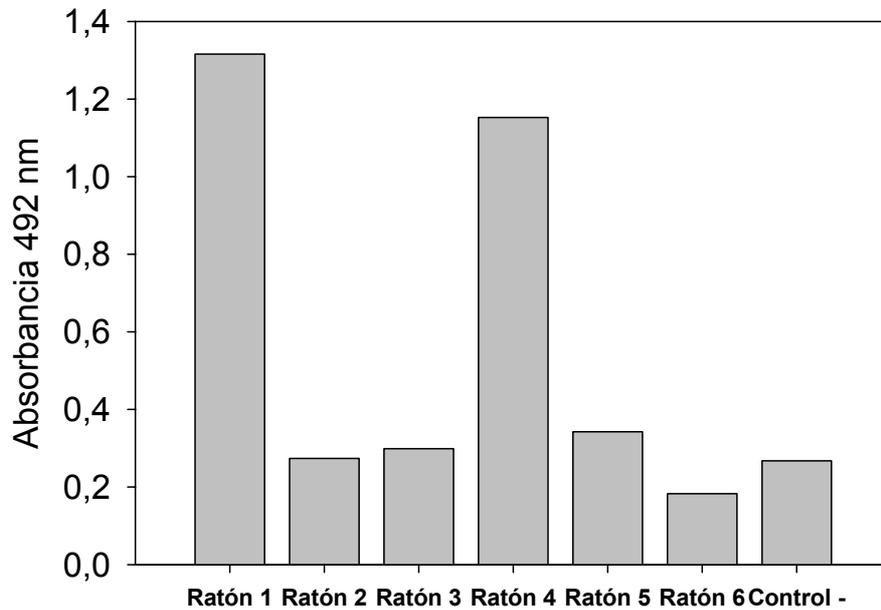
A**B**

Figura 4.28. Niveles de anticuerpos IgA anti-TGEV en sueros de ratones Balb/c inoculados por vía intragástrica-intranasal tres veces con rTGEV_{S-MHV} y con el lisado del cultivo de células LR7 (control negativo). A. Niveles de anticuerpos IgA en el suero en la dilución 1/100. B. Valores de absorbancia en ELISA para la detección de anticuerpos IgA en el contenido intestinal diluido a 1/2. El símbolo * indica una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el grupo inoculado y el grupo control.

4.8.1.2. Anticuerpos anti-rotavirus

La producción de anticuerpos en heces de clase IgA específicas de rotavirus (coproanticuerpos) se evaluó, pero no se observó su presencia (Figura 4.29).

La producción de anticuerpos IgG séricos específicos frente a rotavirus en ratones Balb/c, se analizó probando diferentes vías de inoculación (Figura 4.30). La respuesta de anticuerpos se evaluó con respecto a la de un grupo inoculado con el vector rTGEV_{S-MHV} (control negativo). Una respuesta significativa de anticuerpos por vía intraperitoneal a títulos de 1/100, se obtuvo desde la primera inoculación, siendo una respuesta notable desde la segunda inoculación. No se observaron diferencias respecto del grupo control por las vías intragástrica e intragástrica e intranasal combinadas.

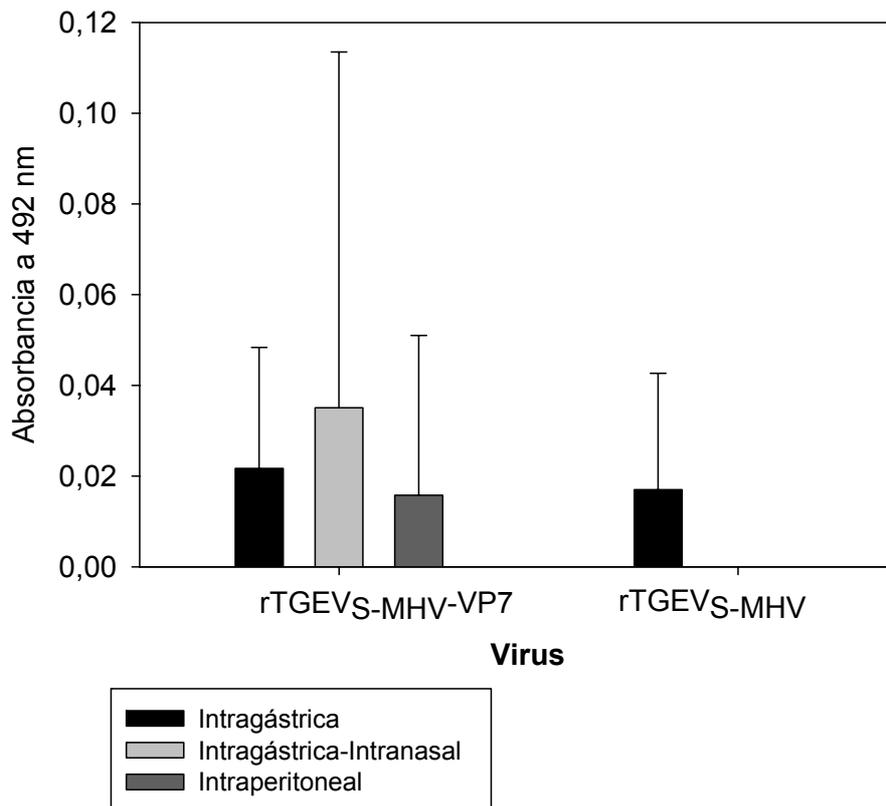


Figura 4.29. Niveles de anticuerpos IgA anti-rotavirus en la dilución 1/2 de heces de ratones inoculados tres veces con el vector viral rTGEV_{S-MHV-VP7} por diferentes vías, y por el vector rTGEV_{S-MHV} (control negativo) por la vía intragástrica. No se hallaron diferencias significativas entre el grupo inoculado con rTGEV_{S-MHV} y los grupos inoculados con rTGEV_{S-MHV-VP7}.

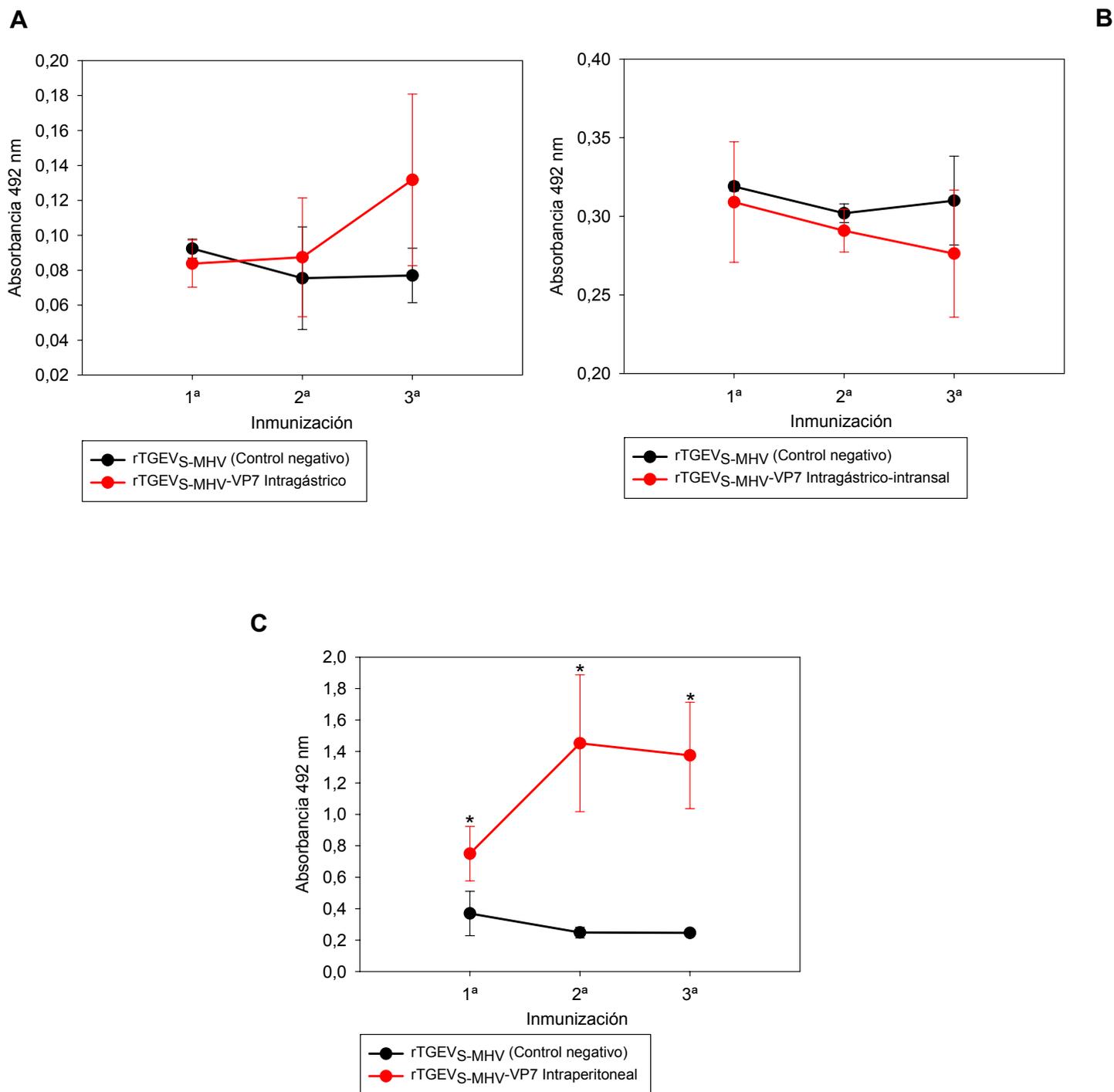


Figura 4.30. Niveles de anticuerpos IgG anti-rotavirus en la dilución 1/100 de sueros de ratones Balb/c inoculados por tres vías con tres dosis de rTGEV_S-MHV-VP7 y rTGEV_S-MHV (control negativo). A. Vía intragástrica. B. Vía intragástrico-intranasal. C. Vía intraperitoneal. El símbolo * indica una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el grupo inoculado y el grupo control.

Una vez comprobada la producción de anticuerpos específicos anti-rotavirus, se evaluó la capacidad neutralizante de los mismos (Figura 4.31). Se observó diferencia entre el grupo inoculado intraperitonealmente y el grupo preinmune, que aunque no fue estadísticamente significativa se encuentra cerca del nivel de confianza del 5% ($p = 0.079$).

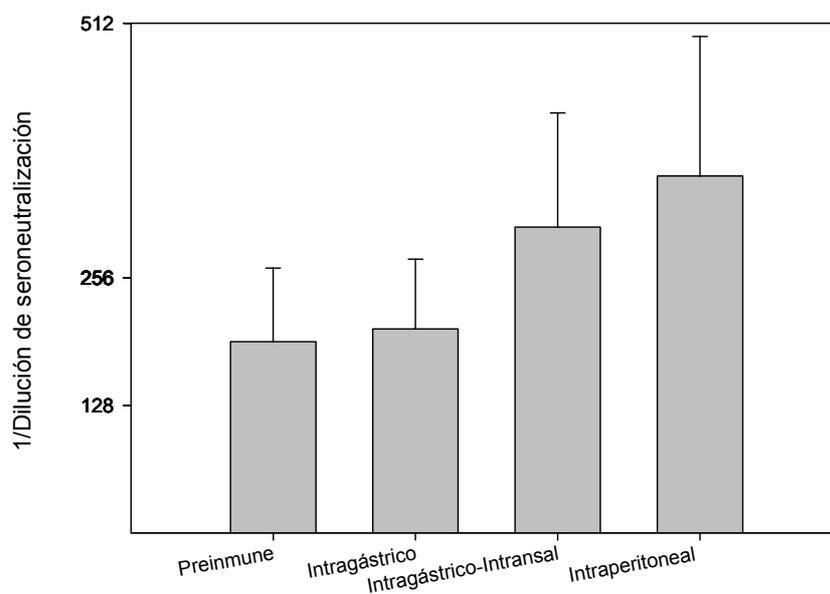


Figura 4.31. Niveles de anticuerpos neutralizantes IgG séricos anti-rotavirus en sueros de ratones Balb/c inmunizados con tres dosis del vector rTGEV_{s-MHV-VP7}. Los resultados se indican como la inversa de la dilución de los sueros que inhibe a más del 50% de focos infectivos de rotavirus por inmunoperoxidasa. No existen diferencias significativas entre los grupos inoculados con respecto a los sueros de ratones preinmunes, aunque la diferencia con el grupo intraperitoneal se encuentra cerca del nivel de confianza del 5% ($p = 0.079$).

Después de estos resultados, se evaluó si los ratones STAT1^{-/-} eran capaces de producir una mayor respuesta de anticuerpos anti-rotavirus por vía intragástrica, debido a que la deficiencia de la proteína STAT1 provoca una mayor persistencia de la infección viral (resultados de las Tablas 4.1 y 4.2). La mayor persistencia de la replicación viral no produjo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de anticuerpos IgG séricos ni IgA fecales (Figura 4.31).

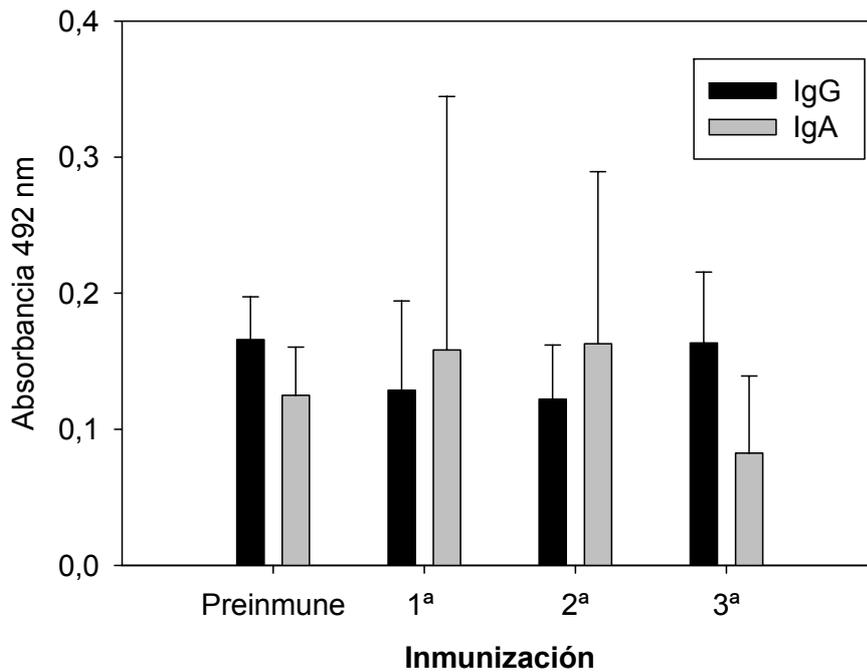


Figura 4.31. Niveles de anticuerpos IgG séricos e IgA fecales anti-rotavirus en sueros (dilución 1/25) y en heces (dilución 1/2) de ratones STAT1^{-/-} inoculados con tres dosis del vector rTGEV_{S-MHV}-VP7. No existen diferencias significativas entre los grupos inoculados con respecto a los sueros de ratones preinmunes.

4.8.2. Producción de citocinas

El estudio de la producción de citocinas se realizó en el suero y en los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos estimulados “in vitro” de ratones Balb/c inoculados. Un grupo de 6 ratones y otro grupo control de 3 ratones se inocularon con el virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 y con el virus rTGEV_{S-MHV}, respectivamente (Figura 3.3 del apartado de Material y métodos).

En el suero de los ratones inoculados con rTGEV_{S-MHV}-VP7 (Figura 4.32 A), se observó un aumento estadísticamente significativo de los niveles del factor de crecimiento GM-CSF (41 pg/ml), a las 48 horas post-infección. También aumentaron los niveles de IL-2 (30 pg/ml) e IL-5 (2 pg/ml) (sin significación estadística). Después de la última inoculación, se observó un resultado similar en el suero de ratones inoculados con rTGEV_{S-MHV}-VP7, excepto que no se detectó el incremento de IL-5. Igualmente, se produjo GM-CSF (47 pg/ml) ($p > 0,05$) en el suero de los ratones inoculados con rTGEV_{S-MHV}. En cambio, se observaron niveles bajos de IFN- γ (6 pg/ml) y de IL-10 (2 pg/ml) (Figura 4.32 B) (sin significación estadística).

En los cultivos de esplenocitos el día 2 después de la estimulación (Figura 4.33) con el virus rTGEV_{S-MHV}, se produjo un incremento de los niveles del factor GM-CSF para ambos virus (concentraciones de 73 pg/ml y 61 pg/ml, respectivamente), mientras que la estimulación con RF aumentó significativamente los niveles de este factor sólo para los animales inoculados con rTGEV_{S-MHV} (62 pg/ml) ($p < 0.05$ en todos los casos). Este vector también causó un incremento de IL-2 (51 pg/ml) y de IFN- γ (18 pg/ml) en esplenocitos estimulados con él mismo ($p > 0.05$ en ambos casos). Se detectaron niveles bajos de IFN- γ (5 pg/ml) y TNF- α (2 pg/ml) en animales inoculados con el virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 y estimulados con rTGEV_{S-MHV} (sin significación estadística) (Figura 4.33 B).

En los cultivos de esplenocitos el día 5 post-estimulación (Figura 4.34), se produjo un aumento estadísticamente significativo de IL-10 (108 pg/ml) para el virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 estimulado con rTGEV_{S-MHV}, y para el virus rTGEV_{S-MHV} estimulado con rTGEV_{S-MHV} (300 pg/ml) y RF (63 pg/ml) ($p > 0.05$ en el caso del virus rTGEV_{S-MHV}). También se produjo un incremento del factor GM-CSF para ambos virus (concentraciones de 52 pg/ml para el virus rTGEV_{S-MHV} y 21 pg/ml para rotavirus RF), y de bajos niveles de IFN- γ (22 pg/ml) para el virus rTGEV_{S-MHV} (el aumento de estas dos citocinas no mostró diferencias significativas) (Figura 4.34 B).

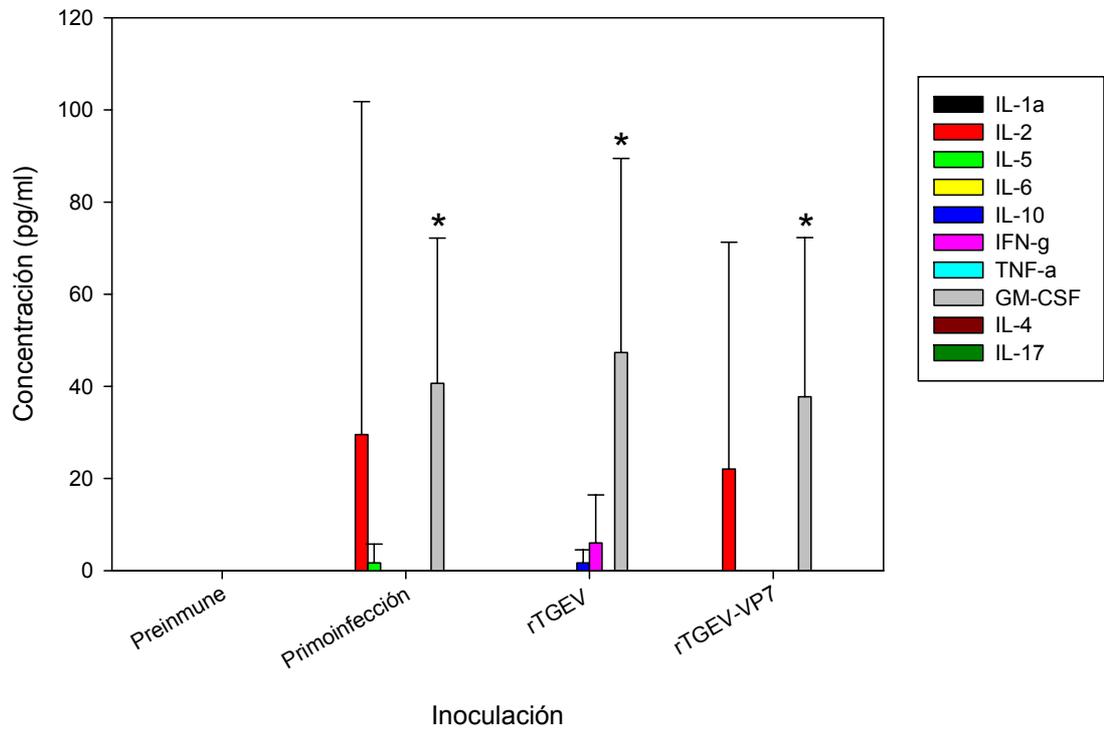
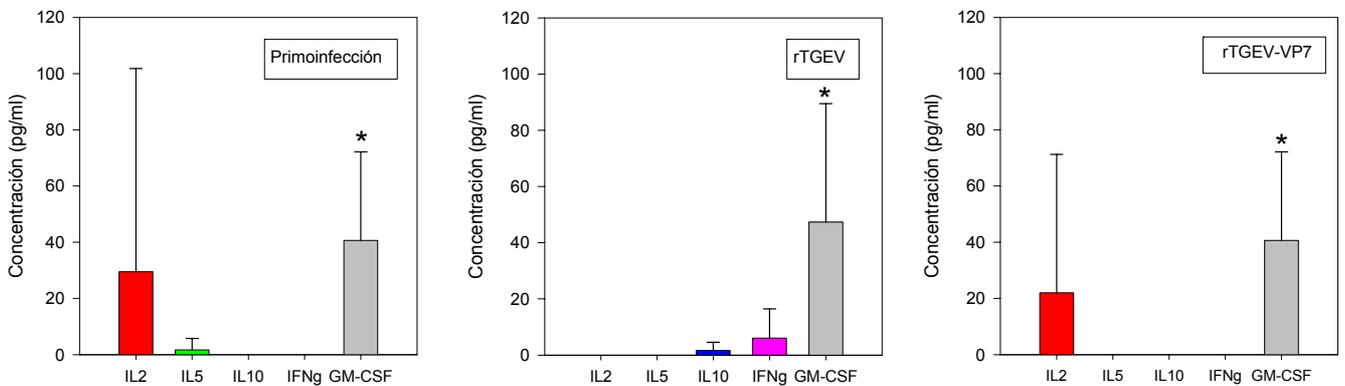
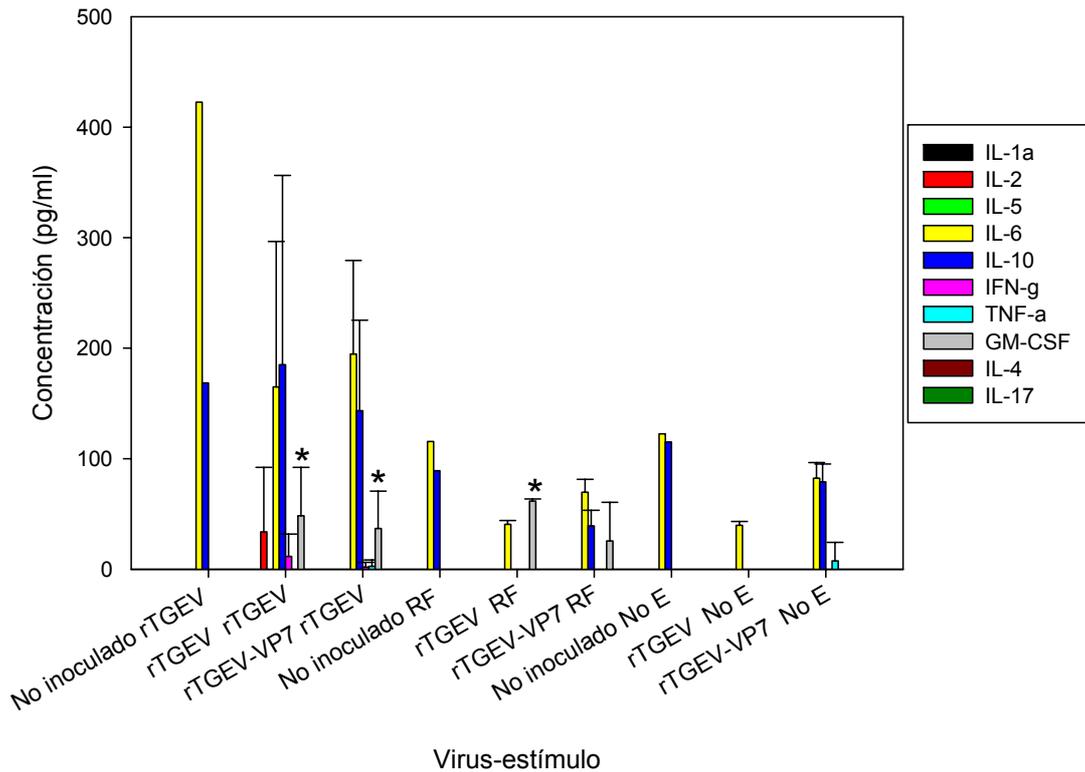
A**B**

Figura 4.32. Mediciones de las concentraciones de citocinas en el suero de ratones Balb/c inoculados con los vectores virales rTGEV_{S-MHV} y rTGEV_{S-MHV-VP7}. La concentración de 10 citocinas se estudió en el suero de ratones Balb/c 2 días después de la primera inoculación (primoinfección) y 10 días después de la última inoculación. **A.** Niveles de todas las citocinas estudiadas. **B.** Citocinas detectadas para cada grupo de estudio. El símbolo * indica una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los sueros preinmunes y los grupos inoculados.

A



B

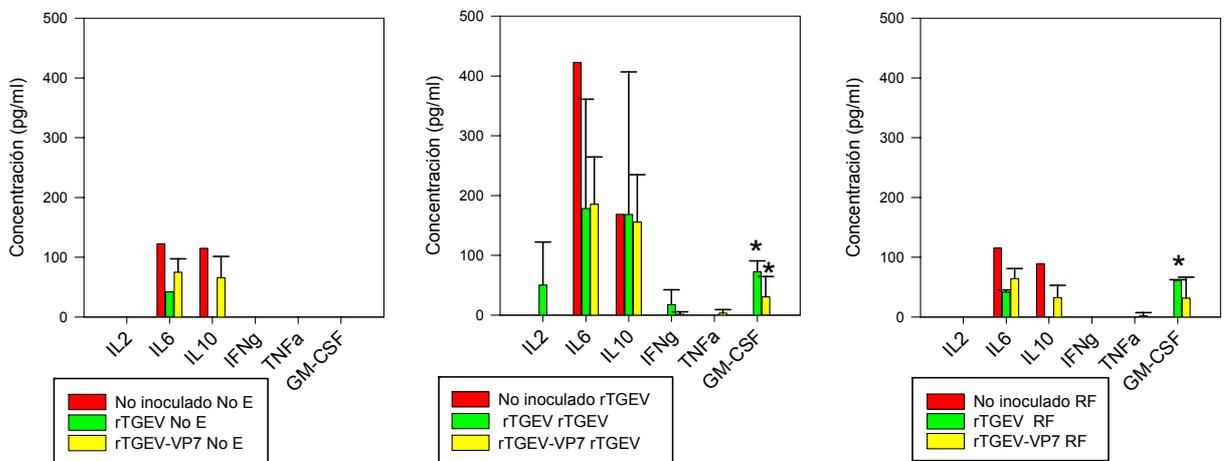
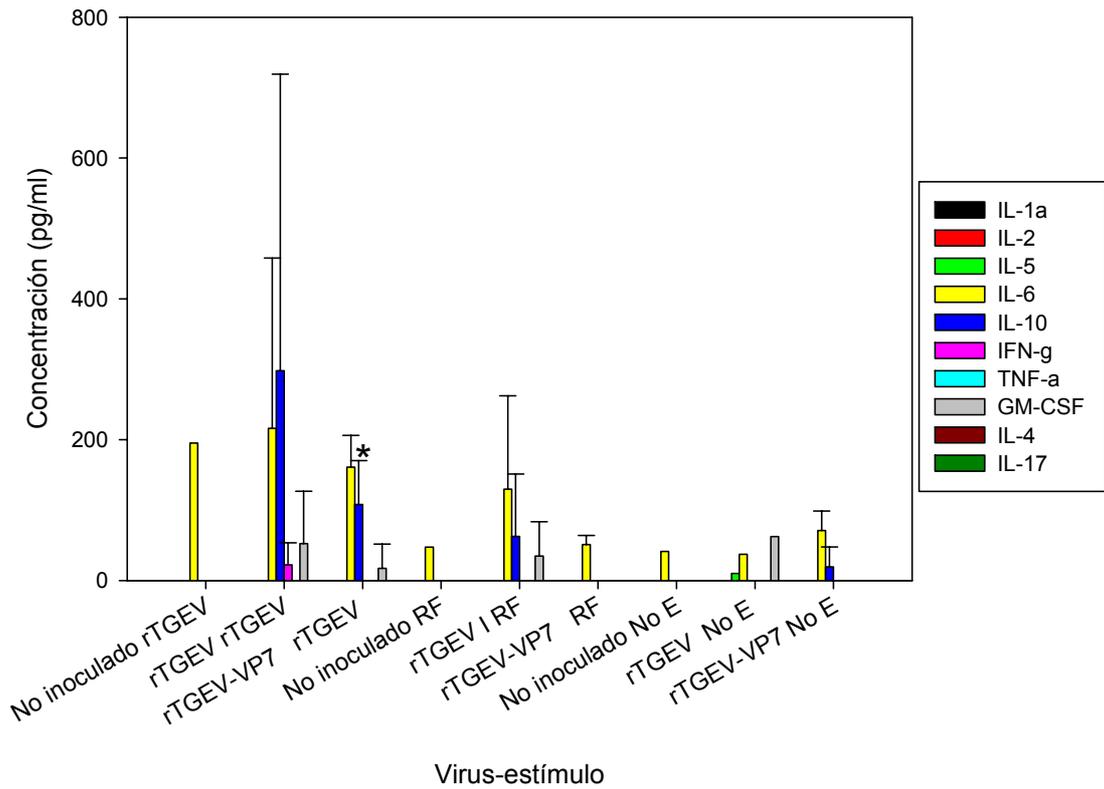


Figura 4.33. Mediciones de las concentraciones de citocinas en el sobrenadante del cultivo de esplenocitos (día 2 post-estimulación) de ratones Balb/c inoculados con los vectores virales rTGEV_{S-MHV} y rTGEV_{S-MHV-VP7}. Citocinas del cultivo de esplenocitos de ratones Balb/c. Los cultivos se estimularon con el virus rTGEV_{S-MHV} (rTGEV) o con la cepa RF de rotavirus (RF) y un control sin estimular (No E), y se recogieron alícuotas a los 2 días post-estimulación. **A.** Resultados totales. **B.** Resultados de cada virus inoculado y del grupo no inoculado. El símbolo * indica una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo no inoculado con los grupos inoculados.

A



B

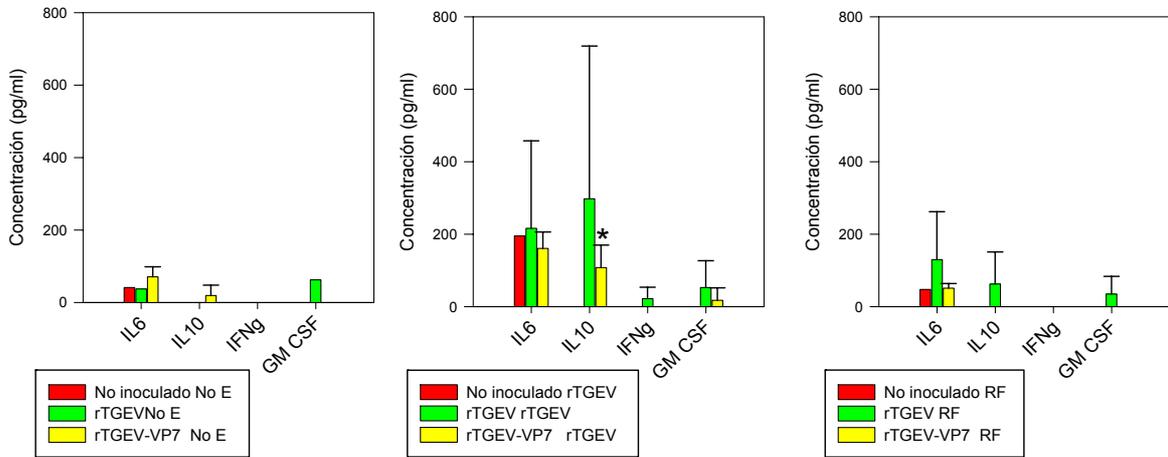


Figura 4.34. Mediciones de las concentraciones de citocinas en el sobrenadante del cultivo de esplenocitos (día 5 post-estimulación) de ratones Balb/c inoculados con los vectores virales rTGEV_{S-MHV} y rTGEV_{S-MHV}-VP7. Citocinas del cultivo celular de esplenocitos de ratones Balb/c. Los cultivos se estimularon con el virus rTGEV_{S-MHV} (rTGEV) o con la cepa RF de rotavirus (RF) y un control sin estimular (No E), y se recogieron alícuotas a los 5 días post-estimulación. **A.** Resultados totales. **B.** Resultados según el virus inoculado. El símbolo * indica una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo no inoculado con los grupos inoculados.

4.8.3. Protección en el modelo lactante frente a infecciones por rotavirus

La protección conferida por la lactancia frente a la diarrea por rotavirus, se evaluó en el modelo de ratón lactante con crías nacidas de hembras inoculadas con el vector rTGEV_{S-MHV}-VP7. Dos hembras inmunizadas con tres dosis del virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 por vía intraperitoneal y dos hembras por vía intragástrica-intranasal, se cruzaron con machos para obtener camadas. Dos grupos de recién nacidos se inocularon con las cepas de rotavirus RF (homotípico) y EDIM (heterotípico) (Figura 4.35). Se observó una protección del 62% frente a la diarrea causada por rotavirus de las crías inoculadas con la cepa RF que habían nacido de madres inoculadas con rTGEV_{S-MHV}-VP7 intraperitonealmente, mientras que sólo el 13% de las crías nacidas de madres inoculadas intragástricamente no sufrieron diarrea. En cambio, en el desafío con el virus EDIM, sólo un 18% de los ratones lactantes nacidos de madres inoculadas intraperitonealmente con el vector rTGEV_{S-MHV}-VP7, no sufrió diarrea.

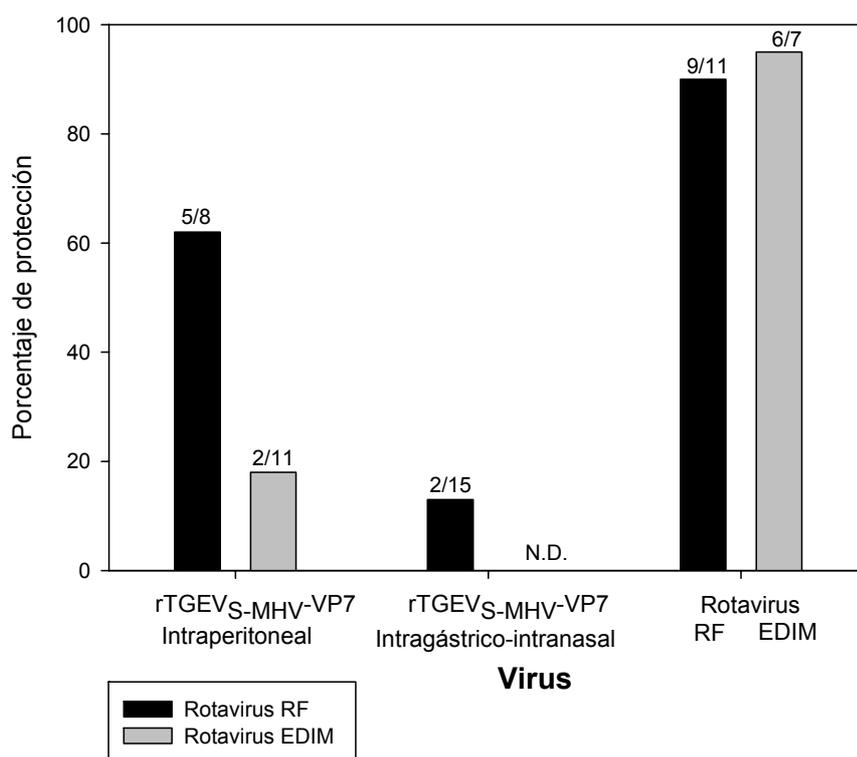


Figura 4.35. Protección conferida frente a la diarrea por rotavirus en ratones lactantes nacidos de madres inoculadas con el virus rTGEV_{S-MHV}-VP7. Se muestra el porcentaje de protección de ratones lactantes (porcentaje de ratones que no sufrieron diarrea tras ser inoculados con las cepas de rotavirus RF o EDIM). Encima de cada barra se indica el número de ratones que no sufrieron diarrea respecto al total de inoculados. N.D. no determinado.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha comprobado la capacidad del coronavirus TGEV para incorporar en su genoma secuencias heterólogas y expresarlas con el objetivo de inmunizar frente a rotavirus. Este estudio constituye una estrategia nueva frente a los métodos tradicionales de producción de vacunas mediante la selección de cepas de rotavirus atenuadas de origen humano o animal. Además, el estudio plantea la idoneidad de este sistema de expresión viral para desarrollar vacunas frente a otros patógenos humanos o para su uso veterinario. Por ejemplo, el equipo del Dr. Enjuanes ha aplicado este vector viral para desarrollar una vacuna frente al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV).

En primer lugar, se comprobó la capacidad del virus TGEV para integrar en su genoma secuencias exógenas procedentes de otro virus y su capacidad de expresar estas proteínas en cultivo celular sin interrumpir el ciclo replicativo de TGEV. Una vez expresadas las proteínas de rotavirus, se modificó el tropismo celular y de especie para adaptarlo al modelo en ratón, porque es un modelo animal muy estudiado y de fácil manejo, para el que se dispone de numerosos reactivos inmunológicos, “microarrays”, etc. La correcta expresión de las proteínas heterólogas se comprobó de nuevo en cultivos de células de ratón, y se analizó la replicación de este nuevo vector en el ratón. Por último, se inmunizaron ratones para comprobar la eficacia de estos vectores en promover una respuesta inmunitaria frente a las proteínas heterólogas y frente al propio vector.

5.1. Expresión de genes heterólogos utilizando vectores basados en genomas de coronavirus con tropismo porcino

En las últimas décadas, las técnicas de ingeniería genética han permitido manipular los genomas virales hasta conseguir la inserción de secuencias heterólogas. En los últimos años, la modificación de genomas de virus de ARN ha sido sin duda la mayor evolución en este campo. Desde hace unos años, se ha conseguido insertar y expresar genes heterólogos en coronavirus (Curtis et al., 2002; de Haan et al., 2003; Fischer et al., 1998; Sarma et al., 2002; Sola et al., 2003). Este hecho los ha hecho atractivos para el desarrollo de vacunas vivas modificadas genéticamente, o para su aplicación en terapia génica utilizando variantes virales que producen infecciones persistentes.

En coronavirus, se ha demostrado que los niveles de expresión de genes heterólogos están limitados por la localización del inserto en el genoma viral y por la propia naturaleza del inserto (de Haan et al., 2003; Sola et al., 2003). En el sistema de expresión del MHV se ha descrito que existe inestabilidad en insertos de dos genes trazadores (la luciferasa de luciérnaga y la luciferasa de renilla) si estos se sitúan entre los genes E y M. Por el contrario, estos genes sí son estables cuando se insertan hacia el extremo 5' del genoma en la posición que ocupan los genes no esenciales (de Haan et al., 2005). En estos trabajos, se muestra la pérdida de parte o de la totalidad de los genes heterólogos de los virus recombinantes al replicar en cultivos celulares. La causa es la cercanía de estos genes al extremo 3' del genoma. Los autores también consideran importante la naturaleza del inserto, porque hallaron diferencias entre los genes de las dos variantes de luciferasa empleadas. Un avance importante para incorporar genes exógenos en coronavirus, ha sido el estudio de los genes no esenciales del genoma, ya que éstos pueden ser eliminados, siendo dianas idóneas para la inserción de los genes heterólogos dentro del genoma. En TGEV, los genes 3a y 3b codifican proteínas virales cuya función no es esencial en la replicación o la infectividad del virus, y por tanto, pueden ser eliminados "in vitro" (Ortego et al., 2002; Sola et al., 2003). El gen de la proteína GFP se ha clonado en la posición que ocupaban los genes 3a y 3b en el genoma de TGEV, consiguiéndose una buena producción de esta proteína (Sola et al., 2003).

La expresión de genes heterólogos en coronavirus se ve facilitada por su singular mecanismo de transcripción, que permite la expresión de estos genes si son insertados después de las secuencias TRS, como se ha demostrado previamente para diferentes proteínas trazadoras. Además, la nucleocápside de TGEV posee una estructura helicoidal, a diferencia del resto de los miembros de la familia, lo que posiblemente reduce las limitaciones debidas al empaquetamiento viral. Esta conformación de la cápside, no limita de forma notable la expresión de diversos genes de gran tamaño en una sola construcción (Lai y Cavanagh, 1997; Laude et al., 1990).

En este trabajo se ha utilizado el clon infeccioso de ADNc de TGEV para incorporar genes de la cápside de rotavirus reemplazando los genes no esenciales 3a y 3b, mediante técnicas de ingeniería genética. Se desarrolló un vector monocistrónico que expresa la proteína VP7 y un vector bicistrónico con las proteínas VP2 y VP6. Los vectores virales derivados del genoma de TGEV expresaron "in vitro" las proteínas de rotavirus de forma estable durante al menos 5 pases. Además, se ha progresado en la eficacia de la expresión de proteínas heterólogas utilizando vectores basados en el

coronavirus TGEV (Alonso et al., 2002; Curtis et al., 2002; Sola et al., 2003), ya que se desarrolló un vector que expresa dos genes heterólogos conjuntamente. Este vector además originó VLPs de rotavirus, gracias al autoensamblaje de las proteínas heterólogas de rotavirus.

El virus rTGEV que expresa la proteína VP7 replicó en cultivos de células ST alcanzando concentraciones similares a las del virus silvestre, mientras que el vector bicistrónico replicó con un orden de magnitud menor, demostrando así que un tamaño de clonación de 4 Kb no altera la capacidad replicativa de este virus.

5.2. Sustitución del tropismo de especie del virus TGEV por el del virus MHV

El hospedador natural del virus TGEV es el cerdo, por lo que el modelo animal porcino es el idóneo para el estudio de la respuesta inmunitaria frente a TGEV y a las proteínas heterólogas que exprese. Sin embargo, este modelo es caro, difícil de manejar y de evaluar, y existe poca literatura científica disponible. Afortunadamente, el tropismo de los coronavirus se puede modificar mediante técnicas de ingeniería genética, por lo que se puede sustituir el tropismo del TGEV y adaptarlo a ratón. El ratón es un modelo animal de fácil manejo, evaluable y ampliamente utilizado. Esta característica de los coronavirus les otorga una ventaja adicional para su aplicación como vacuna humana o de uso veterinario, ya que permite dirigir el tropismo a la especie animal de interés. Esto implica la utilización como vacuna viva de un virus que infecta a animales de otra especie y que, por lo tanto, presenta una atenuación natural en su mecanismo replicativo.

Los coronavirus presentan un tropismo definido a nivel de especie y de tejido. La infección se inicia y se mantiene en el tracto entérico y respiratorio, sin embargo, en algunos casos, la infección viral puede extenderse a otros tejidos y órganos como el hígado, el cerebro, el riñón, el peritoneo o el sistema linfático. La especificidad del tipo celular infectado por coronavirus está definida, mayoritariamente, por la naturaleza y la distribución de los receptores celulares y otras moléculas relacionadas que pueden regular la entrada del virus en la célula. La glicoproteína S es la responsable de la unión a los receptores específicos en la membrana de las células susceptibles. Además, induce fusión de las membranas virales y celulares durante la entrada del virus. Experimentos de intercambio del gen S entre diversas especies de coronavirus (MHV, FIPV, TGEV e IBV) y la aparición de mutaciones puntuales dentro del gen S de diferentes coronavirus (Ballesteros et al., 1997; Rottier et al., 2005; Sanchez et al.,

1999), han confirmado que este gen es un determinante del tropismo viral y también de la patogénesis en coronavirus (Casais et al., 2003; Das Sarma et al., 2000; Navas et al., 2001; Sanchez et al., 1999), aunque no el único (Casais et al., 2003; Ortego et al., 2003).

5.2.1. Modificación “in vitro” del tropismo de TGEV por el de MHV

En este trabajo, se ha reemplazado el tropismo de especie del virus TGEV por el del virus MHV “in vitro” e “in vivo”. El cambio de tropismo se realizó mediante la sustitución del dominio globular de la proteína S del virus TGEV por la porción globular de la proteína S del coronavirus murino MHV, mediante técnicas de ingeniería genética. El resultado fue el ensamblaje de virus TGEV recombinantes que contienen una proteína S quimérica que les permite infectar células de ratón.

El virus MHV-A59 pertenece al género β de la clasificación de los coronavirus. Este género posee una proteína de la espícula (S) de unos 180 KDa, que se procesa de forma diferente a la de los coronavirus del género α , al que pertenece TGEV. La proteína S de MHV es procesada intracelularmente por una enzima similar a una furina (de Haan et al., 2004). La proteólisis genera dos subunidades, S1 y S2, de tamaño similar, que no se mantienen covalentemente unidas y poseen funciones diferentes. El dominio de unión al receptor se localiza en el extremo amino-terminal de la subunidad S1, mientras que el dominio de fusión a membrana se encuentra en la subunidad S2. Estudios estructurales sugieren que la subunidad S1 de MHV constituye la zona globular de la proteína de la espícula, mientras que la subunidad S2 formaría la región con forma de tallo de la misma.

Para obtener virus viables, fue necesario mantener intactos los dominios HR de superenrollamiento (HR-1 y HR-2) de MHV en las proteínas quiméricas generadas. Estos dominios se han identificado en todas las proteínas S de coronavirus. Estas regiones de superenrollamiento son características de las proteínas S de coronavirus. Las estructuras HR forman configuraciones en α -hélice que interactúan entre sí de forma antiparalela (Bosch et al., 2003), y están implicadas en la formación de oligómeros de la proteína S (de Groot et al., 1987b; Luo et al., 1999) y en la fusión virus-célula. Estudios de intercambio de dominios HR entre proteínas S de virus de la misma especie, originan proteínas funcionales, mientras que el intercambio de dominios HR entre proteínas S de virus que infectan a especies distintas, dan lugar a proteínas S no funcionales (Bosch et al., 2003). Algunos autores sugieren que estos

dominios podrían participar en el cambio conformacional de la proteína S durante las primeras etapas de la infección, permitiendo la inserción del péptido de fusión en la membrana celular. Además, se ha postulado que las interacciones entre el dominio HR-1 y el dominio de unión al receptor pueden tener una función en la fusión del virus con la célula infectada (Krueger et al., 2001; Matsuyama y Taguchi, 2002). Al mismo tiempo, en el virus MHV se ha demostrado que las mutaciones en el dominio HR-1 que afectan a la fusogenicidad de la proteína alteran los patrones de tropismo de tejido dentro de una especie (Tsai et al., 2003). La interacción entre los dominios HR-1 y HR-2 en MHV es esencial para la infectividad del virus (Bosch et al., 2003). De hecho, la eliminación del péptido HR-1 puede bloquear la infectividad viral (Bosch et al., 2004). La longitud de la secuencia de unión entre la región HR-2 y el dominio transmembrana, está estrictamente conservada en todas las proteínas S de coronavirus. Estos dominios de las espículas de los coronavirus recuerdan a proteínas de unión/fusión de otros virus, como ortomixovirus, virus influenza, retrovirus, VIH, paramixovirus SV5, filovirus, Ébola y baculovirus SeMNPV, entre otros (Bosch et al., 2003; de Groot et al., 1987a). En estos virus, las interacciones entre proteínas de unión/fusión y el receptor celular dan lugar a cambios conformacionales que generan una exposición del péptido de fusión que antes estaba oculto en el interior de la proteína. El resultado es la unión de las membranas viral y celular. Aún no se han identificado los péptidos de fusión de coronavirus, pero diferentes predicciones los sitúan precediendo al dominio HR-1 (Luo y Weiss, 1998). Esto sugiere que el acoplamiento de los dominios HR-1 y HR-2 podría acercar el dominio implicado en la fusión a la superficie de la célula.

El dominio transmembrana fue la segunda estructura importante que había que tener en cuenta para generar la proteína S quimérica. Los resultados de este trabajo indican que el dominio transmembrana junto con el dominio citoplasmático o endodominio, poseen un papel crítico en la incorporación de la proteína de la espícula durante el ensamblaje del virión. Los intercambios recíprocos del dominio globular entre las proteínas S de MHV y FIPV, han mostrado la importancia de estas regiones (Godeke et al., 2000; Kuo et al., 2000). El dominio citoplasmático determina la interacción de la proteína S con la proteína M, y dicha asociación es esencial para su ensamblaje. Al mismo tiempo, el dominio citoplasmático del MHV confiere a la proteína S del FIPV la habilidad de ensamblarse dentro de partículas virales de MHV. Este dominio es suficiente para incorporar proteínas M heterólogas que normalmente no se incorporarían dentro del virión (Bosch et al., 2005).

Los datos expuestos demuestran que en coronavirus el tropismo de especie parece estar controlado fundamentalmente a nivel de la entrada del virus en la célula. No obstante, se observó que el virus TGEV con tropismo murino replica en cultivos celulares de ratón (LR7), con un nivel de al menos un logaritmo menor que el virus parental MHV. Esto sugiere que la maquinaria de replicación de estos virus funciona con una eficacia ligeramente menor en células de ratón. En el caso de experimentos donde se crearon proteínas S quiméricas entre MHV y FIPV, y por tanto con tropismo por ratón o felino, el título viral disminuyó entre diez y cien veces. Este hecho sugiere que existen mayores diferencias entre los sistemas de replicación de los coronavirus en células felinas y murinas.

5.2.2. Implicaciones de la modificación del tropismo de TGEV “in vivo”

Los coronavirus del género α , al que pertenece TGEV y virus que infectan a humanos, felinos y perros, poseen un rango de huésped relativamente restringido, infectando a su huésped natural o a especies animales muy relacionadas. No obstante, experimentos donde se han utilizado coronavirus del género α para infectar a especies distintas, han mostrado la aparición de replicación viral, seroconversión y, en algunos casos, una enfermedad no transmisible (Barlough et al., 1984; Enjuanes y Van der Zeijst, 1995; Woods et al., 1981; Woods y Wesley, 1992). La interacción de la proteína S con el receptor celular es el factor más importante en la entrada del virus y en la expansión del rango de especie. Esta expansión del rango se ha conseguido en MHV, que pertenece al género β de coronavirus, mediante la infección en cultivos de células diferentes a las murinas. Las variantes de MHV con un rango de huésped amplio se han obtenido mediante el pase seriado de células persistentemente infectadas (Baric et al., 1997; Schickli et al., 1997). Las nuevas variantes no dependen del receptor murino CEACAM1 para la entrada en la célula, sino que son capaces de reconocer homólogos del receptor habitual o carbohidratos de la nueva célula, lo que les permite una alta transmisibilidad entre especies (de Haan et al., 2006). Es necesario que la proteína de la espícula se adapte a un nuevo receptor para que un coronavirus se transmita a una nueva especie. Esta adaptación se puede conseguir mediante la aparición de mutaciones o por recombinación homóloga con otro coronavirus que de forma natural infecte a la misma especie hospedadora (Tusell et al., 2007). Los coronavirus pueden saltar la barrera de especie ocasionalmente, adquiriendo un nuevo tropismo. El virus SARS-CoV probablemente haya surgido de esta manera. Estudios recientes han identificado a algunos murciélagos como el reservorio natural del SARS-CoV. Los coronavirus similares al SARS-CoV hallados en

murciélagos pueden haberse adaptado a humanos por medio de mutaciones genómicas, eventos de recombinación en su huésped natural o por el paso a hospedadores intermediarios como gatos, civetas, etc. (Hampton, 2005; Lau et al., 2005; Li et al., 2005; Normile, 2005). La especificidad del hospedador en los virus animales y la evolución de nuevas enfermedades virales, son fenómenos complejos que implican interacciones entre el virus, el hospedador y el ambiente. La mayoría de los virus emergentes que afectan a los humanos surgen por la transmisión desde reservorios animales, sin embargo, algunas enfermedades nuevas pueden haber surgido de mutaciones que alteren el tropismo viral, la virulencia y la patogénesis en el hospedador natural, (Ampel, 1991; Morse, 1995).

Los virus recombinantes con tropismo modificado se inocularon a ratones Balb/c y STAT1-/- para observar la respuesta frente a la infección en el ratón. MHV es un patógeno inocuo que se suele detectar serológicamente en madres gestantes, pero que no provoca manifestaciones clínicas obvias en animales normales. La infección por MHV suele ser subclínica, y sólo origina una mortalidad significativa en ratones inmunodeficientes (Compton et al., 1993). En la infección por MHV se han identificado dos patrones infecciosos, según la cepa de coronavirus que infecta al ratón tras la inoculación vírica por vía intranasal (Barthold y Smith, 1984). Existe un patrón entérico, representado por la cepa JHM, en el que el virus infecta el intestino, desde donde se disemina al resto de órganos y a la sangre, lo que potencia la infección. El otro patrón es respiratorio y está representado por la cepa A-59. Después de la inoculación intranasal el virus comienza infectando la cavidad nasal, donde se encuentra el bulbo olfatorio, desde aquí puede infectar el sistema nervioso central. Por otra parte, el virus que se introduce en la cavidad oral acaba infectando los pulmones, donde replica y se extiende al resto de órganos a través de la circulación sanguínea. Nuestros datos confirman que el virus infecta a dos estirpes diferentes de ratones "in vivo". Además del cambio de tropismo de especie, también se modificó el tropismo de tejido, ya que el virus recombinante siguió un patrón respiratorio, parecido al del virus parental MHV-A59.

El virus replicó "in vivo" en los mismos órganos que el virus parental, pero con una menor eficacia. El ARN viral se detectó en diferentes órganos, confirmándose la presencia de virus infectivo por inmunofluorescencia de cortes histológicos, aunque no se pudo titular virus procedente de órganos (sin embargo, sí que se recuperaron virus viables por cultivo celular). Estos datos se confirmaron con la cinética de la replicación. En la infección por el virus MHV, cepa JHM (Barthold y Smith, 1992), se ha

comprobado que después de la inoculación intranasal, el primer día post-infección ocurre replicación viral desde la cavidad nasal hasta los nódulos cervicales. También se detecta el comienzo de la infección en el bazo y las placas de Peyer. El segundo día, el virus se localiza en los nódulos mesentéricos, en el hígado y en la medula ósea. El tercer día, el virus se ha diseminado por los órganos de la cavidad abdominal, incluyendo además el timo. El virus replicó siguiendo claramente esta cinética en los ratones STAT1^{-/-}, pero no en los ratones Balb/c. Estos datos indican la atenuación del vector viral para replicar “in vivo” en células de ratón. Durbin et al. (1996) observaron la muerte de camadas de ratones STAT1^{-/-} por hepatitis fulminante. Estas camadas estaban infectadas por cepas naturales de MHV del animalario y que procedían de ratones STAT1^{+/-} infectados que no manifestaron ninguna enfermedad. En nuestros experimentos no se produjeron muertes de ratones STAT1^{-/-} tras ninguna de las inoculaciones con el virus con tropismo modificado, lo que confirma la reducción de la infectividad viral. Esta atenuación aporta un elemento de seguridad, no total, pero sí importante para su utilización como vector viral. La deficiencia del sistema inmunitario de los ratones STAT1^{-/-}, por la incapacidad de las células de responder al interferón de tipo I y II, facilita la persistencia de la replicación viral, aunque el virus sea menos eficaz para infectar a los ratones.

5.3. Expresión de las proteínas de rotavirus por los vectores murinizados

Los vectores virales con tropismo modificado que incorporan las proteínas de rotavirus las expresaron en células de ratón infectadas. El patrón de expresión de las proteínas heterólogas por inmunofluorescencia en células de ratón, fue similar al de estudios previos. El vector que expresa la proteína VP7 presentó una fluorescencia difusa que rodeaba al núcleo celular. En fases tempranas de la infección se observó que la proteína heteróloga se concentraba de forma perinuclear. Este resultado sugiere que la proteína se produce en los ribosomas asociados al retículo endoplasmático rugoso. En fases más tardías, se observa una fluorescencia que abarca todo el citoplasma. En estas fases, la proteína seguramente se produce en los ribosomas del citoplasma y no se une específicamente a ningún compartimento celular (Dormitzer et al., 1992). En cambio, la expresión de las proteínas heterólogas por el vector bicistrónico presentó una fluorescencia concentrada en regiones intracitoplasmáticas. Estudios anteriores (Gonzalez y Affranchino, 1995; Nilsson et al., 1998) demuestran que estos acúmulos son debidos a la formación de estructuras similares a los viroplasma originados en una infección por rotavirus. Estas estructuras son características de la morfogénesis de rotavirus y corresponden a la acumulación

de proteínas virales en forma de inclusiones citoplasmáticas. El viroplasma está constituido, al menos, por las proteínas VP2 y VP6 (Chasey, 1980; Petrie et al., 1982), aunque se desconoce si participan más proteínas virales o celulares en su formación y acumulación. En este trabajo, se comprobó por inmunofluorescencia y por microscopía electrónica e inmunomarcaje con oro coloidal que el vector murinizado bicistrónico expresó las proteínas de rotavirus, y que éstas se concentraron en el citoplasma produciendo estructuras compatibles con los viroplasmas. En cambio, no detectamos la producción intracelular de VLPs. Otros autores tampoco han observado dichas partículas intracelularmente (Crawford et al., 1994; Nilsson et al., 1998; Redmond et al., 1993; Tosser et al., 1992), aunque sí hallaron la presencia de VLPs en el medio extracelular.

El número de células infectadas con el virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 que expresaron la proteína VP7 de rotavirus fue bajo, un 6% aproximadamente del total de células infectadas, después de realizar cinco rondas de purificación mediante el aislamiento de clones por dilución límite. La posterior amplificación del clon aumentó la expresión hasta un 20%, que se mantuvo estable a través de pases en cultivo celular. En la construcción bicistrónica se obtuvo un clon con una expresión del 4% de células infectadas. Sin embargo, la amplificación de este clon no dio lugar a virus estables que expresaran las proteínas de rotavirus a un nivel aceptable. Estos datos nos ponen de manifiesto la principal limitación de un vector viral basado en coronavirus. Las posibles causas de esta inestabilidad son múltiples, y pueden ser debidas a características de la secuencia heteróloga o del vector viral:

La secuencia insertada. La secuencia heteróloga puede influir de dos formas: por el tamaño y por la composición. El tamaño del gen insertado puede influir por limitaciones o constricciones en el empaquetamiento. El material genético adicional origina genomas más grandes que se deben encapsidar en el virión. En este vector viral se ha mitigado este efecto eliminando los genes no esenciales 3a y 3b para permitir una mayor capacidad de clonación. Esta limitación es mayor en el caso del vector bicistrónico, en el que se han clonado dos genes. La composición química puede influir por la diferencia del contenido de guaninas-citosinas (GC) entre el genoma viral y el gen heterólogo, o por la aparición de toxicidad para el virus o la célula. El contenido en GC de la secuencia foránea comparada con el genoma del virus puede ser importante. En vectores basados en poliovirus, la manipulación del contenido de GC ha incrementado la estabilidad genética de insertos foráneos (Lee et al., 2002). No obstante, el gen GFP (que posee un alto contenido en GC) se ha

mantenido estable después de su inserción en el genoma de TGEV (Sola et al., 2003). La aparición de toxicidad puede manifestarse interfiriendo la maquinaria de replicación viral o influyendo en la supervivencia celular. Con respecto al virus, origina una disminución de la producción de virus al reducir su replicación. Con respecto a la célula, puede inducir apoptosis y acortar la vida de la célula infectada. Esta reducción produce una menor tasa de replicación y de expresión proteica. En nuestra opinión, ésta es una de las causas más importantes de la eficacia limitada de los vectores. La expresión de la proteína VP7 de rotavirus se ha obtenido en grandes cantidades utilizando vectores virales basados en baculovirus, sin que se documentara toxicidad de la proteína en líneas celulares de insecto (Crawford et al., 1994; Dormitzer et al., 2000; Fiore et al., 1995). Sin embargo, este efecto puede ser particularmente importante a la hora de expresar conjuntamente dos proteínas virales, como son las proteínas VP2 y VP6 de rotavirus. Los genes insertados también pueden contener señales desconocidas, como estructuras secundarias de ARN o sitios de unión a proteínas, que pueden afectar a la replicación o a la transcripción viral. En este trabajo, se ha descrito la aparición de una secuencia similar a la CS de TGEV en el gen de la proteína VP7, y aunque este hecho no pareció inhibir la replicación del virus, sin embargo, podría afectar a su estabilidad.

El vector viral. En nuestra opinión existen tres puntos fundamentales que provocan la pérdida del gen heterólogo: la posición del gen en el genoma del virus, la toxicidad del gen para el virus y la facilidad para recombinar del virus. El mantenimiento de los genes insertados depende de las tasas de mutación y de recombinación viral. Mientras que la estabilidad en la expresión de genes foráneos en virus de ADN es alta, en virus de ARN es baja, debido a que la ARN polimerasa ARN dependiente carece de un mecanismo de corrección de lectura y tiene un alta tasa de error (Figlerowicz et al., 2003). Además, la estabilidad genómica de los virus de ARN de sentido positivo parece ser menor que los de sentido negativo, probablemente debido a la ausencia, casi total, de recombinación en estos últimos (Figlerowicz et al., 2003). Los genes son vulnerables a la delección, pero además, los genes foráneos pueden contener secuencias que los hagan más susceptibles a la mutación o a la recombinación durante la replicación de coronavirus. Al insertar genes heterólogos en coronavirus se ha observado la aparición de grandes delecciones más que mutaciones puntuales (Bosch et al., 2003; de Haan et al., 2005). Se ha propuesto la hipótesis de que estas delecciones sean el resultado de eventos de recombinación intra o intermoleculares. En cambio, en los virus de ARN de cadena negativa con genes

insertados se ha observado la aparición de mutaciones puntuales más que grandes deleciones (Dalton y Rose, 2001; Wertz et al., 2002). Coronavirus muestra una alta tasa de recombinación, lo cual probablemente funciona como una estrategia evolutiva natural (Lai, 1996). Los eventos de recombinación dentro del gen heterólogo dependen de la homología de secuencia entre éste y la secuencia del virus recombinante (Lai, 1996). Se ha observado que la estabilidad de secuencias heterólogas en coronavirus depende de la propia secuencia insertada, pero que la pérdida de expresión depende, significativamente, del fondo genómico y de la localización del gen insertado (de Haan et al., 2005). Los insertos foráneos también pueden contener estructuras secundarias del ARN que son propensas a sufrir recombinación. Otra causa importante que aumenta la inestabilidad es la aparición de deleciones, que originan variantes del virus recombinante de menor tamaño. Estos virus con deleciones poseen una mayor ventaja selectiva que los virus que contienen los genes heterólogos. En una infección mixta con virus recombinantes y virus que han perdido la secuencia heteróloga, son éstos últimos los que tienen una mayor ventaja selectiva, porque deben replicar un genoma más pequeño. En coronavirus, el mantenimiento de un gen foráneo depende de su posición en el genoma. En experimentos previos se ha demostrado la importancia del sitio de clonación del gen de la GFP en el genoma de TGEV (Sola et al., 2003). La clonación de la proteína GFP en el lado 3' del gen N, sin reemplazar a los genes no esenciales, originó un virus altamente inestable. Otros intentos de clonar el gen de la GFP en el lado 3' del gen N en el genoma de MHV, no produjeron virus viables que expresaran la proteína (Hsue y Masters, 1999).

Estos problemas también se han presentado en la familia *Arteriviridae*, que está estrechamente relacionada con *Coronaviridae*, y ambas están incluidas en el orden *Nidovirales*. Los virus de la familia *Arteriviridae* también presentan problemas de inestabilidad al ser empleados como vectores de expresión. Se han clonado epítomos cortos en la proteína M del virus de la arteritis equina (AEV) (de Vries et al., 2000) y de la proteína N del PRRSV (Groot Bramel-Verheije et al., 2000). Los virus recombinantes con la proteína N modificada perdieron el epítomo en el cuarto pase en cultivo celular. La introducción del gen de la GFP completo en el genoma de arterivirus originó un virus recombinante altamente inestable (de Vries et al., 2001). Después del segundo pase ya se detectaron mutantes delecionados por RT-PCR. La baja capacidad de los arterivirus para acomodar material genético foráneo puede deberse a constricciones en el empaquetamiento, impuestos por la estructura icosaédrica de su nucleocápside. Además, carecen de genes no esenciales. Por último, todas sus ORF

se solapan, y por tanto cada TRS está incluida en el gen adyacente, lo que dificulta la introducción de genes foráneos.

A pesar de esta limitación de los vectores basados en coronavirus, la estabilidad de los genes heterólogos se puede mejorar. Una opción es reducir el tamaño de la secuencia heteróloga. En la proteína VP7 de rotavirus se han definido varias regiones altamente variables, lo que ha conducido a pensar que estas secuencias corresponden a regiones antigénicas (Tabla 5.1). Las secuencias de nucleótidos que codifican estas secuencias de aminoácidos se pueden seleccionar, y clonar solamente las regiones de interés, lo que reduciría el tamaño del inserto. Otra opción es crear proteínas de fusión con dos sistemas de degradación de las proteínas celulares: ubiquitina y LIMP-II. El laboratorio del Dr. Enjuanes está actualmente trabajando con estos sistemas para el vector viral de TGEV que expresa proteínas del PRRSV. Esta estrategia es muy interesante para aplicar al vector bicistrónico, ya que disminuiría la posible toxicidad causada por las proteínas de rotavirus en el ciclo celular. Otra estrategia alternativa podría ser añadir al gen heterólogo una secuencia de anclaje a la membrana celular. Esta secuencia codifica una señal que dirigiría a la proteína para que se expusiera en la superficie celular (Andrew et al., 1992; Andrew et al., 1990; Both et al., 1993). La secuencia proviene del péptido de unión a membrana de la hemaglutinina del virus influenza, y su inserción provoca que la proteína VP7 sea expuesta en la superficie celular. Esta construcción podría permitirnos desarrollar un sistema de purificación de células infectadas que exponen la proteína VP7 en su superficie, mediante citometría de flujo. Se seleccionarían poblaciones de células que expresen esta proteína en la membrana y, por tanto, estén infectadas con el virus que expresa la proteína.

Región	Aminoácidos	Comentario
A	87-101	
B	143-152	Principales sitios de neutralización (Dyall-Smith et al., 1986)
C	208-221	
D	65-76	
E	180-190	En el trabajo de Gunn et al. (1985) no obtienen respuesta antigénica al inocular un péptido con los aminoácidos 66-76
F	235-242	Propuesta por Kirkwood et al. (1993) por selección de mutantes de variantes antigénicas
	247-259	(Gunn et al., 1985)
Otras regiones	275-295	(Ijaz et al., 1995)
	233-283	Región inmunodominante, pero posiblemente región no neutralizante (Huang et al., 2000)

Tabla 5.1. Localización en la secuencia de aminoácidos de la proteína VP7 de rotavirus de las principales regiones inmunogénicas.

5.4. Inmunización de ratones con el vector que expresa la proteína VP7 de rotavirus

Nuestros datos demuestran que el vector viral promovió una respuesta inmunitaria en el ratón adulto frente al propio vector y en menor medida frente a la proteína VP7 de rotavirus.

5.4.1. Respuesta de anticuerpos

En este trabajo se ha demostrado que los ratones Balb/c inducen una respuesta de anticuerpos dirigidos frente al virus TGEV adaptado a infectar células de ratón, tanto por vía sistémica (IgG e IgA séricas) como en mucosas (IgA intestinales).

Se han aplicado diferentes estrategias para desarrollar una vacuna de subunidades frente a rotavirus, a través de la expresión de genes clonados (de longitud completa o de secuencia parcial) de las proteínas VP7 y VP4 de la cápside externa, con resultados diversos. La mayoría de los intentos para inmunizar animales frente a rotavirus mediante la expresión de la proteína VP7 han tenido un éxito

limitado, debido a la complejidad y aparente inestabilidad de los dominios de neutralización de dicha proteína (McGonigal et al., 1992; Salas-Vidal et al., 1990). En la mayoría de los estudios sólo se han inducido anticuerpos para la proteína VP7 desnaturalizada, indicando que, aunque se expresara la proteína en su forma inmunogénica, ésta no podía conseguir una conformación que desencadenara anticuerpos que neutralizaran o unieran al virus (Johnson et al., 1989; Salas-Vidal et al., 1990). Los resultados sugieren que la proteína VP7 debe unir calcio para formar su dominio de neutralización durante el ensamblaje de la partícula (Dormitzer et al., 1994). La expresión en vectores procarióticos (*Escherichia coli* y cepas atenuadas de *Salmonella typhimurium*) han tenido resultados decepcionantes para proteger eficazmente a ratones. La inmunización con VP7 expresada en células de insecto por baculovirus recombinantes, ha generado bajos niveles de anticuerpos neutralizantes en animales de laboratorio (Conner et al., 1996), aunque se ha comprobado que se inducen linfocitos T CD8⁺ que median la eliminación de la infección crónica por rotavirus en ratones SCID (Dharakul et al., 1991). La expresión de la proteína VP7 en vectores de virus vacuna ha mostrado resultados prometedores cuando la proteína VP7 se ha expresado en la superficie celular unida a la membrana plasmática de las células infectadas. Esto se ha conseguido mediante la adición del dominio citoplasmático y de anclaje a membrana de la hemaglutinina del virus influenza. Esta proteína quimérica deriva de la proteína VP7 de la cepa SA11 silvestre, en la que se ha reemplazado el péptido señal hidrofóbico por el péptido de señal de anclaje a membrana en el extremo carboxilo-terminal de la proteína VP7 (Andrew et al., 1990). Con esta construcción se ha conseguido que ratones lactantes de una semana de edad, nacidos de madres vacunadas con estos virus vacuna recombinantes, estuvieran protegidos frente a la inoculación del virus homólogo (Andrew et al., 1992). Se han obtenido resultados similares con la misma construcción para la proteína VP7 expresada en un adenovirus recombinante tipo 5 (Both et al., 1993).

El vector rTGEV_{S-MHV}-VP7 estimuló una respuesta de anticuerpos anti-rotavirus. La ruta más eficaz de inoculación fue la vía intraperitoneal, que produjo una respuesta significativa de anticuerpos IgG séricos desde la primera inoculación, aumentó en la segunda y se mantuvo en la tercera inoculación. No se observó la producción de anticuerpos en el suero de ratones inoculados por vía intragástrica ni intragástrica-intranasal. El estudio de los anticuerpos neutralizantes anti-rotavirus mostró que existe una tendencia hacia estos resultados. La mayor diferencia entre los sueros de ratones preinmunes y los inoculados se encontró en el grupo intraperitoneal. Aunque esta divergencia no fuera estadísticamente significativa, se encuentra cerca del nivel de

confianza del 5%. Sin embargo, se obtuvo una respuesta de anticuerpos séricos frente al vector en todas las vías de inoculación. Este hecho indica que el virus con tropismo por el ratón replicó en órganos y en mucosas promoviendo una respuesta frente al vector. Una posible explicación de esta diferencia es que el virus posea una baja eficacia de infección de órganos a través de mucosas, y por tanto una ruta de inoculación más directa, como la vía intraperitoneal, permitiría una mayor replicación del virus en órganos y, consecuentemente, una mejor respuesta del sistema inmunitario. De hecho, la respuesta de anticuerpos anti-TGEV por vía intranasal fue mayor, probablemente porque el virus replica en el pulmón y disemina mejor a órganos.

No se detectó una respuesta de anticuerpos de clase IgA anti-rotavirus en mucosas. No obstante, hay que tener en cuenta que la respuesta de anticuerpos de clase IgA en mucosas frente al vector no fue uniforme (2 de los 6 ratones inoculados), por lo que probablemente sea más difícil desencadenar una respuesta específica frente a la proteína VP7 de rotavirus. Una posible explicación es que el virus replica con una baja eficacia en los ratones Balb/c, lo que dificultaría la inducción de una respuesta en mucosas. Los ratones STAT1^{-/-} son muy susceptibles a las infecciones virales (Durbin et al., 1996; Hogan et al., 2004; Karst et al., 2003; Mumphrey et al., 2007; Shresta et al., 2005). Nosotros también observamos una replicación viral más intensa en estos ratones que en los ratones Balb/c. Se realizó un estudio preliminar de la respuesta de anticuerpos anti-TGEV en ratones STAT1^{-/-}, y se observó una alta variabilidad al inocular a estos ratones intragástricamente con rTGEV_{S-MHV}-VP7. Pese a ello se estudió la respuesta de anticuerpos anti-rotavirus en estos ratones, pero no se detectaron anticuerpos de clase IgG o IgA específicos de rotavirus, debido a que tienen alteradas las vías de la inmunidad innata. La deficiencia en la proteína STAT1^{-/-} provoca la falta de respuesta a los interferones de tipo I y II, lo que puede impedir posteriores respuestas antivirales (van den Broek et al., 1995). La ausencia de la proteína STAT1 provoca la interrupción de la vía de señalización que es responsable de la canalización de las acciones pleiotrópicas de los interferones. Además, se cree que diversas citocinas, aparte del IFN, necesitan de la participación de la proteína STAT1 para llevar a cabo sus respuestas celulares. Entre ellas se encuentra la IL-6, el factor estimulante tipo 1 (CSF-1) (Larner et al., 1993), la IL-10 (Finbloom y Winestock, 1995) y diversas hormonas. Recientemente, se ha comprobado que los ratones STAT1^{-/-} tienen una capacidad reducida para producir anticuerpos de clase IgG e IgM (Thibault et al., 2008). Tampoco se ha observado la producción de anticuerpos tras la inoculación de norovirus murino tipo 1 a estos ratones (Mumphrey et al., 2007).

5.4.2. Respuesta de citocinas en ratones inmunizados

Las citocinas son un factor clave en la regulación de la respuesta inmunitaria, y en particular de la producción de anticuerpos IgA en mucosas. Existen dos subtipos principales de células T CD4⁺ según el patrón de citocinas que producen (Mosmann y Coffman, 1989). El primer tipo son las células T “helper” tipo 1 (Th1), que secretan IFN- γ , IL-2 y TNF- β y son eficientes inductores de linfocitos T citotóxicos (CTL). El segundo tipo son las células Th2 que producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, las cuales promueven respuestas de células B incluyendo los isotipos de IgG1 e IgA. Existen numerosos factores que pueden influir en el perfil de citocinas, particularmente la naturaleza y dosis del antígeno presentado al sistema inmunitario o el tipo de células presentadoras de antígeno. En la mayoría de infecciones virales predomina una respuesta tipo Th1 con producción de IFN- γ (Finke et al., 1995; Milligan y Bernstein, 1995). Pero los virus que infectan superficies mucosas favorecen una respuesta de citocinas de tipo Th2 (Daynes et al., 1990). Aunque sigue prevaleciendo el IFN- γ (Milligan y Bernstein, 1995) y se puede inducir el aumento de los niveles de IL-4, como por ejemplo tras la infección de mucosas por el virus influenza o el virus respiratorio sincitial (Graham et al., 1994; Sarawar et al., 1994).

La infección de ratones por MHV-A59 se acompaña por el incremento de la producción de IFN- γ y la supresión de las respuestas de esplenocitos a la concanavalina A (Even et al., 1995; Lardans et al., 1996). Ratones Balb/c infectados con la cepa JHM, que posee una virulencia mayor, muestran la supresión de la proliferación inducida por la concanavalina A, un descenso en la síntesis de IL-2 e IL-4, y un retraso en la producción del IFN- γ en la primera semana de infección, mientras que posteriormente se detectan grandes cantidades de IFN- γ (de Souza et al., 1991; Dindzans et al., 1987; Smith et al., 1987). La función de macrófagos se halla dañada en ratones infectados con esta cepa (de Souza y Smith, 1991) o cepas naturales (Boorman et al., 1982; Dempsey et al., 1986).

Nuestros datos mostraron una tendencia a inducir una respuesta inmunitaria de tipo humoral por parte del vector viral que expresa la proteína VP7, con la activación de IL-10 en el cultivo de esplenocitos estimulados y una baja respuesta de IFN- γ . La respuesta parece ser debida al vector y no a la proteína VP7 porque se produjo tras la estimulación de esplenocitos con el virus rTGEV_{S-MHV}, pero no con el virus rTGEV_{S-MHV-VP7}. En contra de lo esperado, no hallamos un incremento en la producción de interferón, pero se ha observado que esplenocitos obtenidos de ratones infectados con MHV y *Trypanosoma cruzi* producen un aumento de la secreción de IL-10, y que la

producción endógena de esta interleucina regula negativamente la producción de IFN- γ (Torrecilhas et al., 1999).

En cambio, tanto en el suero como en el cultivo de esplenocitos de ratones inoculados, se produjo un aumento en la producción del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF). Este factor es una citocina de respuesta general que promueve la proliferación y maduración de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos de progenitores de la médula ósea. Además, se ha visto que tiene una profunda influencia en las funciones biológicas de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos y linfocitos (Rasko, 1997). Entre sus funciones biológicas se incluyen la potenciación de la presentación de antígenos, quimiotaxis, síntesis de una gran variedad de enzimas y mediadores solubles, liberación de intermediarios reactivos del oxígeno e histaminas, muerte celular dependiente de anticuerpos y fagocitosis. Todo ello contribuye de forma diferente en la defensa del sistema inmunitario frente a diversos patógenos (Barreda et al., 2004).

5.4.3. Protección en el modelo de ratón lactante

Los anticuerpos maternos generados por hembras inoculadas por vía intraperitoneal con el vector, protegieron al 60% de los ratones lactantes sometidos a la infección con una cepa homóloga de rotavirus (RF), y sólo protegieron a un 18% de los ratones inoculados con una cepa heteróloga (EDIM). La inoculación de los ratones con el vector viral rTGEV_{S-MHV}-VP7 por vía parenteral parece ser la más adecuada para generar una respuesta eficaz de anticuerpos maternos frente a rotavirus, ya que la inoculación por vía intragástrica protegió sólo a un 13% de los ratones nacidos de estas madres. Estos resultados coincidieron con la producción de anticuerpos, ya que las madres que sintetizaron anticuerpos séricos de clase IgG son las que protegieron a las crías frente a la diarrea por rotavirus.

5.5. Problemas de expresión del vector rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6 para inmunizar

Se ha generado un vector bicistrónico basado en TGEV que expresa VLPs de rotavirus en células porcinas, pero no se ha obtenido un clon del mismo virus con tropismo murino que exprese establemente las proteínas heterólogas VP2 y VP6. Esta divergencia puede deberse a diferencias en el ciclo infectivo del virus en las células de ratón que disminuirían la eficacia de la capacidad transcripcional del virus, provocando su inestabilidad. Este problema se podría mejorar mediante pases seriados en células

de ratón. Estos pases mejorarían la capacidad replicativa del virus en esta especie. Previamente, se ha descrito que la administración intranasal de VLPs de rotavirus de doble capa, obtenidas utilizando baculovirus bicistrónicos en ratones adultos, induce una protección superior al 98% frente a la inoculación con una dosis de aproximadamente 10 DI_{50} de la cepa silvestre (Blutt et al., 2006; O'Neal et al., 1997). Por otro lado, con la administración de VLPs por vía oral o intramuscular a ratones adultos se obtuvieron niveles de protección del 39% y 89% respectivamente, tras la inoculación de dosis bajas de rotavirus (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003; O'Neal et al., 1997). Estos resultados no se repiten en otros modelos animales, como en los conejos, donde la inmunización parenteral resulta en bajos niveles de protección (32%), mientras que la administración por vía intranasal no induce una inmunidad protectora frente a la inoculación posterior con una dosis superior a 1.000 DI_{50} de la cepa silvestre (Bertolotti-Ciarlet et al., 2003; Ciarlet et al., 1998). Sin embargo, cerdos gnotobióticos inmunizados con VLPs de VP2/VP6 por vía intranasal u oral no estuvieron protegidos frente a la diarrea generada por la inoculación con una dosis de 10^6 DI_{50} de rotavirus humano (Yuan et al., 2000). Para aumentar la eficacia en la protección frente a rotavirus empleando VLPs, posiblemente sea necesaria la adición de los antígenos neutralizantes VP4 y VP7 a las VLPs de rotavirus expresadas utilizando el vector rTGEV.

5.6. Estrategias futuras

Existen dos tipos de estrategias para mejorar los vectores basados en coronavirus. Por una parte, se puede aumentar la seguridad y por otra se puede incrementar la eficacia de los vectores.

El mayor avance para la seguridad de una vacuna basada en coronavirus, ha sido la generación de vectores competentes en replicación y deficientes en propagación. La estrategia para conseguir estos vectores bioseguros es eliminar un gen esencial cuya proteína se produzca en células transformadas con dicho gen, las denominadas células empaquetadoras. Los coronavirus se han complementado con éxito en líneas celulares empaquetadoras (Curtis et al., 2002; DeDiego et al., 2007; Ortego et al., 2002). Este tipo de líneas celulares empaquetadoras se han desarrollado utilizando vectores basados en el replicón no citopático del virus Sindbis (Frolov et al., 1996; Khromykh et al., 1999; Lindenbach y Rice, 1997), en el virus del bosque de Semliki (Polo et al., 1999), en el virus de la encefalitis equina venezolana (Curtis et al., 2002) y en líneas transformadas establemente mediante la localización de genes bajo

promotores no inducibles (Von Seggern et al., 1998) o inducibles (Kafri et al., 1999; Pacchia et al., 2001). Los virus formados en estas células al infectar células no complementadoras expresarán las proteínas heterólogas, pero no podrán ensamblarse e infectar a células vecinas.

En la tesis doctoral de Juan Eduardo Ceriani Laurenso, dirigida por el Dr. L. Enjuanes, se han generado virus infectivos mediante la complementación en *trans* de un genoma de TGEV deficiente en el gen esencial E. Para ello, se han utilizado líneas celulares empaquetadoras que expresan esta proteína tanto de forma transitoria como estable. En los coronavirus del género β se ha demostrado recientemente que la proteína E no es esencial para la replicación del virus, aunque la replicación en estos virus es más lenta en ausencia de esta proteína, tanto en cultivos celulares como en modelos animales (DeDiego et al., 2007; Kuo y Masters, 2002; Kuo y Masters, 2003). Por el contrario, en TGEV, que pertenece al género α , se ha demostrado que la proteína E es esencial para la replicación mediante la transfección de células con un ADNc infeccioso de TGEV en el que se ha delecionado el gen E. Con esta construcción no se obtienen virus infecciosos (Curtis et al., 2002; Ortego et al., 2002). El virus generado depende de la expresión en *trans* de la proteína E, pero durante la infección no es capaz de ser secretado al medio extracelular y, por tanto, este virus no es capaz de infectar a células vecinas.

Estos vectores presentan una gran bioseguridad, dado que hasta el momento no se ha demostrado la recuperación del gen delecionado por recombinación homóloga del genoma viral con los ARNm expresados por las células empaquetadoras (Ozdarendeli et al., 2001).

La deleción de un gen esencial viral presenta la ventaja adicional de que se pueden desarrollar vectores virales con mayor capacidad de inserción.

Las mejoras en la eficacia que estamos contemplando son:

1. Mejora de la potencia de las secuencias que regulan la transcripción.
2. Mejora de los niveles de transcripción insertando un potenciador de la transcripción identificado recientemente en el laboratorio del Dr. L. Enjuanes. En el trabajo de Moreno et al. (2008) se describe un mecanismo novedoso de regulación de la transcripción en coronavirus. Consiste en nueve nucleótidos localizados a 449 nucleótidos hacia el extremo 5' de la secuencia CS de la TRS del gen N. Esta

secuencia interactúa con la secuencia complementaria del CS del gen N e incrementa específicamente la acumulación del ARNsg del gen N.

3. Optimización de los codones del gen a expresar para el ratón.
4. Eliminación de dominios tóxicos de las proteínas heterólogas. Creemos que ésta es la estrategia más importante. Es conocido que la presencia de secuencias hidrofóbicas en una proteína viral aumenta su toxicidad. Por ello, proponemos evaluar la presencia de estas secuencias a lo largo de las proteínas a expresar y eliminarlas. Alternativamente, se podría realizar una mutagénesis al azar a lo largo de toda la proteína, seleccionando aquellas variantes que mantienen la antigenicidad de la misma y que muestran una toxicidad reducida. En esta tesis lo hemos intentado mediante pases de purificación y hemos conseguido una pequeña mejoría.
5. Adición de una señal de anclaje a membrana. Otros vectores virales que expresan la proteína VP7 de rotavirus se han mostrado eficaces para promover una respuesta de anticuerpos anti-rotavirus únicamente cuando esta proteína se ha expuesto en la superficie celular mediante la adición de un péptido de anclaje a membrana (Andrew et al., 1992; Andrew et al., 1990; Both et al., 1993). Una posible explicación de esta mejora es que la proteína sea reconocida más fácilmente por las células del sistema inmunitario.
6. Construcción de proteínas quiméricas entre la proteína heteróloga y señales de degradación de las proteínas celulares. En concreto, se pueden crear quimeras con la proteína LIMP-II y con ubiquitina. Estas señales conducen a la degradación de la proteína por el proteosoma o lisosomas celulares. Los péptidos resultantes son expuestos por el sistema de histocompatibilidad (MHC-II en el caso de LIMP-II y MHC-I en el caso de la ubiquitina). Estas construcciones tienen la ventaja de que mejoran la presentación de antígeno, que disminuyen la posible citotoxicidad de la proteína foránea y que se puede potenciar el tipo de respuesta inmunitaria que sea de interés, promoviendo una respuesta inmunitaria de tipo celular via T CD4⁺ (LIMP-II) o humoral via T CD8⁺ (ubiquitina).
7. Inclusión en los vectores virales de adyuvantes genéticos. Se puede coexpresar el antígeno junto con genes de citocinas, como IL-12 y IL-4, para promover las respuestas celulares o humorales, respectivamente.
8. Coadministración de vectores con adyuvantes convencionales autorizados. Se puede elegir el más apropiado en base al receptor "toll-like" que estimulan.

6. CONCLUSIONES

1. Se han construido dos vectores virales basados en el genoma de TGEV que incorporan secuencias que codifican proteínas de rotavirus. El vector rTGEV_{S-PTV}-VP7 contiene el gen ORF9 de rotavirus y el vector bicistrónico rTGEV_{S-PTV}-VP2/VP6 incluye los genes ORF2 y ORF6 de rotavirus. Los genes no esenciales 3a y 3b se han eliminado para clonar en su lugar los genes de interés.
2. Los vectores poseen una cinética de crecimiento similar a la del virus parental TGEV. El vector rTGEV_{S-PTV}-VP7 alcanza unos títulos similares y el virus rTGEV_{S-PTV}-VP2/VP6 replica con un título un logaritmo menor.
3. Los vectores virales desarrollados expresan las proteínas de rotavirus en cultivo de células ST. La expresión del vector bicistrónico origina VLPs de rotavirus intracelulares.
4. El tropismo de los vectores virales se ha modificado para que infecten células de ratón sustituyendo el dominio globular de la proteína de la espícula de TGEV por el de la espícula del virus MHV.
5. El virus con tropismo murino (rTGEV_{S-MHV}) replica a títulos elevados en células de origen murino LR7 y en células humanas Caco2 transfectadas con el receptor para el virus MHV.
6. El virus rTGEV_{S-MHV} presenta la misma cinética de crecimiento que el virus MHV, pero con un título un logaritmo menor. La infección de células de ratón por el virus rTGEV_{S-MHV} produce un efecto citopático y placas de lisis similares a las del virus MHV, aunque de menor tamaño.
7. Se ha aislado un clon estable del virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 tras cinco rondas de purificación en células murinas LR7, que produce una expresión de la proteína VP7 en el 20% de las células infectadas. No se ha aislado un clon estable del virus rTGEV_{S-MHV}-VP2/VP6, ni se ha observado la producción de VLPs en cultivos infectados con este vector bicistrónico.

8. El virus rTGEV_{S-MHV} infecta a ratones Balb/c y a ratones deficientes en la proteína STAT1 (STAT1^{-/-}), replicando en diferentes órganos como intestino, bazo, hígado, riñón y pulmón. El antígeno viral se detecta durante 4 días en ratones Balb/c y durante 6 días en ratones STAT1^{-/-}.
9. El virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 promueve una respuesta de anticuerpos séricos de clase IgG anti-TGEV cuando se administra por la vía intragástrica, combinada con la intranasal e intraperitoneal. El virus rTGEV_{S-MHV} induce una respuesta de anticuerpos séricos de clase IgA desde la segunda inoculación y de coproanticuerpos.
10. El virus rTGEV_{S-MHV}-VP7 promueve una respuesta de anticuerpos IgG séricos frente a rotavirus en ratones Balb/c inoculados por vía intraperitoneal. No se ha observado la producción de coproanticuerpos IgA frente a rotavirus. Los ratones STAT1^{-/-} no desarrollan una respuesta humoral frente a rotavirus.
11. El vector viral promueve preferentemente una respuesta de citocinas de tipo Th2, con un aumento de la IL-10 y del factor de crecimiento GM-CSF y bajos niveles de IFN- γ .
12. Los anticuerpos generados por ratones Balb/c hembras después de la inoculación del vector rTGEV_{S-MHV}-VP7 por vía intraperitoneal protegen parcialmente frente a la diarrea inducida por el virus homotípico en ratones lactantes.

BIBLIOGRAFÍA

- Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**(6671), 86-9.
- Almazan, F., Galan, C., and Enjuanes, L. (2004). The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J Virol* **78**(22), 12683-8.
- Almazan, F., Gonzalez, J. M., Penzes, Z., Izeta, A., Calvo, E., Plana-Duran, J., and Enjuanes, L. (2000). Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10), 5516-21.
- Alonso, S., Izeta, A., Sola, I., and Enjuanes, L. (2002a). Transcription regulatory sequences and mRNA expression levels in the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J Virol* **76**(3), 1293-308.
- Alonso, S., Sola, I., Teifke, J. P., Reimann, I., Izeta, A., Balasch, M., Plana-Duran, J., Moormann, R. J., and Enjuanes, L. (2002b). In vitro and in vivo expression of foreign genes by transmissible gastroenteritis coronavirus-derived minigenomes. *J Gen Virol* **83**(Pt 3), 567-79.
- Ampel, N. M. (1991). Plagues--what's past is present: thoughts on the origin and history of new infectious diseases. *Rev Infect Dis* **13**(4), 658-65.
- Andino, R., Silvera, D., Suggett, S. D., Achacoso, P. L., Miller, C. J., Baltimore, D., and Feinberg, M. B. (1994). Engineering poliovirus as a vaccine vector for the expression of diverse antigens. *Science* **265**(5177), 1448-51.
- Andrew, M. E., Boyle, D. B., Coupar, B. E., Reddy, D., Bellamy, A. R., and Both, G. W. (1992). Vaccinia-rotavirus VP7 recombinants protect mice against rotavirus-induced diarrhoea. *Vaccine* **10**(3), 185-91.
- Andrew, M. E., Boyle, D. B., Whitfield, P. L., Lockett, L. J., Anthony, I. D., Bellamy, A. R., and Both, G. W. (1990). The immunogenicity of VP7, a rotavirus antigen resident in the endoplasmic reticulum, is enhanced by cell surface expression. *J Virol* **64**(10), 4776-83.
- Arguelles, M. H., Villegas, G. A., Castello, A., Abrami, A., Ghiringhelli, P. D., Semorile, L., and Glikmann, G. (2000). VP7 and VP4 genotyping of human group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina. *J Clin Microbiol* **38**(1), 252-9.
- Arias, C. F., Romero, P., Alvarez, V., and Lopez, S. (1996). Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol* **70**(9), 5832-9.
- Ball, J. M., Tian, P., Zeng, C. Q., Morris, A. P., and Estes, M. K. (1996). Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science* **272**(5258), 101-4.
- Ballesteros, M. L., Sanchez, C. M., and Enjuanes, L. (1997). Two amino acid changes

- at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism. *Virology* **227**(2), 378-88.
- Banner, L. R., and Lai, M. M. (1991). Random nature of coronavirus RNA recombination in the absence of selection pressure. *Virology* **185**(1), 441-5.
- Barba-Spaeth, G., Longman, R. S., Albert, M. L., and Rice, C. M. (2005). Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *J Exp Med* **202**(9), 1179-84.
- Baric, R. S., Fu, K., Schaad, M. C., and Stohlman, S. A. (1990). Establishing a genetic recombination map for murine coronavirus strain A59 complementation groups. *Virology* **177**(2), 646-56.
- Baric, R. S., Nelson, G. W., Fleming, J. O., Deans, R. J., Keck, J. G., Casteel, N., and Stohlman, S. A. (1988). Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription. *J Virol* **62**(11), 4280-7.
- Baric, R. S., and Sims, A. C. (2005). Development of mouse hepatitis virus and SARS-CoV infectious cDNA constructs. *Curr Top Microbiol Immunol* **287**, 229-52.
- Baric, R. S., and Yount, B. (2000). Subgenomic negative-strand RNA function during mouse hepatitis virus infection. *J Virol* **74**(9), 4039-46.
- Baric, R. S., Yount, B., Hensley, L., Peel, S. A., and Chen, W. (1997). Episodic evolution mediates interspecies transfer of a murine coronavirus. *J Virol* **71**(3), 1946-55.
- Barlough, J. E., Stoddart, C. A., Sorresso, G. P., Jacobson, R. H., and Scott, F. W. (1984). Experimental inoculation of cats with canine coronavirus and subsequent challenge with feline infectious peritonitis virus. *Lab Anim Sci* **34**(6), 592-7.
- Barnes, G. L., Lund, J. S., Mitchell, S. V., De Bruyn, L., Piggford, L., Smith, A. L., Furmedge, J., Masendycz, P. J., Bugg, H. C., Bogdanovic-Sakran, N., Carlin, J. B., and Bishop, R. F. (2002). Early phase II trial of human rotavirus vaccine candidate RV3. *Vaccine* **20**(23-24), 2950-6.
- Barreda, D. R., Hanington, P. C., and Belosevic, M. (2004). Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol* **28**(5), 509-54.
- Barthold, S. W., and Smith, A. L. (1984). Mouse hepatitis virus strain--related patterns of tissue tropism in suckling mice. *Arch Virol* **81**(1-2), 103-12.
- Barthold, S. W., and Smith, A. L. (1992). Viremic dissemination of mouse hepatitis virus-JHM following intranasal inoculation of mice. *Arch Virol* **122**(1-2), 35-44.
- Beisner, B., Kool, D., Marich, A., and Holmes, I. H. (1998). Characterisation of G serotype dependent non-antibody inhibitors of rotavirus in normal mouse serum. *Arch Virol* **143**(7), 1277-94.

- Bernstein, D. I., McNeal, M. M., Schiff, G. M., and Ward, R. L. (1989). Induction and persistence of local rotavirus antibodies in relation to serum antibodies. *J Med Virol* **28**(2), 90-5.
- Bernstein, D. I., Sack, D. A., Rothstein, E., Reisinger, K., Smith, V. E., O'Sullivan, D., Spriggs, D. R., and Ward, R. L. (1999). Efficacy of live, attenuated, human rotavirus vaccine 89-12 in infants: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **354**(9175), 287-90.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Ciarlet, M., Crawford, S. E., Conner, M. E., and Estes, M. K. (2003). Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. *Vaccine* **21**(25-26), 3885-900.
- Bhandari, N., Sharma, P., Glass, R. I., Ray, P., Greenberg, H., Taneja, S., Saksena, M., Rao, C. D., Gentsch, J. R., Parashar, U., Maldonado, Y., Ward, R. L., and Bhan, M. K. (2006). Safety and immunogenicity of two live attenuated human rotavirus vaccine candidates, 116E and I321, in infants: results of a randomised controlled trial. *Vaccine* **24**(31-32), 5817-23.
- Block, S. L., Vesikari, T., Gouveia, M. G., Rivers, S. B., Adeyi, B. A., Dallas, M. J., Bauder, J., Boslego, J. W., and Heaton, P. M. (2007). Efficacy, immunogenicity, and safety of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine at the end of shelf life. *Pediatrics* **119**(1), 11-8.
- Blutt, S. E., and Conner, M. E. (2007). Rotavirus: to the gut and beyond! *Curr Opin Gastroenterol* **23**(1), 39-43.
- Blutt, S. E., Kirkwood, C. D., Parreno, V., Warfield, K. L., Ciarlet, M., Estes, M. K., Bok, K., Bishop, R. F., and Conner, M. E. (2003). Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet* **362**(9394), 1445-9.
- Blutt, S. E., Matson, D. O., Crawford, S. E., Staat, M. A., Azimi, P., Bennett, B. L., Piedra, P. A., and Conner, M. E. (2007). Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med* **4**(4), e121.
- Blutt, S. E., Warfield, K. L., O'Neal, C. M., Estes, M. K., and Conner, M. E. (2006). Host, viral, and vaccine factors that determine protective efficacy induced by rotavirus and virus-like particles (VLPs). *Vaccine* **24**(8), 1170-9.
- Bonaldo, M. C., Garratt, R. C., Caufour, P. S., Freire, M. S., Rodrigues, M. M., Nussenzweig, R. S., and Galler, R. (2002). Surface expression of an immunodominant malaria protein B cell epitope by yellow fever virus. *J Mol Biol* **315**(4), 873-85.
- Bonaldo, M. C., Garratt, R. C., Marchevsky, R. S., Coutinho, E. S., Jabor, A. V., Almeida, L. F., Yamamura, A. M., Duarte, A. S., Oliveira, P. J., Lizeu, J. O.,

- Camacho, L. A., Freire, M. S., and Galler, R. (2005). Attenuation of recombinant yellow fever 17D viruses expressing foreign protein epitopes at the surface. *J Virol* **79**(13), 8602-13.
- Bonaldo, M. C., Mello, S. M., Trindade, G. F., Rangel, A. A., Duarte, A. S., Oliveira, P. J., Freire, M. S., Kubelka, C. F., and Galler, R. (2007). Construction and characterization of recombinant flaviviruses bearing insertions between E and NS1 genes. *Virology* **364**, 115.
- Boorman, G. A., Luster, M. I., Dean, J. H., Campbell, M. L., Lauer, L. A., Talley, F. A., Wilson, R. E., and Collins, M. J. (1982). Peritoneal macrophage alterations caused by naturally occurring mouse hepatitis virus. *Am J Pathol* **106**(1), 110-7.
- Bos, E. C., Luytjes, W., van der Meulen, H. V., Koerten, H. K., and Spaan, W. J. (1996). The production of recombinant infectious DI-particles of a murine coronavirus in the absence of helper virus. *Virology* **218**(1), 52-60.
- Bosch, B. J., de Haan, C. A., and Rottier, P. J. (2004). Coronavirus spike glycoprotein, extended at the carboxy terminus with green fluorescent protein, is assembly competent. *J Virol* **78**(14), 7369-78.
- Bosch, B. J., de Haan, C. A., Smits, S. L., and Rottier, P. J. (2005). Spike protein assembly into the coronavirus: exploring the limits of its sequence requirements. *Virology* **334**(2), 306-18.
- Bosch, B. J., van der Zee, R., de Haan, C. A., and Rottier, P. J. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol* **77**(16), 8801-11.
- Both, G. W., Lockett, L. J., Janardhana, V., Edwards, S. J., Bellamy, A. R., Graham, F. L., Prevec, L., and Andrew, M. E. (1993). Protective immunity to rotavirus-induced diarrhoea is passively transferred to newborn mice from naive dams vaccinated with a single dose of a recombinant adenovirus expressing rotavirus VP7sc. *Virology* **193**(2), 940-50.
- Bouvet, J. P., and Fischetti, V. A. (1999). Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. *Infect Immun* **67**(6), 2687-91.
- Bredenbeek, P. J., Molenkamp, R., Spaan, W. J., Deubel, V., Marianneau, P., Salvato, M. S., Moshkoff, D., Zapata, J., Tikhonov, I., Patterson, J., Carrion, R., Ticer, A., Brasky, K., and Lukashevich, I. S. (2006). A recombinant Yellow Fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology* **345**(2), 299-304.
- Brierley, I., Digard, P., and Inglis, S. C. (1989). Characterization of an efficient coronavirus ribosomal frameshifting signal: requirement for an RNA pseudoknot. *Cell* **57**(4), 537-47.
- Britton, P., Evans, S., Dove, B., Davies, M., Casais, R., and Cavanagh, D. (2005).

- Generation of a recombinant avian coronavirus infectious bronchitis virus using transient dominant selection. *J Virol Methods* **123**(2), 203-11.
- Buesa, J., de Souza, C. O., Asensi, M., Martinez, C., Prat, J., and Gil, M. T. (2000). VP7 and VP4 genotypes among rotavirus strains recovered from children with gastroenteritis over a 3-year period in Valencia, Spain. *Eur J Epidemiol* **16**(6), 501-6.
- Buesa, J., Raga, J. V., Colomina, J., de Souza, C. O., Munoz, C., and Gil, M. T. (1999). Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize overlapping epitopes in the amino-terminal region of the VP7 glycoprotein. *Virology* **257**(2), 424-37.
- Burns, J. W., Siadat-Pajouh, M., Krishnaney, A. A., and Greenberg, H. B. (1996). Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science* **272**(5258), 104-7.
- Casais, R., Dove, B., Cavanagh, D., and Britton, P. (2003). Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *J Virol* **77**(16), 9084-9.
- Casais, R., Thiel, V., Siddell, S. G., Cavanagh, D., and Britton, P. (2001). Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol* **75**(24), 12359-69.
- CDC (1999). Intussusception among recipients of rotavirus vaccine--US, 1998-1999. *Ann Pharmacother* **33**(9), 1020-1.
- Ciarlet, M., Crawford, S. E., Barone, C., Bertolotti-Ciarlet, A., Ramig, R. F., Estes, M. K., and Conner, M. E. (1998). Subunit rotavirus vaccine administered parenterally to rabbits induces active protective immunity. *J Virol* **72**(11), 9233-46.
- Ciarlet, M., Crawford, S. E., and Estes, M. K. (2001). Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. *J Virol* **75**(23), 11834-50.
- Clements-Mann, M. L., Dudas, R., Hoshino, Y., Nehring, P., Sperber, E., Wagner, M., Stephens, I., Karron, R., Deforest, A., and Kapikian, A. Z. (2001). Safety and immunogenicity of live attenuated quadrivalent human-bovine (UK) reassortant rotavirus vaccine administered with childhood vaccines to infants. *Vaccine* **19**(32), 4676-84.
- Cohen, J., Laporte, J., Charpilienne, A., and Scherrer, R. (1979). Activation of rotavirus RNA polymerase by calcium chelation. *Arch Virol* **60**(3-4), 177-86.
- Coley, S. E., Lavi, E., Sawicki, S. G., Fu, L., Schelle, B., Karl, N., Siddell, S. G., and Thiel, V. (2005). Recombinant mouse hepatitis virus strain A59 from cloned, full-length cDNA replicates to high titers in vitro and is fully pathogenic in vivo. *J Virol* **79**(5), 3097-106.

- Cologna, R., and Hogue, B. G. (2000). Identification of a bovine coronavirus packaging signal. *J Virol* **74**(1), 580-3.
- Colomina, J., Gil, M. T., Codoner, P., and Buesa, J. (1998). Viral proteins VP2, VP6, and NSP2 are strongly precipitated by serum and fecal antibodies from children with rotavirus symptomatic infection. *J Med Virol* **56**(1), 58-65.
- Collins, A. R., Knobler, R. L., Powell, H., and Buchmeier, M. J. (1982). Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology* **119**(2), 358-71.
- Compton, S. R., Barthold, S. W., and Smith, A. L. (1993). The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses. *Lab Anim Sci* **43**(1), 15-28.
- Conner, M. E., Crawford, S. E., Barone, C., O'Neal, C., Zhou, Y. J., Fernandez, F., Parwani, A., Saif, L. J., Cohen, J., and Estes, M. K. (1996). Rotavirus subunit vaccines. *Arch Virol Suppl* **12**, 199-206.
- Cook, S. M., Glass, R. I., LeBaron, C. W., and Ho, M. S. (1990). Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ* **68**(2), 171-7.
- Correa, I., Jimenez, G., Sune, C., Bullido, M. J., and Enjuanes, L. (1988). Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Res* **10**(1), 77-93.
- Coste, A., Sirard, J. C., Johansen, K., Cohen, J., and Kraehenbuhl, J. P. (2000). Nasal immunization of mice with virus-like particles protects offspring against rotavirus diarrhea. *J Virol* **74**(19), 8966-71.
- Coulson, B. S., Grimwood, K., Hudson, I. L., Barnes, G. L., and Bishop, R. F. (1992). Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *J Clin Microbiol* **30**(7), 1678-84.
- Crawford, S. E., Labbe, M., Cohen, J., Burroughs, M. H., Zhou, Y. J., and Estes, M. K. (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol* **68**(9), 5945-52.
- Crawford, S. E., Mukherjee, S. K., Estes, M. K., Lawton, J. A., Shaw, A. L., Ramig, R. F., and Prasad, B. V. (2001). Trypsin cleavage stabilizes the rotavirus VP4 spike. *J Virol* **75**(13), 6052-61.
- Crotty, S., Miller, C. J., Lohman, B. L., Neagu, M. R., Compton, L., Lu, D., Lu, F. X., Fritts, L., Lifson, J. D., and Andino, R. (2001). Protection against simian immunodeficiency virus vaginal challenge by using Sabin poliovirus vectors. *J Virol* **75**(16), 7435-52.
- Cunliffe, N. A., Das, B. K., Ramachandran, M., Bhan, M. K., Glass, R. I., and Gentsch, J. R. (1997). Sequence analysis demonstrates that VP6, NSP1 and NSP4 genes of Indian neonatal rotavirus strain 116E are of human origin. *Virus Genes* **15**(1), 39-

- 44.
- Curtis, K. M., Yount, B., and Baric, R. S. (2002). Heterologous gene expression from transmissible gastroenteritis virus replicon particles. *J Virol* **76**(3), 1422-34.
- Chang, R. Y., Hofmann, M. A., Sethna, P. B., and Brian, D. A. (1994). A cis-acting function for the coronavirus leader in defective interfering RNA replication. *J Virol* **68**(12), 8223-31.
- Chasey, D. (1980). Investigation of immunoperoxidase-labelled rotavirus in tissue culture by light and electron microscopy. *J Gen Virol* **50**(1), 195-200.
- Chen, D., Luongo, C. L., Nibert, M. L., and Patton, J. T. (1999). Rotavirus open cores catalyze 5'-capping and methylation of exogenous RNA: evidence that VP3 is a methyltransferase. *Virology* **265**(1), 120-30.
- Chiba, S., Yokoyama, T., Nakata, S., Morita, Y., Urasawa, T., Taniguchi, K., Urasawa, S., and Nakao, T. (1986). Protective effect of naturally acquired homotypic and heterotypic rotavirus antibodies. *Lancet* **2**(8504), 417-21.
- Choi, A. H., McNeal, M. M., Basu, M., Bean, J. A., VanCott, J. L., Clements, J. D., and Ward, R. L. (2003). Functional mapping of protective epitopes within the rotavirus VP6 protein in mice belonging to different haplotypes. *Vaccine* **21**(7-8), 761-7.
- Choi, K. S., Huang, P., and Lai, M. M. (2002). Polypyrimidine-tract-binding protein affects transcription but not translation of mouse hepatitis virus RNA. *Virology* **303**(1), 58-68.
- Chrystie, I. L., Totterdell, B. M., and Banatvala, J. E. (1978). Asymptomatic endemic rotavirus infections in the newborn. *Lancet* **1**(8075), 1176-8.
- Dalton, K. P., and Rose, J. K. (2001). Vesicular stomatitis virus glycoprotein containing the entire green fluorescent protein on its cytoplasmic domain is incorporated efficiently into virus particles. *Virology* **279**(2), 414-21.
- Das, S., Varghese, V., Chaudhuri, S., Barman, P., Kojima, K., Dutta, P., Bhattacharya, S. K., Krishnan, T., Kobayashi, N., and Naik, T. N. (2004). Genetic variability of human rotavirus strains isolated from Eastern and Northern India. *J Med Virol* **72**(1), 156-61.
- Das Sarma, J., Fu, L., Tsai, J. C., Weiss, S. R., and Lavi, E. (2000). Demyelination determinants map to the spike glycoprotein gene of coronavirus mouse hepatitis virus. *J Virol* **74**(19), 9206-13.
- Daynes, R. A., Araneo, B. A., Dowell, T. A., Huang, K., and Dudley, D. (1990). Regulation of murine lymphokine production in vivo. III. The lymphoid tissue microenvironment exerts regulatory influences over T helper cell function. *J Exp Med* **171**(4), 979-96.
- de Groot, R. J., Lenstra, J. A., Luytjes, W., Niesters, H. G., Horzinek, M. C., van der

- Zeijst, B. A., and Spaan, W. J. (1987a). Sequence and structure of the coronavirus peplomer protein. *Adv Exp Med Biol* **218**, 31-8.
- de Groot, R. J., Luytjes, W., Horzinek, M. C., van der Zeijst, B. A., Spaan, W. J. M., and Lenstra, J. A. (1987b). Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses. *J Mol Biol* **196**, 963-66.
- de Haan, C. A., Haijema, B. J., Boss, D., Heuts, F. W., and Rottier, P. J. (2005). Coronaviruses as vectors: stability of foreign gene expression. *J Virol* **79**(20), 12742-51.
- de Haan, C. A., Stadler, K., Godeke, G. J., Bosch, B. J., and Rottier, P. J. (2004). Cleavage inhibition of the murine coronavirus spike protein by a furin-like enzyme affects cell-cell but not virus-cell fusion. *J Virol* **78**(11), 6048-54.
- de Haan, C. A., Te Lintelo, E., Li, Z., Raaben, M., Wurdinger, T., Bosch, B. J., and Rottier, P. J. (2006). Cooperative involvement of the S1 and S2 subunits of the murine coronavirus spike protein in receptor binding and extended host range. *J Virol* **80**(22), 10909-18.
- de Haan, C. A., van Genne, L., Stoop, J. N., Volders, H., and Rottier, P. J. (2003). Coronaviruses as vectors: position dependence of foreign gene expression. *J Virol* **77**(21), 11312-23.
- de Haan, C. A., Vennema, H., and Rottier, P. J. (2000). Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins. *J Virol* **74**(11), 4967-78.
- de Haan, C. A., Volders, H., Koetzner, C. A., Masters, P. S., and Rottier, P. J. (2002). Coronaviruses maintain viability despite dramatic rearrangements of the strictly conserved genome organization. *J Virol* **76**(24), 12491-502.
- de Souza, M. S., and Smith, A. L. (1991). Characterization of accessory cell function during acute infection of BALB/cByJ mice with mouse hepatitis virus (MHV), strain JHM. *Lab Anim Sci* **41**(2), 112-8.
- de Souza, M. S., Smith, A. L., and Bottomly, K. (1991). Infection of BALB/cByJ mice with the JHM strain of mouse hepatitis virus alters in vitro splenic T cell proliferation and cytokine production. *Lab Anim Sci* **41**(2), 99-105.
- de Vries, A. A., Glaser, A. L., Raamsman, M. J., de Haan, C. A., Sarnataro, S., Godeke, G. J., and Rottier, P. J. (2000). Genetic manipulation of equine arteritis virus using full-length cDNA clones: separation of overlapping genes and expression of a foreign epitope. *Virology* **270**(1), 84-97.
- de Vries, A. A., Glaser, A. L., Raamsman, M. J., and Rottier, P. J. (2001). Recombinant equine arteritis virus as an expression vector. *Virology* **284**(2), 259-76.
- DeDiego, M. L., Alvarez, E., Almazan, F., Rejas, M. T., Lamirande, E., Roberts, A., Shieh, W. J., Zaki, S. R., Subbarao, K., and Enjuanes, L. (2007). A severe acute

- respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol* **81**(4), 1701-13.
- Delmas, B., Gelfi, J., Kut, E., Sjostrom, H., Noren, O., and Laude, H. (1994). Determinants essential for the transmissible gastroenteritis virus-receptor interaction reside within a domain of aminopeptidase-N that is distinct from the enzymatic site. *J Virol* **68**(8), 5216-24.
- Delmas, B., and Laude, H. (1990). Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *J Virol* **64**(11), 5367-75.
- Delmas, O., Gardet, A., Chwetzoff, S., Breton, M., Cohen, J., Colard, O., Sapin, C., and Trugnan, G. (2004). Different ways to reach the top of a cell. Analysis of rotavirus assembly and targeting in human intestinal cells reveals an original raft-dependent, Golgi-independent apical targeting pathway. *Virology* **327**(2), 157-61.
- Dempsey, W. L., Smith, A. L., and Morahan, P. S. (1986). Effect of inapparent murine hepatitis virus infections on macrophages and host resistance. *J Leukoc Biol* **39**(5), 559-65.
- Dharakul, T., Labbe, M., Cohen, J., Bellamy, A. R., Street, J. E., Mackow, E. R., Fiore, L., Rott, L., and Greenberg, H. B. (1991). Immunization with baculovirus-expressed recombinant rotavirus proteins VP1, VP4, VP6, and VP7 induces CD8+ T lymphocytes that mediate clearance of chronic rotavirus infection in SCID mice. *J Virol* **65**(11), 5928-32.
- Dindzans, V. J., Zimmerman, B., Sherker, A., and Levy, G. A. (1987). Susceptibility to mouse hepatitis virus strain 3 in BALB/cJ mice: failure of immune cell proliferation and interleukin 2 production. *Adv Exp Med Biol* **218**, 411-20.
- Dormitzer, P. R., Both, G. W., and Greenberg, H. B. (1994). Presentation of neutralizing epitopes by engineered rotavirus VP7's expressed by recombinant vaccinia viruses. *Virology* **204**(1), 391-402.
- Dormitzer, P. R., Greenberg, H. B., and Harrison, S. C. (2000). Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers. *Virology* **277**(2), 420-8.
- Dormitzer, P. R., Ho, D. Y., Mackow, E. R., Mocarski, E. S., and Greenberg, H. B. (1992). Neutralizing epitopes on herpes simplex virus-1-expressed rotavirus VP7 are dependent on coexpression of other rotavirus proteins. *Virology* **187**(1), 18-32.
- Dowling, W., Denisova, E., LaMonica, R., and Mackow, E. R. (2000). Selective membrane permeabilization by the rotavirus VP5* protein is abrogated by mutations in an internal hydrophobic domain. *J Virol* **74**(14), 6368-76.
- Doyle, L. P., and Hutchings, L. M. (1946). A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* **108**, 257-259.
- Dunn, S. J., Greenberg, H. B., Ward, R. L., Nakagomi, O., Burns, J. W., Vo, P. T., Pax,

- K. A., Das, M., Gowda, K., and Rao, C. D. (1993). Serotypic and genotypic characterization of human serotype 10 rotaviruses from asymptomatic neonates. *J Clin Microbiol* **31**(1), 165-9.
- Durbin, J. E., Hackenmiller, R., Simon, M. C., and Levy, D. E. (1996). Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* **84**(3), 443-50.
- Dyall-Smith, M. L., Lazdins, I., Tregear, G. W., and Holmes, I. H. (1986). Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(10), 3465-8.
- Enjuanes, L., Almazan, F., and Ortego, J. (2003). Virus-based vectors for gene expression in mammalian cells: Coronavirus. In "Gene transfer and expression in mammalian cells." (S. C. Makrides., Ed.), Vol. 38, pp. 151-68. ELSEVIER, Paris.
- Enjuanes, L., Almazan, F., Sola, I., and Zuniga, S. (2006). Biochemical aspects of coronavirus replication and virus-host interaction. *Annu Rev Microbiol* **60**, 211-30.
- Enjuanes, L., Brian, D., Cavanagh, D., Holmes, K., Lai, M. M. C., Laude, H., Masters, P., Rottier, P., Siddell, S. G., Spaan, W. J. M., Taguchi, F., and Talbot, P. (2000a). "Coronaviridae." Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. (M. H. V. van Regenmortel, Fauquet, C.M., D. H. L. Bishop, Carsten, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., D. J. McGeoch, Maniloff, J., Mayo, M.A., Pringle, C.R., and R. B. Wickner, Eds.), pp. 835–849 Academic Press, New York.
- Enjuanes, L., Dediego, M. L., Alvarez, E., Deming, D., Sheahan, T., and Baric, R. (2007). Vaccines to prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus-induced disease. *Virus Res*.
- Enjuanes, L., Gorbalenya, A. E., De Groot, R. J., Cowley, J. A., Spaan, W., Ziebuhr, J., and Snijder, E. (2008). "The Nidovirales." Encyclopedia of Virology, Third Edition (B. W. J. Mahy, M. Van Regenmortel, P. Walker, and D. Majumder-Russell, Eds.) Elsevier Ltd, Oxford.
- Enjuanes, L., Sola, I., Alonso, S., Escors, D., and Zuniga, S. (2005). Coronavirus reverse genetics and development of vectors for gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* **287**, 161-97.
- Enjuanes, L., Spaan, W., Snijder, E., and Cavanagh, D. (2000b). "Nidovirales." Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses (M. H. V. van Regenmortel, Fauquet, C.M., D. H. L. Bishop, Carsten, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., D. J. McGeoch, Maniloff, J., Mayo, M.A., Pringle, C.R., and R. B. Wickner, Eds.) Academic Press, New York.
- Enjuanes, L., and Van der Zeijst, B. A. M. (1995). Molecular basis of transmissible gastroenteritis coronavirus epidemiology. In "The Coronaviridae" (S. G. Siddell,

- Ed.). Plenum Press, New York.
- Escors, D., Izeta, A., Capiscol, C., and Enjuanes, L. (2003). Transmissible gastroenteritis coronavirus packaging signal is located at the 5' end of the virus genome. *J Virol* **77**(14), 7890-902.
- Escors, D., Ortego, J., Laude, H., and Enjuanes, L. (2001). The membrane M protein carboxy terminus binds to transmissible gastroenteritis coronavirus core and contributes to core stability. *J Virol* **75**(3), 1312-24.
- Estes, M. K. (2001). "Rotaviruses and their replication." Fields virology, 4th edition (D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.) Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Estes, M. K., and Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* **53**(4), 410-49.
- Estes, M. K., Graham, D. Y., and Mason, B. B. (1981). Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J Virol* **39**(3), 879-88.
- Estes, M. K., and Morris, A. P. (1999). A viral enterotoxin. A new mechanism of virus-induced pathogenesis. *Adv Exp Med Biol* **473**, 73-82.
- Evans, S., Cavanagh, D., and Britton, P. (2000). Utilizing fowlpox virus recombinants to generate defective RNAs of the coronavirus infectious bronchitis virus. *J Gen Virol* **81**(Pt 12), 2855-65.
- Even, C., Rowland, R. R., and Plagemann, P. G. (1995). Mouse hepatitis virus infection of mice causes long-term depletion of lactate dehydrogenase-elevating virus-permissive macrophages and T lymphocyte alterations. *Virus Res* **39**(2-3), 355-64.
- Feng, N., Lawton, J. A., Gilbert, J., Kuklin, N., Vo, P., Prasad, B. V., and Greenberg, H. B. (2002). Inhibition of rotavirus replication by a non-neutralizing, rotavirus VP6-specific IgA mAb. *J Clin Invest* **109**(9), 1203-13.
- Feng, N., Vo, P. T., Chung, D., Vo, T. V., Hoshino, Y., and Greenberg, H. B. (1997). Heterotypic protection following oral immunization with live heterologous rotaviruses in a mouse model. *J Infect Dis* **175**(2), 330-41.
- Figlerowicz, M., Alejska, M., and Kurzynska-Kokorniak, A. (2003). Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med Res Rev* **23**(4), 488-518.
- Finbloom, D. S., and Winestock, K. D. (1995). IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol* **155**(3), 1079-90.
- Finke, D., Brinckmann, U. G., ter Meulen, V., and Liebert, U. G. (1995). Gamma interferon is a major mediator of antiviral defense in experimental measles virus-induced encephalitis. *J Virol* **69**(9), 5469-74.
- Fiore, L., Dunn, S. J., Ridolfi, B., Ruggeri, F. M., Mackow, E. R., and Greenberg, H. B.

- (1995). Antigenicity, immunogenicity and passive protection induced by immunization of mice with baculovirus-expressed VP7 protein from rhesus rotavirus. *J Gen Virol* **76 (Pt 8)**, 1981-8.
- Fiore, L., Greenberg, H. B., and Mackow, E. R. (1991). The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin. *Virology* **181(2)**, 553-63.
- Fischer, F., Peng, D., Hingley, S. T., Weiss, S. R., and Masters, P. S. (1997a). The internal open reading frame within the nucleocapsid gene of mouse hepatitis virus encodes a structural protein that is not essential for viral replication. *J Virol* **71(2)**, 996-1003.
- Fischer, F., Stegen, C. F., Koetzner, C. A., and Masters, P. S. (1997b). Analysis of a recombinant mouse hepatitis virus expressing a foreign gene reveals a novel aspect of coronavirus transcription. *J Virol* **71(7)**, 5148-60.
- Fischer, F., Stegen, C. F., Koetzner, C. A., and Masters, P. S. (1998). Construction of a mouse hepatitis virus recombinant expressing a foreign gene. *Adv Exp Med Biol* **440**, 291-5.
- Franco, M. A., Angel, J., and Greenberg, H. B. (2006). Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine* **24(15)**, 2718-31.
- Franco, M. A., and Greenberg, H. B. (1999). Immunity to rotavirus infection in mice. *J Infect Dis* **179 Suppl 3**, S466-9.
- Frolov, I., Frolova, E., and Schlesinger, S. (1997). Sindbis virus replicons and Sindbis virus: assembly of chimeras and of particles deficient in virus RNA. *J Virol* **71(4)**, 2819-29.
- Frolov, I., Hoffman, T. A., Pragai, B. M., Dryga, S. A., Huang, H. V., Schlesinger, S., and Rice, C. M. (1996). Alphavirus-based expression vectors: strategies and applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93(21)**, 11371-7.
- Gardner, J. P., Frolov, I., Perri, S., Ji, Y., MacKichan, M. L., zur Megede, J., Chen, M., Belli, B. A., Driver, D. A., Sherrill, S., Greer, C. E., Otten, G. R., Barnett, S. W., Liu, M. A., Dubensky, T. W., and Polo, J. M. (2000). Infection of human dendritic cells by a sindbis virus replicon vector is determined by a single amino acid substitution in the E2 glycoprotein. *J Virol* **74(24)**, 11849-57.
- Geyer, A., Sebata, T., Peenze, I., and Steele, A. (1995). A molecular epidemiological study of porcine rotaviruses. *J S Afr Vet Assoc* **66(4)**, 202-5.
- Gilger, M. A., Matson, D. O., Conner, M. E., Rosenblatt, H. M., Finegold, M. J., and Estes, M. K. (1992). Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *J Pediatr* **120(6)**, 912-7.
- Glass, R. I., Bhan, M. K., Ray, P., Bahl, R., Parashar, U. D., Greenberg, H., Rao, C. D., Bhandari, N., Maldonado, Y., Ward, R. L., Bernstein, D. I., and Gentsch, J. R.

- (2005). Development of candidate rotavirus vaccines derived from neonatal strains in India. *J Infect Dis* **192 Suppl 1**, S30-5.
- Glass, R. I., Parashar, U. D., Bresee, J. S., Turcios, R., Fischer, T. K., Widdowson, M. A., Jiang, B., and Gentsch, J. R. (2006). Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges. *Lancet* **368**(9532), 323-32.
- Godeke, G. J., de Haan, C. A., Rossen, J. W., Vennema, H., and Rottier, P. J. (2000). Assembly of spikes into coronavirus particles is mediated by the carboxy-terminal domain of the spike protein. *J Virol* **74**(3), 1566-71.
- Goebel, S. J., Hsue, B., Dombrowski, T. F., and Masters, P. S. (2004). Characterization of the RNA components of a putative molecular switch in the 3' untranslated region of the murine coronavirus genome. *J Virol* **78**(2), 669-82.
- Gonzalez, J. M., Penzes, Z., Almazan, F., Calvo, E., and Enjuanes, L. (2002). Stabilization of a full-length infectious cDNA clone of transmissible gastroenteritis coronavirus by insertion of an intron. *J Virol* **76**(9), 4655-61.
- Gonzalez, S. A., and Affranchino, J. L. (1995). Assembly of double-layered virus-like particles in mammalian cells by coexpression of human rotavirus VP2 and VP6. *J Gen Virol* **76 (Pt 9)**, 2357-60.
- Gorbalenya, A. E., Snijder, E. J., and Spaan, W. J. (2004). Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus. *J Virol* **78**(15), 7863-6.
- Graham, D. Y., Sackman, J. W., and Estes, M. K. (1984). Pathogenesis of rotavirus-induced diarrhea. Preliminary studies in miniature swine piglet. *Dig Dis Sci* **29**(11), 1028-35.
- Graham, M. B., Braciale, V. L., and Braciale, T. J. (1994). Influenza virus-specific CD4+ T helper type 2 T lymphocytes do not promote recovery from experimental virus infection. *J Exp Med* **180**(4), 1273-82.
- Gunn, P. R., Sato, F., Powell, K. F., Bellamy, A. R., Napier, J. R., Harding, D. R., Hancock, W. S., Siegman, L. J., and Both, G. W. (1985). Rotavirus neutralizing protein VP7: antigenic determinants investigated by sequence analysis and peptide synthesis. *J Virol* **54**(3), 791-7.
- Hackney, K., Cavanagh, D., Kaiser, P., and Britton, P. (2003). In vitro and in ovo expression of chicken gamma interferon by a defective RNA of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol* **77**(10), 5694-702.
- Haelterman, E. O., and Pensaert, M. (1967). Pathogenesis of transmissible gastroenteritis of swine. In "Proc. 18th World Vet. Congress", Vol. 2, pp. 569-572.
- Haijema, B. J., Volders, H., and Rottier, P. J. (2004). Live, attenuated coronavirus vaccines through the directed deletion of group-specific genes provide protection against feline infectious peritonitis. *J Virol* **78**(8), 3863-71.

- Hampton, T. (2005). Bats may be SARS reservoir. *Jama* **294**(18), 2291.
- Herweijer, H., Latendresse, J. S., Williams, P., Zhang, G., Danko, I., Schlesinger, S., and Wolff, J. A. (1995). A plasmid-based self-amplifying Sindbis virus vector. *Hum Gene Ther* **6**(9), 1161-7.
- Hill, H. T. (1989). Preventing epizootic TGE from becoming enzootic TGE. *Veterinary Medicine* **84**, 432-5.
- Hjelt, K., Grauballe, P. C., Schiøtz, P. O., Andersen, L., and Krasilnikoff, P. A. (1985). Intestinal and serum immune response to a naturally acquired rotavirus gastroenteritis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **4**(1), 60-6.
- Hjelt, K., Paerregaard, A., Nielsen, O. H., Grauballe, P. C., Gaarslev, K., Holten-Andersen, W., Tvede, M., Orskov, F., and Krasilnikoff, P. A. (1987). Acute gastroenteritis in children attending day-care centres with special reference to rotavirus infections. I. Aetiology and epidemiologic aspects. *Acta Paediatr Scand* **76**(5), 754-62.
- Hofmann, M. A., and Brian, D. A. (1991). The 5' end of coronavirus minus-strand RNAs contains a short poly(U) tract. *J Virol* **65**(11), 6331-3.
- Hofmann, M. A., Sethna, P. B., and Brian, D. A. (1990). Bovine coronavirus mRNA replication continues throughout persistent infection in cell culture. *J Virol* **64**(9), 4108-14.
- Hogan, R. J., Gao, G., Rowe, T., Bell, P., Flieder, D., Paragas, J., Kobinger, G. P., Wivel, N. A., Crystal, R. G., Boyer, J., Feldmann, H., Voss, T. G., and Wilson, J. M. (2004). Resolution of primary severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection requires Stat1. *J Virol* **78**(20), 11416-21.
- Hoshino, Y., and Kapikian, A. Z. (1994). Rotavirus vaccine development for the prevention of severe diarrhea in infants and young children. *Trends Microbiol* **2**(7), 242-9.
- Hoshino, Y., and Kapikian, A. Z. (2000). Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J Health Popul Nutr* **18**(1), 5-14.
- Hsue, B., Hartshorne, T., and Masters, P. S. (2000). Characterization of an essential RNA secondary structure in the 3' untranslated region of the murine coronavirus genome. *J Virol* **74**(15), 6911-21.
- Hsue, B., and Masters, P. S. (1997). A bulged stem-loop structure in the 3' untranslated region of the genome of the coronavirus mouse hepatitis virus is essential for replication. *J Virol* **71**(10), 7567-78.
- Hsue, B., and Masters, P. S. (1999). Insertion of a new transcriptional unit into the genome of mouse hepatitis virus. *J Virol* **73**(7), 6128-35.

- Huang, J. A., Wang, L., Firth, S., Phelps, A., Reeves, P., and Holmes, I. (2000). Rotavirus VP7 epitope mapping using fragments of VP7 displayed on phages. *Vaccine* **18**(21), 2257-65.
- Hurst, K. R., Kuo, L., Koetzner, C. A., Ye, R., Hsue, B., and Masters, P. S. (2005). A major determinant for membrane protein interaction localizes to the carboxy-terminal domain of the mouse coronavirus nucleocapsid protein. *J Virol* **79**(21), 13285-97.
- Ijaz, M. K., Alkarmi, T. O., el-Mekki, A. W., Galadari, S. H., Dar, F. K., and Babiuk, L. A. (1995). Priming and induction of anti-rotavirus antibody response by synthetic peptides derived from VP7 and VP4. *Vaccine* **13**(4), 331-8.
- Iturriza-Gomara, M., Green, J., Brown, D. W., Ramsay, M., Desselberger, U., and Gray, J. J. (2000). Molecular epidemiology of human group A rotavirus infections in the United Kingdom between 1995 and 1998. *J Clin Microbiol* **38**(12), 4394-401.
- Izeta, A., Smerdou, C., Alonso, S., Penzes, Z., Mendez, A., Plana-Duran, J., and Enjuanes, L. (1999). Replication and packaging of transmissible gastroenteritis coronavirus-derived synthetic minigenomes. *J Virol* **73**(2), 1535-45.
- Jacobs, L., Spaan, W. J., Horzinek, M. C., and van der Zeijst, B. A. (1981). Synthesis of subgenomic mRNA's of mouse hepatitis virus is initiated independently: evidence from UV transcription mapping. *J Virol* **39**(2), 401-6.
- Jarvis, T. C., and Kirkegaard, K. (1991). The polymerase in its labyrinth: mechanisms and implications of RNA recombination. *Trends Genet* **7**(6), 186-91.
- Jayaram, H., Estes, M. K., and Prasad, B. V. (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res* **101**(1), 67-81.
- Joensuu, J., Koskenniemi, E., Pang, X. L., and Vesikari, T. (1997). Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. *Lancet* **350**(9086), 1205-9.
- Johnson, M. A., Misra, R. M., Lardelli, M., Messina, M., Ephraums, C., Reeves, P. R., Bolcevic, Z., Noel, J. S., Hum, C. P., Van Mai, H., and et al. (1989). Synthesis in *Escherichia coli* of the major glycoprotein of human rotavirus: analysis of the antigenic regions. *Gene* **84**(1), 73-81.
- Jones, C. T., Patkar, C. G., and Kuhn, R. J. (2005). Construction and applications of yellow fever virus replicons. *Virology* **331**(2), 247-59.
- Joo, M., and Makino, S. (1995). The effect of two closely inserted transcription consensus sequences on coronavirus transcription. *J Virol* **69**(1), 272-80.
- Jourdan, N., Maurice, M., Delautier, D., Quero, A. M., Servin, A. L., and Trugnan, G. (1997). Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi

- apparatus. *J Virol* **71**(11), 8268-78.
- Kafri, T., van Praag, H., Ouyang, L., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1999). A packaging cell line for lentivirus vectors. *J Virol* **73**(1), 576-84.
- Kaljot, K. T., Shaw, R. D., Rubin, D. H., and Greenberg, H. B. (1988). Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J Virol* **62**(4), 1136-44.
- Kapikian, A. Z., Hoshino, Y., and Chanock, R. M. (2001). Rotaviruses. In "Fields virology, 4th edition" (D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), pp. 1787–833. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Kapikian, A. Z., Hoshino, Y., Chanock, R. M., and Perez-Schael, I. (1996). Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J Infect Dis* **174 Suppl 1**, S65-72.
- Kapikian, A. Z., Simonsen, L., Vesikari, T., Hoshino, Y., Morens, D. M., Chanock, R. M., La Montagne, J. R., and Murphy, B. R. (2005). A hexavalent human rotavirus-bovine rotavirus (UK) reassortant vaccine designed for use in developing countries and delivered in a schedule with the potential to eliminate the risk of intussusception. *J Infect Dis* **192 Suppl 1**, S22-9.
- Karst, S. M., Wobus, C. E., Lay, M., Davidson, J., and Virgin, H. W. t. (2003). STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* **299**(5612), 1575-8.
- Keljo, D. J., Kuhn, M., and Smith, A. (1988). Acidification of endosomes is not important for the entry of rotavirus into the cell. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **7**(2), 257-63.
- Khromykh, A. A., Sedlak, P. L., Guyatt, K. J., Hall, R. A., and Westaway, E. G. (1999). Efficient trans-complementation of the flavivirus kunjin NS5 protein but not of the NS1 protein requires its coexpression with other components of the viral replicase. *J Virol* **73**(12), 10272-80.
- Kim, Y., Chang, K. O., Kim, W. Y., and Saif, L. J. (2002). Production of hybrid double- or triple-layered virus-like particles of group A and C rotaviruses using a baculovirus expression system. *Virology* **302**(1), 1-8.
- Kirkegaard, K., and Baltimore, D. (1986). The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* **47**(3), 433-43.
- Kirkwood, C., Masendycz, P. J., and Coulson, B. S. (1993). Characteristics and location of cross-reactive and serotype-specific neutralization sites on VP7 of human G type 9 rotaviruses. *Virology* **196**(1), 79-88.
- Kirkwood, C. D., Bishop, R. F., and Coulson, B. S. (1996). Human rotavirus VP4 contains strain-specific, serotype-specific and cross-reactive neutralization sites. *Arch Virol* **141**(3-4), 587-600.

- Koetzner, C. A., Parker, M. M., Ricard, C. S., Sturman, L. S., and Masters, P. S. (1992). Repair and mutagenesis of the genome of a deletion mutant of the coronavirus mouse hepatitis virus by targeted RNA recombination. *J Virol* **66**(4), 1841-8.
- Kramarz, P., France, E. K., Destefano, F., Black, S. B., Shinefield, H., Ward, J. I., Chang, E. J., Chen, R. T., Shatin, D., Hill, J., Lieu, T., and Ogren, J. M. (2001). Population-based study of rotavirus vaccination and intussusception. *Pediatr Infect Dis J* **20**(4), 410-6.
- Krishnan, R., Chang, R. Y., and Brian, D. A. (1996). Tandem placement of a coronavirus promoter results in enhanced mRNA synthesis from the downstream-most initiation site. *Virology* **218**(2), 400-5.
- Krueger, D. K., Kelly, S. M., Lewicki, D. N., Ruffolo, R., and Gallagher, T. M. (2001). Variations in disparate regions of the murine coronavirus spike protein impact the initiation of membrane fusion. *J Virol* **75**(6), 2792-802.
- Kuklin, N. A., Rott, L., Feng, N., Conner, M. E., Wagner, N., Muller, W., and Greenberg, H. B. (2001). Protective intestinal anti-rotavirus B cell immunity is dependent on alpha 4 beta 7 integrin expression but does not require IgA antibody production. *J Immunol* **166**(3), 1894-902.
- Kuo, L., Godeke, G. J., Raamsman, M. J., Masters, P. S., and Rottier, P. J. (2000). Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier. *J Virol* **74**(3), 1393-406.
- Kuo, L., and Masters, P. S. (2002). Genetic evidence for a structural interaction between the carboxy termini of the membrane and nucleocapsid proteins of mouse hepatitis virus. *J Virol* **76**(10), 4987-99.
- Kuo, L., and Masters, P. S. (2003). The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. *J Virol* **77**(8), 4597-608.
- Lai, C. J., and Monath, T. P. (2003). Chimeric flaviviruses: novel vaccines against dengue fever, tick-borne encephalitis, and Japanese encephalitis. *Adv Virus Res* **61**, 469-509.
- Lai, M. M. (1986). Coronavirus leader-RNA-primed transcription: an alternative mechanism to RNA splicing. *Bioessays* **5**(6), 257-60.
- Lai, M. M., and Cavanagh, D. (1997). The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* **48**, 1-100.
- Lai, M. M., Liao, C. L., Lin, Y. J., and Zhang, X. (1994). Coronavirus: how a large RNA viral genome is replicated and transcribed. *Infect Agents Dis* **3**(2-3), 98-105.
- Lai, M. M. C. (1996). Recombination in large RNA viruses: coronaviruses. *Semin. Virol.* **7**, 381-388.

- Lai, M. M. C., and Holmes, K. V. (2001). Coronaviridae: The viruses and their replication. 4th edition ed. *In* "Fields Virology" (D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.), pp. 1163–1185. Lippincott, Philadelphia.
- Lardans, V., Godfraind, C., van der Logt, J. T., Heessen, W. A., Gonzalez, M. D., and Coutelier, J. P. (1996). Polyclonal B lymphocyte activation induced by mouse hepatitis virus A59 infection. *J Gen Virol* **77** (Pt 5), 1005-9.
- Larner, A. C., David, M., Feldman, G. M., Igarashi, K., Hackett, R. H., Webb, D. S., Sweitzer, S. M., Petricoin, E. F., 3rd, and Finbloom, D. S. (1993). Tyrosine phosphorylation of DNA binding proteins by multiple cytokines. *Science* **261**(5129), 1730-3.
- Lassnig, C., Sanchez, C. M., Egerbacher, M., Walter, I., Majer, S., Kolbe, T., Pallares, P., Enjuanes, L., and Muller, M. (2005). Development of a transgenic mouse model susceptible to human coronavirus 229E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(23), 8275-80.
- Lau, S. K., Woo, P. C., Li, K. S., Huang, Y., Tsoi, H. W., Wong, B. H., Wong, S. S., Leung, S. Y., Chan, K. H., and Yuen, K. Y. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(39), 14040-5.
- Laude, H., and Masters, P. S. (1995). The coronavirus nucleocapsid protein. *In* "The Coronaviridae" (S. G. Siddell, Ed.), pp. 115–139. Plenum, New York.
- Laude, H., Rasschaert, D., Delmas, B., Godet, M., Gelfi, J., and Charley, B. (1990). Molecular biology of transmissible gastroenteritis virus. *Vet Microbiol* **23**(1-4), 147-54.
- Lee, S. G., Kim, D. Y., Hyun, B. H., and Bae, Y. S. (2002). Novel design architecture for genetic stability of recombinant poliovirus: the manipulation of G/C contents and their distribution patterns increases the genetic stability of inserts in a poliovirus-based RPS-Vax vector system. *J Virol* **76**(4), 1649-62.
- Leparc-Goffart, I., Hingley, S. T., Chua, M. M., Phillips, J., Lavi, E., and Weiss, S. R. (1998). Targeted recombination within the spike gene of murine coronavirus mouse hepatitis virus-A59: Q159 is a determinant of hepatotropism. *J Virol* **72**(12), 9628-36.
- Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., Wang, H., Crameri, G., Hu, Z., Zhang, H., Zhang, J., McEachern, J., Field, H., Daszak, P., Eaton, B. T., Zhang, S., and Wang, L. F. (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* **310**(5748), 676-9.
- Liao, C. L., and Lai, M. M. (1994). Requirement of the 5'-end genomic sequence as an upstream cis-acting element for coronavirus subgenomic mRNA transcription. *J*

- Viol* **68**(8), 4727-37.
- Liao, C. L., Zhang, X., and Lai, M. M. (1995). Coronavirus defective-interfering RNA as an expression vector: the generation of a pseudorecombinant mouse hepatitis virus expressing hemagglutinin-esterase. *Virology* **208**(1), 319-27.
- Liljestrom, P., and Garoff, H. (1991). A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology (N Y)* **9**(12), 1356-61.
- Lin, Y. J., and Lai, M. M. (1993). Deletion mapping of a mouse hepatitis virus defective interfering RNA reveals the requirement of an internal and discontinuous sequence for replication. *J Virol* **67**(10), 6110-8.
- Lindenbach, B. D., and Rice, C. M. (1997). trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J Virol* **71**(12), 9608-17.
- Linhares, A. C., Velazquez, F. R., Perez-Schael, I., Saez-Llorens, X., Abate, H., Espinoza, F., Lopez, P., Macias-Parra, M., Ortega-Barria, E., Rivera-Medina, D. M., Rivera, L., Pavia-Ruz, N., Nunez, E., Damaso, S., Ruiz-Palacios, G. M., De Vos, B., O'Ryan, M., Gillard, P., and Bouckennooghe, A. (2008). Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Lancet* **371**(9619), 1181-9.
- Liu, D. X., Cavanagh, D., Green, P., and Inglis, S. C. (1991). A polycistronic mRNA specified by the coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* **184**(2), 531-44.
- Liu, M., Mattion, N. M., and Estes, M. K. (1992). Rotavirus VP3 expressed in insect cells possesses guanylyltransferase activity. *Virology* **188**(1), 77-84.
- Lundgren, O., Peregrin, A. T., Persson, K., Kordasti, S., Uhnoo, I., and Svensson, L. (2000). Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science* **287**(5452), 491-5.
- Lundgren, O., and Svensson, L. (2001). Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect* **3**(13), 1145-56.
- Lundstrom, K. (2003). Alphavirus vectors for vaccine production and gene therapy. *Expert Rev Vaccines* **2**(3), 447-59.
- Luo, Z., Matthews, A. M., and Weiss, S. R. (1999). Amino acid substitutions within the leucine zipper domain of the murine coronavirus spike protein cause defects in oligomerization and the ability to induce cell-to-cell fusion. *J Virol* **73**(10), 8152-9.
- Luo, Z., and Weiss, S. R. (1998a). Roles in cell-to-cell fusion of two conserved hydrophobic regions in the murine coronavirus spike protein. *Virology* **244**(2), 483-94.
- Luo, Z. L., and Weiss, S. R. (1998b). Mutational analysis of fusion peptide-like regions

- in the mouse hepatitis virus strain A59 spike protein. *Adv Exp Med Biol* **440**, 17-23.
- MacDonald, G. H., and Johnston, R. E. (2000). Role of dendritic cell targeting in Venezuelan equine encephalitis virus pathogenesis. *J Virol* **74**(2), 914-22.
- Makino, S., Yokomori, K., and Lai, M. M. (1990). Analysis of efficiently packaged defective interfering RNAs of murine coronavirus: localization of a possible RNA-packaging signal. *J Virol* **64**(12), 6045-53.
- Marra, M. A., Jones, S. J., Astell, C. R., Holt, R. A., Brooks-Wilson, A., Butterfield, Y. S., Khattra, J., Asano, J. K., Barber, S. A., Chan, S. Y., Cloutier, A., Coughlin, S. M., Freeman, D., Girn, N., Griffith, O. L., Leach, S. R., Mayo, M., McDonald, H., Montgomery, S. B., Pandoh, P. K., Petrescu, A. S., Robertson, A. G., Schein, J. E., Siddiqui, A., Smailus, D. E., Stott, J. M., Yang, G. S., Plummer, F., Andonov, A., Artsob, H., Bastien, N., Bernard, K., Booth, T. F., Bowness, D., Czub, M., Drebot, M., Fernando, L., Flick, R., Garbutt, M., Gray, M., Grolla, A., Jones, S., Feldmann, H., Meyers, A., Kabani, A., Li, Y., Normand, S., Stroher, U., Tipples, G. A., Tyler, S., Vogrig, R., Ward, D., Watson, B., Brunham, R. C., Kraiden, M., Petric, M., Skowronski, D. M., Upton, C., and Roper, R. L. (2003). The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* **300**(5624), 1399-404.
- Mason, P. W., Shustov, A. V., and Frolov, I. (2006). Production and characterization of vaccines based on flaviviruses defective in replication. *Virology* **351**(2), 432-43.
- Masters, P. S. (1999). Reverse genetics of the largest RNA viruses. *Adv Virus Res* **53**, 245-64.
- Masters, P. S. (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* **66**, 193-292.
- Masters, P. S., Koetzner, C. A., Kerr, C. A., and Heo, Y. (1994). Optimization of targeted RNA recombination and mapping of a novel nucleocapsid gene mutation in the coronavirus mouse hepatitis virus. *J Virol* **68**(1), 328-37.
- Masters, P. S., and Rottier, P. J. (2005). Coronavirus reverse genetics by targeted RNA recombination. *Curr Top Microbiol Immunol* **287**, 133-59.
- Matson, D. O., O'Ryan, M. L., Herrera, I., Pickering, L. K., and Estes, M. K. (1993). Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. *J Infect Dis* **167**(3), 577-83.
- Matsuno, S., Inouye, S., and Kono, R. (1977). Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody in human sera. *J Clin Microbiol* **5**(1), 1-4.
- Matsuyama, S., and Taguchi, F. (2002). Receptor-induced conformational changes of murine coronavirus spike protein. *J Virol* **76**(23), 11819-26.
- McAllister, A., Arbetman, A. E., Mandl, S., Pena-Rossi, C., and Andino, R. (2000). Recombinant yellow fever viruses are effective therapeutic vaccines for treatment

- of murine experimental solid tumors and pulmonary metastases. *J Virol* **74**(19), 9197-205.
- McClurkin, A. W., and Norman, J. O. (1966). Studies on transmissible gastroenteritis of swine. II. Selected characteristics of a cytopathogenic virus common to five isolates from transmissible gastroenteritis. *Can J Comp Med Vet Sci* **30**(7), 190-8.
- McGoldrick, A., Lowings, J. P., and Paton, D. J. (1999). Characterisation of a recent virulent transmissible gastroenteritis virus from Britain with a deleted ORF 3a. *Arch Virol* **144**(4), 763-70.
- McGonigal, T. P., Turon, M. C., Komar-Hartnett, K., Kister, S. E., and Smith, R. E. (1992). Expression of the gene coding for the major outer capsid protein of SA-11 rotavirus in a baculovirus system. *Virus Res* **23**(1-2), 135-50.
- Mendez, E., Arias, C. F., and Lopez, S. (1996). Interactions between the two surface proteins of rotavirus may alter the receptor-binding specificity of the virus. *J Virol* **70**(2), 1218-22.
- Mendez, E., Lopez, S., Cuadras, M. A., Romero, P., and Arias, C. F. (1999). Entry of rotaviruses is a multistep process. *Virology* **263**(2), 450-9.
- Meraz, M. A., White, J. M., Sheehan, K. C., Bach, E. A., Rodig, S. J., Dighe, A. S., Kaplan, D. H., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Campbell, D., Carver-Moore, K., DuBois, R. N., Clark, R., Aguet, M., and Schreiber, R. D. (1996). Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* **84**(3), 431-42.
- Milligan, G. N., and Bernstein, D. I. (1995). Analysis of herpes simplex virus-specific T cells in the murine female genital tract following genital infection with herpes simplex virus type 2. *Virology* **212**(2), 481-9.
- Molenkamp, R., and Spaan, W. J. (1997). Identification of a specific interaction between the coronavirus mouse hepatitis virus A59 nucleocapsid protein and packaging signal. *Virology* **239**(1), 78-86.
- Monath, T. P. (2004). Yellow Fever Vaccine. In "Vaccine 4th ed." (P. S.A., and O. W.A., Eds.), pp. 1095–1176. Saunders Company, Philadelphia.
- Moreno, J. L., Zuniga, S., Enjuanes, L., and Sola, I. (2008). Identification of a coronavirus transcription enhancer. *J Virol* **82**(8), 3882-93.
- Morse, S. S. (1995). Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* **1**(1), 7-15.
- Mosmann, T. R., and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**, 145-73.
- Mueller, S., and Wimmer, E. (1998). Expression of foreign proteins by poliovirus

- polyprotein fusion: analysis of genetic stability reveals rapid deletions and formation of cardiovascularlike open reading frames. *J Virol* **72**(1), 20-31.
- Mumphrey, S. M., Changotra, H., Moore, T. N., Heimann-Nichols, E. R., Wobus, C. E., Reilly, M. J., Moghadamfalahi, M., Shukla, D., and Karst, S. M. (2007). Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses. *J Virol* **81**(7), 3251-63.
- Mutebi, J. P., Rijnbrand, R. C., Wang, H., Ryman, K. D., Wang, E., Fulop, L. D., Titball, R., and Barrett, A. D. (2004). Genetic relationships and evolution of genotypes of yellow fever virus and other members of the yellow fever virus group within the Flavivirus genus based on the 3' noncoding region. *J Virol* **78**(18), 9652-65.
- Nakata, S., Gatheru, Z., Ukae, S., Adachi, N., Kobayashi, N., Honma, S., Muli, J., Ogaja, P., Nyangao, J., Kiplagat, E., Tukei, P. M., and Chiba, S. (1999). Epidemiological study of the G serotype distribution of group A rotaviruses in Kenya from 1991 to 1994. *J Med Virol* **58**(3), 296-303.
- Narayanan, K., Chen, C. J., Maeda, J., and Makino, S. (2003). Nucleocapsid-independent specific viral RNA packaging via viral envelope protein and viral RNA signal. *J Virol* **77**(5), 2922-7.
- Narayanan, K., Maeda, A., Maeda, J., and Makino, S. (2000). Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J Virol* **74**(17), 8127-34.
- Narayanan, K., and Makino, S. (2001). Cooperation of an RNA packaging signal and a viral envelope protein in coronavirus RNA packaging. *J Virol* **75**(19), 9059-67.
- Navas, S., Seo, S. H., Chua, M. M., Sarma, J. D., Lavi, E., Hingley, S. T., and Weiss, S. R. (2001). Murine coronavirus spike protein determines the ability of the virus to replicate in the liver and cause hepatitis. *J Virol* **75**(5), 2452-7.
- Nelson, G. W., Stohlman, S. A., and Tahara, S. M. (2000). High affinity interaction between nucleocapsid protein and leader/intergenic sequence of mouse hepatitis virus RNA. *J Gen Virol* **81**(Pt 1), 181-8.
- Nilsson, M., von Bonsdorff, C. H., Weclawicz, K., Cohen, J., and Svensson, L. (1998). Assembly of viroplasm and virus-like particles of rotavirus by a Semliki Forest virus replicon. *Virology* **242**(2), 255-65.
- Normile, D. (2005). Virology. Researchers tie deadly SARS virus to bats. *Science* **309**(5744), 2154-5.
- O'Neal, C. M., Crawford, S. E., Estes, M. K., and Conner, M. E. (1997). Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity. *J Virol* **71**(11), 8707-17.

- O'Neal, C. M., Harriman, G. R., and Conner, M. E. (2000). Protection of the villus epithelial cells of the small intestine from rotavirus infection does not require immunoglobulin A. *J Virol* **74**(9), 4102-9.
- O'Ryan, M. L., Matson, D. O., Estes, M. K., and Pickering, L. K. (1994a). Acquisition of serum isotype-specific and G type-specific antirotavirus antibodies among children in day care centers. *Pediatr Infect Dis J* **13**(10), 890-5.
- O'Ryan, M. L., Matson, D. O., Estes, M. K., and Pickering, L. K. (1994b). Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. *J Infect Dis* **169**(3), 504-11.
- Ogra, P. L., and Ogra, S. S. (1973). Local antibody response to poliovaccine in the human female genital tract. *J Immunol* **110**(5), 1307-11.
- Opstelten, D. J., Raamsman, M. J., Wolfs, K., Horzinek, M. C., and Rottier, P. J. (1995). Envelope glycoprotein interactions in coronavirus assembly. *J Cell Biol* **131**(2), 339-49.
- Ortego, J., Escors, D., Laude, H., and Enjuanes, L. (2002). Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *J Virol* **76**(22), 11518-29.
- Ortego, J., Sola, I., Almazan, F., Ceriani, J. E., Riquelme, C., Balasch, M., Plana, J., and Enjuanes, L. (2003). Transmissible gastroenteritis coronavirus gene 7 is not essential but influences in vivo virus replication and virulence. *Virology* **308**(1), 13-22.
- Osborne, M. P., Haddon, S. J., Spencer, A. J., Collins, J., Starkey, W. G., Wallis, T. S., Clarke, G. J., Worton, K. J., Candy, D. C., and Stephen, J. (1988). An electron microscopic investigation of time-related changes in the intestine of neonatal mice infected with murine rotavirus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **7**(2), 236-48.
- Ozdarendeli, A., Ku, S., Rochat, S., Williams, G. D., Senanayake, S. D., and Brian, D. A. (2001). Downstream sequences influence the choice between a naturally occurring noncanonical and closely positioned upstream canonical heptameric fusion motif during bovine coronavirus subgenomic mRNA synthesis. *J Virol* **75**(16), 7362-74.
- Pacchia, A. L., Adelson, M. E., Kaul, M., Ron, Y., and Dougherty, J. P. (2001). An inducible packaging cell system for safe, efficient lentiviral vector production in the absence of HIV-1 accessory proteins. *Virology* **282**(1), 77-86.
- Padilla-Noriega, L., Dunn, S. J., Lopez, S., Greenberg, H. B., and Arias, C. F. (1995). Identification of two independent neutralization domains on the VP4 trypsin cleavage products VP5* and VP8* of human rotavirus ST3. *Virology* **206**(1), 148-54.

- Parashar, U. D., Gibson, C. J., Bresse, J. S., and Glass, R. I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* **12**(2), 304-6.
- Pasternak, A. O., Spaan, W. J., and Snijder, E. J. (2006). Nidovirus transcription: how to make sense...? *J Gen Virol* **87**(Pt 6), 1403-21.
- Pasternak, A. O., van den Born, E., Spaan, W. J., and Snijder, E. J. (2001). Sequence requirements for RNA strand transfer during nidovirus discontinuous subgenomic RNA synthesis. *EMBO J* **20**(24), 7220-8.
- Patton, J. T., and Spencer, E. (2000). Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* **277**(2), 217-25.
- Peng, D., Koetzner, C. A., and Masters, P. S. (1995a). Analysis of second-site revertants of a murine coronavirus nucleocapsid protein deletion mutant and construction of nucleocapsid protein mutants by targeted RNA recombination. *J Virol* **69**(6), 3449-57.
- Peng, D., Koetzner, C. A., McMahon, T., Zhu, Y., and Masters, P. S. (1995b). Construction of murine coronavirus mutants containing interspecies chimeric nucleocapsid proteins. *J Virol* **69**(9), 5475-84.
- Penzes, Z., Gonzalez, J. M., Calvo, E., Izeta, A., Smerdou, C., Mendez, A., Sanchez, C. M., Sola, I., Almazan, F., and Enjuanes, L. (2001). Complete genome sequence of transmissible gastroenteritis coronavirus PUR46-MAD clone and evolution of the purdue virus cluster. *Virus Genes* **23**(1), 105-18.
- Perez-Schael, I., Guntinas, M. J., Perez, M., Pagone, V., Rojas, A. M., Gonzalez, R., Cunto, W., Hoshino, Y., and Kapikian, A. Z. (1997). Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *N Engl J Med* **337**(17), 1181-7.
- Pesavento, J. B., Lawton, J. A., Estes, M. E., and Venkataram Prasad, B. V. (2001). The reversible condensation and expansion of the rotavirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4), 1381-6.
- Peter, G., and Myers, M. G. (2002). Intussusception, rotavirus, and oral vaccines: summary of a workshop. *Pediatrics* **110**(6), e67.
- Petrie, B. L., Graham, D. Y., Hanssen, H., and Estes, M. K. (1982). Localization of rotavirus antigens in infected cells by ultrastructural immunocytochemistry. *J Gen Virol* **63**(2), 457-67.
- Petrie, B. L., Greenberg, H. B., Graham, D. Y., and Estes, M. K. (1984). Ultrastructural localization of rotavirus antigens using colloidal gold. *Virus Res* **1**(2), 133-52.
- Pewe, L., Zhou, H., Netland, J., Tangudu, C., Olivares, H., Shi, L., Look, D., Gallagher, T., and Perlman, S. (2005). A severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-specific protein enhances virulence of an attenuated murine

- coronavirus. *J Virol* **79**(17), 11335-42.
- Phua, K. B., Emmanuel, S. C., Goh, P., Quak, S. H., Lee, B. W., Han, H. H., Ward, R. L., Bernstein, D. I., De Vos, B., and Bock, H. L. (2006). A rotavirus vaccine for infants: the Asian experience. *Ann Acad Med Singapore* **35**(1), 38-44.
- Poland, J. D., Calisher, C. H., Monath, T. P., Downs, W. G., and Murphy, K. (1981). Persistence of neutralizing antibody 30–35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull World Health Organ*, 59(6):895–900.
- Polo, J. M., Belli, B. A., Driver, D. A., Frolov, I., Sherrill, S., Hariharan, M. J., Townsend, K., Perri, S., Mento, S. J., Jolly, D. J., Chang, S. M., Schlesinger, S., and Dubensky, T. W., Jr. (1999). Stable alphavirus packaging cell lines for Sindbis virus and Semliki Forest virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(8), 4598-603.
- Porter, D. C., Ansardi, D. C., Choi, W. S., and Morrow, C. D. (1993). Encapsidation of genetically engineered poliovirus minireplicons which express human immunodeficiency virus type 1 Gag and Pol proteins upon infection. *J Virol* **67**(7), 3712-9.
- Prasad, B. V., Burns, J. W., Marietta, E., Estes, M. K., and Chiu, W. (1990). Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature* **343**(6257), 476-9.
- Prasad, B. V., Rothnagel, R., Zeng, C. Q., Jakana, J., Lawton, J. A., Chiu, W., and Estes, M. K. (1996). Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus. *Nature* **382**(6590), 471-3.
- Racaniello, V. R., and Baltimore, D. (1981). Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* **214**(4523), 916-9.
- Ramachandran, M., Gentsch, J. R., Parashar, U. D., Jin, S., Woods, P. A., Holmes, J. L., Kirkwood, C. D., Bishop, R. F., Greenberg, H. B., Urasawa, S., Gerna, G., Coulson, B. S., Taniguchi, K., Bresee, J. S., and Glass, R. I. (1998). Detection and characterization of novel rotavirus strains in the United States. *J Clin Microbiol* **36**(11), 3223-9.
- Ramig, R. F. (2004). Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* **78**(19), 10213-20.
- Rasko, J., Ed. (1997). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and its receptor. Colony-stimulating factors: molecular and cellular biology. Edited by P. Garland, P. Quesenberry, and D. Hilton. New York: Marcell Dekker.
- Redmond, M. J., Ijaz, M. K., Parker, M. D., Sabara, M. I., Dent, D., Gibbons, E., and Babiuk, L. A. (1993). Assembly of recombinant rotavirus proteins into virus-like particles and assessment of vaccine potential. *Vaccine* **11**(2), 273-81.

- Rennels, M. B., Glass, R. I., Dennehy, P. H., Bernstein, D. I., Pichichero, M. E., Zito, E. T., Mack, M. E., Davidson, B. L., and Kapikian, A. Z. (1996). Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines--report of the National Multicenter Trial. United States Rotavirus Vaccine Efficacy Group. *Pediatrics* **97**(1), 7-13.
- Riezebos-Brilman, A., de Mare, A., Bungener, L., Huckriede, A., Wilschut, J., and Daemen, T. (2006). Recombinant alphaviruses as vectors for anti-tumour and anti-microbial immunotherapy. *J Clin Virol* **35**(3), 233-43.
- Risco, C., Anton, I. M., Enjuanes, L., and Carrascosa, J. L. (1996). The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. *J Virol* **70**(7), 4773-7.
- Rodríguez-Díaz, J., Montava, R., García-Díaz, A., and Buesa, J. (2005). Humoral immune response to rotavirus NSP4 enterotoxin in Spanish children. *J Med Virol* **77**(2), 317-22.
- Rossen, J. W., Strous, G. J., Horzinek, M. C., and Rottier, P. J. (1997). Mouse hepatitis virus strain A59 is released from opposite sides of different epithelial cell types. *J Gen Virol* **78 (Pt 1)**, 61-9.
- Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., Penaranda, S., Bankamp, B., Maher, K., Chen, M. H., Tong, S., Tamin, A., Lowe, L., Frace, M., DeRisi, J. L., Chen, Q., Wang, D., Erdman, D. D., Peret, T. C., Burns, C., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Sanchez, A., Liffick, S., Holloway, B., Limor, J., McCaustland, K., Olsen-Rasmussen, M., Fouchier, R., Gunther, S., Osterhaus, A. D., Drosten, C., Pallansch, M. A., Anderson, L. J., and Bellini, W. J. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**(5624), 1394-9.
- Rottier, P. J., Nakamura, K., Schellen, P., Volders, H., and Haijema, B. J. (2005). Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J Virol* **79**(22), 14122-30.
- Rottier, P. J. M. (1995). The coronavirus membrane protein. In *"The Coronaviridae"* (S. G. Siddell, Ed.), pp. 115–139. Plenum, New York.
- Ruiz-Palacios, G. M., Perez-Schael, I., Velazquez, F. R., Abate, H., Breuer, T., Clemens, S. C., Chevart, B., Espinoza, F., Gillard, P., Innis, B. L., Cervantes, Y., Linhares, A. C., Lopez, P., Macias-Parra, M., Ortega-Barria, E., Richardson, V., Rivera-Medina, D. M., Rivera, L., Salinas, B., Pavia-Ruz, N., Salmeron, J., Ruttimann, R., Tinoco, J. C., Rubio, P., Nunez, E., Guerrero, M. L., Yarzabal, J. P., Damaso, S., Tornieporth, N., Saez-Llorens, X., Vergara, R. F., Vesikari, T.,

- Bouckenoghe, A., Clemens, R., De Vos, B., and O'Ryan, M. (2006). Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* **354**(1), 11-22.
- Ruiz, M. C., Alonso-Torre, S. R., Charpilienne, A., Vasseur, M., Michelangeli, F., Cohen, J., and Alvarado, F. (1994). Rotavirus interaction with isolated membrane vesicles. *J Virol* **68**(6), 4009-16.
- Saif, L. J. (2004). Animal coronaviruses: what can they teach us about the severe acute respiratory syndrome? *Rev Sci Tech* **23**(2), 643-60.
- Saif, L. J., and Sestak, K. (2005). Transmissible gastroenteritis. 9th ed. *In* "Diseases of swine" (J. J. Zimmerman, Ed.), pp. 489-516. Iowa State University Press, Ames.
- Salas-Vidal, E., Plebanski, M., Castro, S., Perales, G., Mata, E., Lopez, S., and Arias, C. F. (1990). Synthesis of the surface glycoprotein of rotavirus SA11 in the aroA strain of Salmonella typhimurium SL3261. *Res Microbiol* **141**(7-8), 883-6.
- Sanchez, C. M., Izeta, A., Sanchez-Morgado, J. M., Alonso, S., Sola, I., Balasch, M., Plana-Duran, J., and Enjuanes, L. (1999). Targeted recombination demonstrates that the spike gene of transmissible gastroenteritis coronavirus is a determinant of its enteric tropism and virulence. *J Virol* **73**(9), 7607-18.
- Sanchez, C. M., Jimenez, G., Laviada, M. D., Correa, I., Sune, C., Bullido, M., Gebauer, F., Smerdou, C., Callebaut, P., Escribano, J. M., and et al. (1990). Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology* **174**(2), 410-7.
- Santos, N., and Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* **15**(1), 29-56.
- Santosham, M., Moulton, L. H., Reid, R., Croll, J., Weatherholt, R., Ward, R., Forro, J., Zito, E., Mack, M., Brenneman, G., and Davidson, B. L. (1997). Efficacy and safety of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccine in Native American populations. *J Pediatr* **131**(4), 632-8.
- Sarawar, S. R., Sangster, M., Coffman, R. L., and Doherty, P. C. (1994). Administration of anti-IFN-gamma antibody to beta 2-microglobulin-deficient mice delays influenza virus clearance but does not switch the response to a T helper cell 2 phenotype. *J Immunol* **153**(3), 1246-53.
- Sarma, J. D., Scheen, E., Seo, S. H., Koval, M., and Weiss, S. R. (2002). Enhanced green fluorescent protein expression may be used to monitor murine coronavirus spread in vitro and in the mouse central nervous system. *J Neurovirol* **8**(5), 381-91.
- Sawicki, S. G., and Sawicki, D. L. (1990). Coronavirus transcription: subgenomic mouse hepatitis virus replicative intermediates function in RNA synthesis. *J Virol*

- 64**(3), 1050-6.
- Sawicki, S. G., and Sawicki, D. L. (2005). Coronavirus transcription: a perspective. *Curr Top Microbiol Immunol* **287**, 31-55.
- Sawicki, S. G., Sawicki, D. L., and Siddell, S. G. (2007). A contemporary view of coronavirus transcription. *J Virol* **81**(1), 20-9.
- Schelle, B., Karl, N., Ludewig, B., Siddell, S. G., and Thiel, V. (2005). Selective replication of coronavirus genomes that express nucleocapsid protein. *J Virol* **79**(11), 6620-30.
- Schickli, J. H., Zelus, B. D., Wentworth, D. E., Sawicki, S. G., and Holmes, K. V. (1997). The murine coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 from persistently infected murine cells exhibits an extended host range. *J Virol* **71**(12), 9499-507.
- Sethna, P. B., Hofmann, M. A., and Brian, D. A. (1991). Minus-strand copies of replicating coronavirus mRNAs contain antileaders. *J Virol* **65**(1), 320-5.
- Sethna, P. B., Hung, S. L., and Brian, D. A. (1989). Coronavirus subgenomic minus-strand RNAs and the potential for mRNA replicons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(14), 5626-30.
- Shaw, A. L., Rothnagel, R., Chen, D., Ramig, R. F., Chiu, W., and Prasad, B. V. (1993). Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell* **74**(4), 693-701.
- Shresta, S., Sharar, K. L., Prigozhin, D. M., Snider, H. M., Beatty, P. R., and Harris, E. (2005). Critical roles for both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways in the control of primary dengue virus infection in mice. *J Immunol* **175**(6), 3946-54.
- Smith, A. L., Bottomly, K., and Winograd, D. F. (1987). Altered splenic T cell function of BALB/cByJ mice infected with mouse hepatitis virus or Sendai virus. *J Immunol* **138**(10), 3426-30.
- Smits, S. L., van Vliet, A. L., Segeren, K., el Azzouzi, H., van Essen, M., and de Groot, R. J. (2005). Torovirus non-discontinuous transcription: mutational analysis of a subgenomic mRNA promoter. *J Virol* **79**(13), 8275-81.
- Sola, I., Alonso, S., Zuniga, S., Balasch, M., Plana-Duran, J., and Enjuanes, L. (2003). Engineering the transmissible gastroenteritis virus genome as an expression vector inducing lactogenic immunity. *J Virol* **77**(7), 4357-69.
- Sola, I., Moreno, J. L., Zuniga, S., Alonso, S., and Enjuanes, L. (2005). Role of nucleotides immediately flanking the transcription-regulating sequence core in coronavirus subgenomic mRNA synthesis. *J Virol* **79**(4), 2506-16.
- Song, H. C., Seo, M. Y., Stadler, K., Yoo, B. J., Choo, Q. L., Coates, S. R., Uematsu, Y., Harada, T., Greer, C. E., Polo, J. M., Pileri, P., Eickmann, M., Rappuoli, R., Abrignani, S., Houghton, M., and Han, J. H. (2004). Synthesis and characterization

- of a native, oligomeric form of recombinant severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein. *J Virol* **78**(19), 10328-35.
- Soriano-Gabarro, M., Mrukowicz, J., Vesikari, T., and Verstraeten, T. (2006). Burden of rotavirus disease in European Union countries. *Pediatr Infect Dis J* **25**(1 Suppl), S7-S11.
- Spain, W. J. M., Brian, D., Cavanagh, D., de Groot, R. J., Enjuanes, L., Gorbalenya, A. E., Holmes, K. V., Masters, P., Rottier, P., Taguchi, F., and Talbot, P. (2006). Index of Viruses - Coronaviridae (2006). In " ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4." (Büchen-Osmond., Ed.). Columbia University, New York, USA.
- Stern, D. F., and Sefton, B. M. (1982). Coronavirus proteins: structure and function of the oligosaccharides of the avian infectious bronchitis virus glycoproteins. *J Virol* **44**(3), 804-12.
- Stirrup, K., Shaw, K., Evans, S., Dalton, K., Casais, R., Cavanagh, D., and Britton, P. (2000). Expression of reporter genes from the defective RNA CD-61 of the coronavirus infectious bronchitis virus. *J Gen Virol* **81**(Pt 7), 1687-98.
- Stohlman, S. A., Baric, R. S., Nelson, G. N., Soe, L. H., Welter, L. M., and Deans, R. J. (1988). Specific interaction between coronavirus leader RNA and nucleocapsid protein. *J Virol* **62**(11), 4288-95.
- Sturman, L. S. (1977). Characterization of a coronavirus: I. Structural proteins: Effect of preparative conditions on the migration of protein in polyacrylamide gels. *Virology* **77**, 637-49.
- Sturman, L. S., Holmes, K. V., and Behnke, J. (1980). Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. *J Virol* **33**(1), 449-62.
- Tahara, S. M., Dietlin, T. A., Bergmann, C. C., Nelson, G. W., Kyuwa, S., Anthony, R. P., and Stohlman, S. A. (1994). Coronavirus translational regulation: leader affects mRNA efficiency. *Virology* **202**(2), 621-30.
- Tahara, S. M., Dietlin, T. A., Nelson, G. W., Stohlman, S. A., and Manno, D. J. (1998). Mouse hepatitis virus nucleocapsid protein as a translational effector of viral mRNAs. *Adv Exp Med Biol* **440**, 313-8.
- Tao, D., Barba-Spaeth, G., Rai, U., Nussenzweig, V., Rice, C. M., and Nussenzweig, R. S. (2005). Yellow fever 17D as a vaccine vector for microbial CTL epitopes: protection in a rodent malaria model. *J Exp Med* **201**(2), 201-9.
- Thibault, D. L., Chu, A. D., Graham, K. L., Balboni, I., Lee, L. Y., Kohlmoos, C., Landrigan, A., Higgins, J. P., Tibshirani, R., and Utz, P. J. (2008). IRF9 and STAT1 are required for IgG autoantibody production and B cell expression of TLR7 in mice. *J Clin Invest* **118**(4), 1417-26.
- Thiel, V., Herold, J., Schelle, B., and Siddell, S. G. (2001a). Infectious RNA transcribed

- in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J Gen Virol* **82**(Pt 6), 1273-81.
- Thiel, V., Herold, J., Schelle, B., and Siddell, S. G. (2001b). Viral replicase gene products suffice for coronavirus discontinuous transcription. *J Virol* **75**(14), 6676-81.
- Thiel, V., Karl, N., Schelle, B., Disterer, P., Klagge, I., and Siddell, S. G. (2003). Multigene RNA vector based on coronavirus transcription. *J Virol* **77**(18), 9790-8.
- Thiel, V., Rashtchian, A., Herold, J., Schuster, D. M., Guan, N., and Siddell, S. G. (1997). Effective amplification of 20-kb DNA by reverse transcription PCR. *Anal Biochem* **252**(1), 62-70.
- Thiel, V., and Siddell, S. G. (2005). Reverse genetics of coronaviruses using vaccinia virus vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* **287**, 199-227.
- Tihova, M., Dryden, K. A., Bellamy, A. R., Greenberg, H. B., and Yeager, M. (2001). Localization of membrane permeabilization and receptor binding sites on the VP4 hemagglutinin of rotavirus: implications for cell entry. *J Mol Biol* **314**(5), 985-92.
- Torrecilhas, A. C., Faquim-Mauro, E., Da Silva, A. V., and Abrahamsohn, I. A. (1999). Interference of natural mouse hepatitis virus infection with cytokine production and susceptibility to *Trypanosoma cruzi*. *Immunology* **96**(3), 381-8.
- Tosser, G., Labbe, M., Bremont, M., and Cohen, J. (1992). Expression of the major capsid protein VP6 of group C rotavirus and synthesis of chimeric single-shelled particles by using recombinant baculoviruses. *J Virol* **66**(10), 5825-31.
- Tsai, J. C., de Groot, L., Pinon, J. D., Iacono, K. T., Phillips, J. J., Seo, S. H., Lavi, E., and Weiss, S. R. (2003). Amino acid substitutions within the heptad repeat domain 1 of murine coronavirus spike protein restrict viral antigen spread in the central nervous system. *Virology* **312**(2), 369-80.
- Tusell, S. M., Schittone, S. A., and Holmes, K. V. (2007). Mutational analysis of aminopeptidase N, a receptor for several group 1 coronaviruses, identifies key determinants of viral host range. *J Virol* **81**(3), 1261-73.
- Unicomb, L. E., Podder, G., Gentsch, J. R., Woods, P. A., Hasan, K. Z., Faruque, A. S., Albert, M. J., and Glass, R. I. (1999). Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995. *J Clin Microbiol* **37**(6), 1885-91.
- Valenzuela, S., Pizarro, J., Sandino, A. M., Vasquez, M., Fernandez, J., Hernandez, O., Patton, J., and Spencer, E. (1991). Photoaffinity labeling of rotavirus VP1 with 8-azido-ATP: identification of the viral RNA polymerase. *J Virol* **65**(7), 3964-7.
- van den Broek, M. F., Muller, U., Huang, S., Aguet, M., and Zinkernagel, R. M. (1995). Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *J*

- Virology* **69**(8), 4792-6.
- van der Most, R. G., Bredenbeek, P. J., and Spaan, W. J. (1991). A domain at the 3' end of the polymerase gene is essential for encapsidation of coronavirus defective interfering RNAs. *J Virol* **65**(6), 3219-26.
- van der Most, R. G., Heijnen, L., Spaan, W. J., and de Groot, R. J. (1992). Homologous RNA recombination allows efficient introduction of site-specific mutations into the genome of coronavirus MHV-A59 via synthetic co-replicating RNAs. *Nucleic Acids Res* **20**(13), 3375-81.
- van Marle, G., Luytjes, W., van der Most, R. G., van der Straaten, T., and Spaan, W. J. (1995). Regulation of coronavirus mRNA transcription. *J Virol* **69**(12), 7851-6.
- VanCott, J. L., McNeal, M. M., Flint, J., Bailey, S. A., Choi, A. H., and Ward, R. L. (2001). Role for T cell-independent B cell activity in the resolution of primary rotavirus infection in mice. *Eur J Immunol* **31**(11), 3380-7.
- Velazquez, F. R., Matson, D. O., Calva, J. J., Guerrero, L., Morrow, A. L., Carter-Campbell, S., Glass, R. I., Estes, M. K., Pickering, L. K., and Ruiz-Palacios, G. M. (1996). Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med* **335**(14), 1022-8.
- Velazquez, F. R., Matson, D. O., Guerrero, M. L., Shults, J., Calva, J. J., Morrow, A. L., Glass, R. I., Pickering, L. K., and Ruiz-Palacios, G. M. (2000). Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis* **182**(6), 1602-9.
- Vennema, H., Godeke, G. J., Rossen, J. W., Voorhout, W. F., Horzinek, M. C., Opstelten, D. J., and Rottier, P. J. (1996). Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J* **15**(8), 2020-8.
- Vennema, H., Heijnen, L., Zijderveld, A., Horzinek, M. C., and Spaan, W. J. (1990). Intracellular transport of recombinant coronavirus spike proteins: implications for virus assembly. *J Virol* **64**(1), 339-46.
- Vesikari, T., Karvonen, A., Prymula, R., Schuster, V., Tejedor, J. C., Cohen, R., Meurice, F., Han, H. H., Damaso, S., and Bouckenooghe, A. (2007). Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. *Lancet* **370**(9601), 1757-63.
- Vesikari, T., Karvonen, A. V., Majuri, J., Zeng, S. Q., Pang, X. L., Kohberger, R., Forrest, B. D., Hoshino, Y., Chanock, R. M., and Kapikian, A. Z. (2006). Safety, Efficacy, and Immunogenicity of 2 Doses of Bovine-Human (UK) and Rhesus-Rhesus-Human Rotavirus Reassortant Tetravalent Vaccines in Finnish Children. *J*

- Infect Dis* **194**(3), 370-6.
- Von Seggern, D. J., Kehler, J., Endo, R. I., and Nemerow, G. R. (1998). Complementation of a fibre mutant adenovirus by packaging cell lines stably expressing the adenovirus type 5 fibre protein. *J Gen Virol* **79** (Pt 6), 1461-8.
- Wertz, G. W., Moudy, R., and Ball, L. A. (2002). Adding genes to the RNA genome of vesicular stomatitis virus: positional effects on stability of expression. *J Virol* **76**(15), 7642-50.
- Williams, G. D., Chang, R. Y., and Brian, D. A. (1999). A phylogenetically conserved hairpin-type 3' untranslated region pseudoknot functions in coronavirus RNA replication. *J Virol* **73**(10), 8349-55.
- Williams, M. B., Rose, J. R., Rott, L. S., Franco, M. A., Greenberg, H. B., and Butcher, E. C. (1998). The memory B cell subset responsible for the secretory IgA response and protective humoral immunity to rotavirus expresses the intestinal homing receptor, alpha4beta7. *J Immunol* **161**(8), 4227-35.
- Woods, R. D., Cheville, N. F., and Gallagher, J. E. (1981). Lesions in the small intestine of newborn pigs inoculated with porcine, feline, and canine coronaviruses. *Am J Vet Res* **42**(7), 1163-9.
- Woods, R. D., and Wesley, R. D. (1992). Seroconversion of pigs in contact with dogs exposed to canine coronavirus. *Can J Vet Res* **56**(1), 78-80.
- Ye, R., Montalto-Morrison, C., and Masters, P. S. (2004). Genetic analysis of determinants for spike glycoprotein assembly into murine coronavirus virions: distinct roles for charge-rich and cysteine-rich regions of the endodomain. *J Virol* **78**(18), 9904-17.
- Yeager, M., Berriman, J. A., Baker, T. S., and Bellamy, A. R. (1994). Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. *EMBO J* **13**(5), 1011-8.
- Youn, S., Leibowitz, J. L., and Collisson, E. W. (2005). In vitro assembled, recombinant infectious bronchitis viruses demonstrate that the 5a open reading frame is not essential for replication. *Virology* **332**(1), 206-15.
- Youngman, K. R., Franco, M. A., Kuklin, N. A., Rott, L. S., Butcher, E. C., and Greenberg, H. B. (2002). Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response. *J Immunol* **168**(5), 2173-81.
- Yount, B., Curtis, K. M., and Baric, R. S. (2000). Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: transmissible gastroenteritis virus model. *J Virol* **74**(22), 10600-11.
- Yount, B., Curtis, K. M., Fritz, E. A., Hensley, L. E., Jahrling, P. B., Prentice, E.,

- Denison, M. R., Geisbert, T. W., and Baric, R. S. (2003). Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(22), 12995-3000.
- Yount, B., Denison, M. R., Weiss, S. R., and Baric, R. S. (2002). Systematic assembly of a full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. *J Virol* **76**(21), 11065-78.
- Yuan, L., Geyer, A., Hodgins, D. C., Fan, Z., Qian, Y., Chang, K. O., Crawford, S. E., Parreno, V., Ward, L. A., Estes, M. K., Conner, M. E., and Saif, L. J. (2000). Intranasal administration of 2/6-rotavirus-like particles with mutant Escherichia coli heat-labile toxin (LT-R192G) induces antibody-secreting cell responses but not protective immunity in gnotobiotic pigs. *J Virol* **74**(19), 8843-53.
- Zelus, B. D., Schickli, J. H., Blau, D. M., Weiss, S. R., and Holmes, K. V. (2003). Conformational changes in the spike glycoprotein of murine coronavirus are induced at 37 degrees C either by soluble murine CEACAM1 receptors or by pH 8. *J Virol* **77**(2), 830-40.
- Zhang, M., Zeng, C. Q., Morris, A. P., and Estes, M. K. (2000). A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J Virol* **74**(24), 11663-70.
- Zhang, X., Hinton, D. R., Cua, D. J., Stohlman, S. A., and Lai, M. M. (1997). Expression of interferon-gamma by a coronavirus defective-interfering RNA vector and its effect on viral replication, spread, and pathogenicity. *Virology* **233**(2), 327-38.
- Zhang, X., Liao, C. L., and Lai, M. M. (1994). Coronavirus leader RNA regulates and initiates subgenomic mRNA transcription both in trans and in cis. *J Virol* **68**(8), 4738-46.
- Zhao, X., Shaw, K., and Cavanagh, D. (1993). Presence of subgenomic mRNAs in virions of coronavirus IBV. *Virology* **196**(1), 172-8.
- Zhou, X., Berglund, P., Rhodes, G., Parker, S. E., Jondal, M., and Liljestrom, P. (1994). Self-replicating Semliki Forest virus RNA as recombinant vaccine. *Vaccine* **12**(16), 1510-4.
- Zuniga, S., Sola, I., Alonso, S., and Enjuanes, L. (2004). Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J Virol* **78**(2), 980-94.
- Zuniga, S., Sola, I., Moreno, J. L., Sabella, P., Plana-Duran, J., and Enjuanes, L. (2007). Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology* **357**(2), 215-27.