

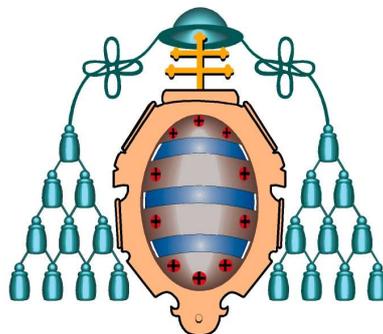
Generación de Myxoma virus recombinante defectuoso en el gen M022L mediante recombinación homóloga.

Alejandro Fernández Asensio

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

17 de julio de 2015

Máster en Biotecnología del Medio Ambiente y la Salud



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Dr. **Kevin P. Dalton** y Prof. Dr. **Francisco Parra Fernández**, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICAN:

Que el Graduado en Biotecnología, D. **Alejandro Fernández Asensio**, ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y bajo nuestra supervisión el trabajo que se presenta como Trabajo fin de Master dentro del Master en Biotecnología del Medio Ambiente y la Salud con el título:

“Generación de Myxoma virus recombinante defectuoso en el gen M022L mediante recombinación homóloga”.

Y para que así conste, firma la presente certificación en Oviedo, a 16 de julio de 2015.

Fdo.



Prof. Dr. Francisco Parra Fernández



Dr. Kevin P. Dalton

Resumen

Myxoma virus (MYXV) es un virus del género *Leporipoxvirus*, causante de la enfermedad conocida como mixomatosis en el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*). La gran tasa de mortalidad causada por dicha enfermedad genera graves problemas tanto a nivel del ecosistema por la ausencia de alimento para otros animales como a nivel económico por las pérdidas sufridas por las granjas de conejos. Debido a fallos de vacunas existentes hay una necesidad de generar nuevas vacunas eficaces. En el presente Trabajo de Fin de Master se trató de generar una cepa de MYXV recombinante mediante la delección de uno de los genes esenciales para la virulencia del virus (M022), que pueda ser utilizada como vacuna en futuros ensayos. Para la obtención de dicha cepa de MYXV recombinante se realizó un experimento de recombinación homóloga entre un plásmido diseñado específicamente para ello y el genoma de MYXV de la cepa Lausanne. El plásmido con el que se realizó la recombinación homóloga porta el gen *gfp* flanqueado por las regiones genómicas adyacentes al gen M022L en el genoma de MYXV. Dichas secuencias permitirán la sustitución del gen M022L por el gen *gfp* tras un evento de recombinación homóloga, generando un virus recombinante carente del gen M022L. Mediante dicho procedimiento se ha conseguido la generación de un recombinante de MYXV que expresa *gfp* y que ha sido purificado hasta en dos rondas de purificación de placas virales.

Summary

Myxoma virus (MYXV) is a virus of the *Leporipoxvirus* genus that causes myxomatosis in the European Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). The high mortality rate caused by this disease generates serious problems in the ecosystem due to the absence of food for other animals and also because of the economic losses suffered on rabbit farms. Due to vaccine failures when using existing vaccines there is a need to generate new efficient vaccines. In this "Trabajo de Fin de Master" we set out to generate a recombinant MYXV strain by deleting a gene essential for virulence (M022L), which could be used as a vaccine in future essays. In order to obtain this recombinant MYXV strain, we used homologous recombination between a plasmid specifically designed for this end and the genome of the Lausanne strain of MYXV. The plasmid used for the homologous recombination contains the *gfp* gene flanked by the MYXV genomic regions which flank M022L in the virus genome. These sequences allow the substitution of the gene M022L with the *gfp* following a homologous recombination event, generating a recombinant virus lacking the gene M022L. Using this procedure we have generated a recombinant Myxoma virus that expresses *gfp* and that has been purified by two rounds of virus plaque purification.

Índice

I.-Introducción -----	1
I.1.-Taxonomía de la familia <i>Poxviridae</i> -----	1
I.2.-Características generales de <i>Myxoma virus</i> -----	2
I.3.-Hospedador de <i>Myxoma virus</i> -----	3
I.4.-Mixomatosis-----	4
I.5.-Historia de la mixomatosis-----	5
I.6.-Vacunas frente a la mixomatosis-----	6
I.7.-Nuevas estrategias de vacunación-----	7
I.8. Gen F13L de <i>Vaccinia virus</i> -----	8
I.9.-Objetivos del proyecto-----	10
II.-Materiales y métodos -----	11
II.1.- Cepa viral-----	11
II.2.- Líneas celulares-----	11
II.3.- Microorganismos-----	11
II.4.- Medios de cultivo-----	11
II.5.-Programa utilizado para el análisis de secuencias-----	12
II.6.- Vectores-----	13
II.7.- Cebadores utilizados para la obtención del plásmido recombinante-----	13
II.8.- Condiciones de amplificación-----	14
II.9.- Obtención del plásmido recombinante pGEMF1gfpF2-----	15
II.10.- Enzimas de restricción-----	15
II.11.- Purificación de DNA-----	16
II.12.- Electroforesis de DNA-----	16
II.13.-Anticuerpos utilizados para inmunocitoquímica-----	16
II.14.- Infección con <i>Myxoma virus</i> -----	16
II.15.- Transfección-----	17

II.16.-Inmunocitoquímica-----	17
II.17.-Infección y transfección simultaneas-----	17
II.18- Titulación de los stocks virales-----	18
II.19.- Aislamiento de placas de lisis recombinantes-----	18
III.-Resultados-----	19
III.1.-Identificación de M022L como gen a deleccionar para la generación de Myxoma virus recombinante atenuado-----	19
III.2.-Generación del plásmido recombinante pGEM F1gfpF2-----	21
III.2.1.-Estrategia general para la generación la cepa de Myxoma virus recombinante-----	21
III.2.2.-Amplificación de F1, F2 y gfp y obtención del fragmento F1gfpF2----	22
III.2.3.-Obtención del plásmido pGEM F1gfpF2-----	25
III.3.- Selección de la linea celular óptima para la recombinación homóloga-----	27
III.4.- Obtención de Myxoma virus recombinantes-----	31
III.4.1.Experimento1-----	31
III.4.2.Experimento2-----	31
III.4.3.Experimento3-----	31
III.4.4.- Obtención de recombinantes-----	32
III.4.5.-Purificación de los recombinantes obtenidos-----	33
IV.Discusión-----	35
V.-Conclusiones-----	40
VI.-Referencias bibliográficas-----	41

I.Introducción

I.1.-Taxonomía de la familia *Poxviridae*

La familia *Poxviridae* de virus animales incluye miembros que infectan vertebrados e invertebrados. A esta familia pertenecen aquellos virus cuya infección tiene como factor común la aparición de marcas cutáneas conocidas como “pockmarks” [Mercer *et al*, 2007]. Es el caso de virus tales como el virus de la viruela (Variola virus), erradicado con éxito en 1980 gracias a una campaña de vacunación mundial, o el virus del molusco contagioso (Molluscum contagiosum virus), muy común entre niños pequeños (2-3 años) de climas cálidos [Chen *et al*, 2013].

Dentro de la familia *Poxviridae* hay dos subfamilias: *Chordopoxvirinae* y *Entomopoxvirinae*. La primera de dichas subfamilias, *Chordopoxvirinae*, está compuesta por nueve géneros de virus que infectan vertebrados de forma exclusiva, y cuyo hospedador principal otorga nombre al género (*Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Yatapoxvirus*). Alguno de los virus de esta subfamilia, como es el caso de Vaccinia virus, tienen como principal hospedador el hombre. La segunda subfamilia, *Entomopoxvirinae*, está compuesta por tres géneros de virus que infectan insectos exclusivamente y que están mucho menos estudiados (*Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus*, *Gammaentomopoxvirus*) [King *et al*, 2012].

Uno de los géneros principales de la subfamilia *Chordopoxvirinae* es el género *Leporipoxivirus*. Dicho género está formado por cuatro especies de virus: Myxoma Virus (MYXV), Rabbit fibroma virus (RFV), Hare fibroma virus (FIBV) y Squirrel Fibroma Virus (SQFV). Myxoma virus destaca entre ellos como especie tipo del género, siendo la más relevante y la más estudiada y caracterizada [King *et al*, 2013].

Todos los virus pertenecientes a la familia *Poxviridae* tiene como una de las características comunes el tipo de ácido nucleico que conforma su genoma. El genoma

de todos ellos está formado por DNA lineal de doble cadena. Por esa razón, la familia entera está englobada dentro del Grupo I de la clasificación de Baltimore : double-stranded DNA virus [Baltimore, 1971].

Familia	<i>Poxviridae</i>		
Subfamilia	<i>Chordopoxvirinae</i>		<i>Entomopoxvirinae</i>
Géneros	<i>Capripoxvirus</i>	<i>Cervidpoxvirus</i> <i>Yatapoxvirus</i>	<i>Alphaentomopoxvirus</i>
	<i>Parapoxvirus</i>	<i>Molluscipoxvirus</i> <i>Orthopoxvirus</i>	<i>Betaentomopoxvirus</i>
	<i>Suipoxvirus</i>	<i>Leporipoxvirus</i> <i>Avipoxvirus</i>	<i>Gammaentomopoxvirus</i>
Especies de <i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxoma Virus</i> <i>Rabbit fibroma virus</i> <i>Hare fibroma virus</i> <i>Squirrel Fibroma Virus</i>		

Figura1.- Esquema taxonómico de la familia *Poxviridae*. Se incluyen las dos subfamilias con sus respectivos géneros, así como las especies del género *Leporipoxvirus*.

I.2.-Características generales de Myxoma virus

De forma general, los virus de la familia *Poxviridae* poseen una nucleocápsida donde se encuentra el genoma, y una membrana externa que recubre la nucleocápsida. Los viriones maduros poseen además una envuelta externa indispensable para la correcta salida del virión de las células infectadas. Los viriones (Figura2) poseen estructura de ladrillo (brick-shaped) y su tamaño aproximado es de 300nm de longitud y 250 nm de ancho, siendo observables incluso al microscopio óptico en algún caso. Poseen un genoma formado por entre 165 y 171 genes dependiendo de la especie, distribuidos en las 160kb que aproximadamente conforman el genoma de un *Leporipoxvirus*. Los extremos del genoma lineal terminan en bucles de horquilla formados por repeticiones en tandem. Además, las regiones terminales de dicho genoma están flanqueadas por lo que se denominan ITR (inverted terminal repeats), que son secuencias que contienen genes no esenciales y cuya función no es conocida [Kerr *et al*, 2011].

En el caso concreto de Myxoma virus, el genoma tiene 161,8kb y posee 171 pautas de lectura abiertas. Las regiones invertidas terminales son de 11,5kb, más cortas que en el resto de *Leporipoxvirus*, como en el caso de Shope Fibroma Virus por ejemplo en que son de 12,4kb. La región central del genoma, es decir, todo lo que se encuentra entre los dos ITRs y donde se encuentran los genes fundamentales, abarca desde el gen M009L hasta el M156R, ambos incluidos [Cameron et al, 1999].

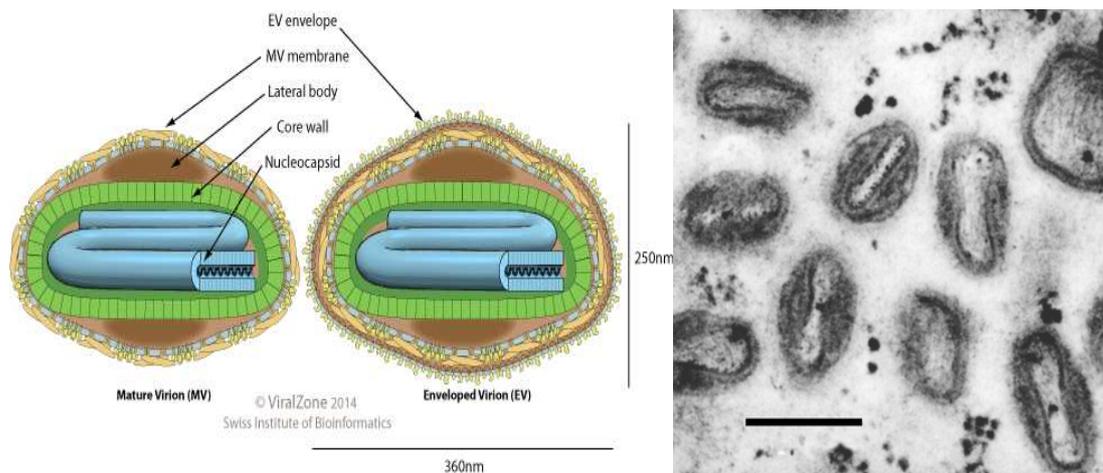


Figura2.- Izda: Esquema de la estructura de un virión de *Leporipoxvirus* (Imagen tomada de ViralZone: SIB Swiss Institute of Bioinformatics). Dcha: Sección de células epiteliales conteniendo viriones maduros de *Myxoma virus* (Foto tomada de Fenner F, Ratcliffe FN (1965) *Myxomatosis*; Cambridge University Press).

I.3.-Hospedador de Myxoma virus

En el caso de los virus pertenecientes a la subfamilia *Chordopoxvinae*, los huéspedes son animales vertebrados. Los hospedadores habituales de los virus pertenecientes al género *Leporipoxvirus* son lagomorfos, excepto en el caso del Squirrel Fibroma Virus. Es decir, por lo general, los hospedadores son conejos o liebres. *Lepus* o *leporis* son palabras latinas que significan liebre, debiéndose por tanto el nombre del género *Leporipoxvirus* al hospedador habitual [King et al, 2012].

Los hospedadores naturales de MYXV son concretamente las especies, *Sylvilagus brasiliensis* (conejo brasileño) y *Sylvilagus bachmani* (conejo matorralero). En ellos, la infección por MYXV causa sólo un fibroma cutáneo benigno que no genera normalmente ningún problema. Sin embargo, es en *Oryctolagus cuniculus* (conejo europeo) donde MYXV genera realmente todos los problemas por los que es conocido. Es en el conejo europeo en el que la infección por MYXV causa la enfermedad conocida como mixomatosis [Fenner *et al*, 1965] , en uno de los más claros ejemplos de coevolución hospedador-virus [Kerr *et al*, 2015].

I.4.-Mixomatosis

La mixomatosis es una enfermedad con una relevancia muy alta debido al impacto que tiene tanto a nivel de la disminución de las poblaciones de conejos salvajes de toda Europa como a nivel de las pérdidas económicas que genera en las granjas de conejos europeas [Farsang *et al*, 2003; Muller *et al*, 2010; Marlier *et al*, 2001; Kritas *et al*, 2008; Dalton *et al*, 2015] como consecuencia de la muerte de muchos de sus conejos por culpa de infección con MYXV, letal cuando el organismo infectado es el conejo europeo. Además, la mixomatosis afecta también indirectamente a otras especies como el lince ibérico (*Lynx pardina*) y el águila imperial (*Aquila adalberti*), al reducir la disponibilidad de alimento de que disponen dichos animales [Delibes *et al*, 1979].

La mixomatosis se caracteriza por la generación de tumefacciones en la piel y en las membranas mucosas, especialmente en la parte de la cabeza y los genitales del animal. Según avanza la infección se produce conjuntivitis aguda e incluso ceguera, además de que aumenta la temperatura corporal del animal. Se produce además la pérdida de apetito, y el animal permanece apático y aletargado. La infección suele acabar con la muerte del animal infectado, lo cuál ocurre entre los 3 y 13 días siguientes a la infección, según la cepa de virus que cause la infección y lo aguda que sea ésta [Fenner *et al*, 1957]. La muerte se produce normalmente por un fallo multiorgánico o por infecciones secundarias con bacterias gram-negativas debido al deterioro progresivo del sistema inmune que tiene lugar durante la infección viral.

La principal vía de transmisión de Myxoma virus es mediante mosquitos [Fenner *et al*, 1965; Day *et al*, 1956], pulgas [Service, 1971] u otros artrópodos que se alimentan de sangre, los cuales actúan como vectores pasivos transmitiendo el virus mediante picaduras desde conejos infectados a conejos sanos. Los conejos infectados con MYXV desarrollan lesiones cutáneas que son el punto de origen desde el cual los mosquitos toman las partículas virales que transferirán a otro conejo mediante una picadura. La segunda vía de transmisión es por contacto de tejido conjuntivo o de mucosas nasales con tejido infecto o fómites. Esta segunda vía de transmisión resulta muy poco usual entre las distintas poblaciones de conejos salvajes, pero adquiere una importancia muy grande cuando los conejos se encuentran muy juntos como en el caso de las madrigueras o de las granjas, donde la infección por MYXV se extiende rápidamente y con consecuencias devastadoras.

I.5.-Historia de la mixomatosis

MYXV fue descubierto por primera vez en Uruguay en 1896, y fue identificado como un poxvirus en 1927. Sin embargo, no fue hasta la segunda mitad del siglo XX en que cobró verdadera importancia debido a un gran aumento en la mortandad causada por el virus asociado a un cambio de hospedador. El cambio de hospedador, de *Sylvilagus brasiliensis* y *Sylvilagus bachmani* a *Oryctolagus cuniculus* se produjo en Australia en 1950 [Kerr *et al*, 2012] , y en Francia en 1952 [Arthur *et al*, 1988]. En estos países, el virus fue deliberadamente introducido en las poblaciones de conejos salvajes con el fin de reducir su población, que constituía una plaga como la que siguen constituyendo en Australia. Se esperaba que las poblaciones de conejos salvajes se vieran reducidas y el conejo dejase de constituir una plaga. El efecto causado por el virus fue letal. Se extendió rápidamente entre las poblaciones de conejos y produjo una mortalidad cercana al 95%, reduciendo drásticamente la población de conejos en Australia y diezmando las poblaciones de conejos silvestres europeas al matar entre el 90 y el 95% de ellos [Kerr *et al*, 2012]. La drástica reducción en el número de conejos salvajes, unida a la persistencia del virus durante todos estos años son las razones por la

que en la actualidad el número de conejos en la Península Ibérica es tan reducido y se producen los problemas asociados al bajo número de ellos [Less *et al*, 2008].

La evolución del virus fue hacia cepas ligeramente atenuadas y menos virulentas. Estas cepas permitían al hospedador vivir más tiempo, por lo que el tiempo disponible para la propagación del virus era mayor. De esta forma, las cepas ligeramente atenuadas dominaron, y la mortalidad generada por el virus fue disminuyendo. Además de la aparición de cepas atenuadas, la selección que produjo el propio virus, haciendo que sólo aquellos individuos más resistentes fuesen capaces de sobrevivir, ayudó a disminuir los niveles de mortalidad que se dieron durante los primeros años tras la propagación del virus [Kerr *et al*, 2012].

I.6.-Vacunas frente a la mixomatosis

Durante los últimos cincuenta años el virus de la mixomatosis ha sido estudiado en detalle, y se han generado vacunas para otorgar protección frente a la infección por dicho virus [Arthur *et al*, 1988], ya que la vacunación es la única forma de control de la mixomatosis además de unas buenas prácticas de higiene. Las vacunas desarrolladas frente al virus están basadas o bien en un *Leporipoxvirus* no virulento íntimamente relacionado con Myxoma virus, Rabbit fibroma virus, o bien en cepas de MYXV atenuadas por replicación del virus por cultivo *in vitro* [Angulo *et al*, 2007; Marlier *et al*, 2010]. Sin embargo, ambos tipos de vacunas tienen sus contras, además de que en ocasiones no otorgan la protección deseada. En el caso de las vacunas que utilizan Rabbit fibroma virus, la protección otorgada por la vacuna suele durar poco, y es necesario la aplicación de recuerdos cada breves periodos de tiempo [Marlier *et al*, 2010]. En el caso de vacunas basadas en cepas de MYXV atenuadas, la protección otorgada no siempre resulta suficiente, pudiendo incluso causar inmunosupresión en conejos jóvenes [Marlier *et al*, 2010]. En España y en otros países europeos estas vacunas están siendo utilizadas, aunque siguen apareciendo brotes de mixomatosis en granjas de conejos comerciales por problemas diversos con las vacunas y sus estrategias de administración [Dalton *et al*, 2015]. Sin embargo, en Australia, donde MYXV es

usado como un agente de control biológico frente a las plagas de conejos salvajes, no se utiliza ni se permite la utilización de este tipo de vacunas vivas porque existe riesgo de que la vacuna se extienda de la misma forma que lo hace el virus y resulte en la vacunación accidental de una gran parte de la población de conejos silvestres, generando una protección general dentro de la población de conejos, y dando pie de nuevo a una plaga.

Hace falta por lo tanto recurrir a nuevas estrategias de vacunación para la generación de vacunas frente a la mixomatosis basadas en virus cuya virulencia no pueda ser revertida. Hasta el momento no se ha desarrollado con éxito ninguna vacuna contra la mixomatosis a partir de un virus inactivado, pues parece que es necesaria la replicación viral para otorgar protección frente a Myxoma virus. Esta estrategia es utilizada en otros tipos de vacunas como la de la gripe o la de la polio [Hawken *et al*, 2012; Freeman *et al*, 2015].

I.7.-Nuevas estrategias de vacunación

En los últimos años se han realizado estudios para desarrollar vacunas contra la mixomatosis a partir de cepas de Myxoma virus recombinantes carentes de algún gen esencial para la virulencia [Adams *et al*, 2008]. La delección de genes esenciales para la virulencia del virus produce cepas de virus que son capaces de replicarse *in vitro*, pero que no son capaces de producir infección sistémica por carecer de virulencia y por tanto no producen la enfermedad. Estas nuevas estrategias de vacunación basadas en la generación de virus recombinantes están siendo probadas en la generación de vacunas contra otros muchos virus [Ryder *et al*, 2015; de Wit *et al*, 2015]. Se está trabajando también en el desarrollo de vacunas marcadas, que permitan la generación de anticuerpos característicos de dicho vacuna, permitiendo distinguir los individuos vacunados de los organismos infectados por el virus silvestre.

En 1967 se inició una campaña de vacunación masiva global contra el virus de la viruela (Variola virus) otro virus perteneciente a la familia *Poxviridae*, que resultó en la

completa erradicación del virus en 1980. Para la vacunación se utilizó una vacuna cuyo componente principal fueron viriones de *Vaccinia virus* vivos, un virus prácticamente inócuo. Actualmente, se están utilizando nuevas estrategias para la generación de vacunas basadas en *Vaccinia virus* recombinantes mediante la delección de genes esenciales para la virulencia. Han sido varios los genes que se han estudiado en busca de una diana adecuada para la atenuación de *Vaccinia virus*, como es el caso de los genes A33R, A34R, A36R, que interfieren con la formación celular de microvilli de actina, o el gen B5R, relacionado con la formación de las proteínas de la envuelta del virus [Katz *et al*, 2002; Katz *et al*, 2003]. Sin embargo, uno de los mejores ejemplos de atenuación de un virus por delección de un gen esencial y con el que mejores resultados se han obtenido es el gen F13L de *Vaccinia virus* [Lorenzo *et al*, 2004].

I.8. Gen F13L de *Vaccinia virus*

El gen F13L de *Vaccinia virus* codifica para una proteína palmitilada de la membrana externa del virión, denominada p37 debido a su masa molecular de 37kDa. Es uno de los genes esenciales para la virulencia del virus, pues interviene en la formación de los viriones maduros capaces de salir de la célula infectada para infectar otras células [Smith *et al*, 2002].

Vaccinia virus tiene varias formas de virión que se van sucediendo durante la maduración del mismo (Figura3). Los viriones intracelulares maduros (IMV) son aquellos capaces de infectar una célula si son liberados mediante lisis celular, pero que no son capaces de salir de la célula por sí mismos, y no producirán por tanto infección viral si no existe lisis celular. Para salir de la célula, dichos IMV deben adquirir dos membranas externas, procedentes del aparato de Golgi. Tras adquirir dichas membranas, los IMV pasan a ser viriones intracelulares con envuelta (IEV). Estos IEV migran a la membrana celular, con la que se fusionan para salir de la célula. Durante el proceso de salida de la célula pierden su membrana más externa debido a la fusión con la membrana celular, pasando a ser viriones extracelulares con envuelta (EEV). Se ha visto que la formación de estos EEV es clave para la infección viral. Si no se produce la

correcta formación de los EEV, la infección de células vecinas no tiene lugar o tiene lugar pero de forma mucho menos pronunciada, limitando la infección viral. La proteína p37, producto de la expresión del gen F13L, juega un papel esencial en la formación de estos viriones extracelulares maduros. Estos viriones son los que se forman en última instancia, y los que realmente son capaces de infectar otras células de forma eficiente. Se ha visto que una alteración en dicho gen F13L hace que la formación de los viriones extracelulares con envuelta no se produzca, limitando la infección en cultivos in vitro al generar placas de lisis muy pequeñas debido a la imposibilidad de salir de una célula para infectar a las vecinas [Vliegen *et al*, 2012; Blasco *et al*, 1991].

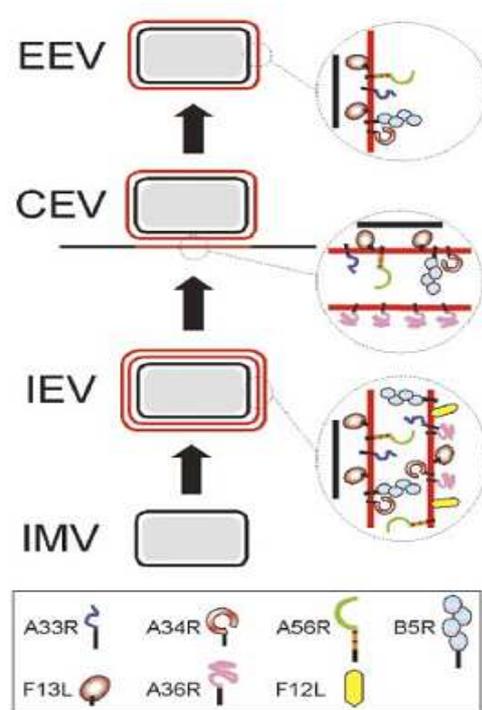


Figura3.- Esquema de la maduración de los viriones de *Vaccinia virus*, desde el intracelular mature virus (IMV) al extracelular enveloped virus (EEV). Esquema tomado de: Smith G. L., Vanderplasschent A., Law M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *Journal of General Virology*, 2002, 83, 2915–2931.

De forma análoga a lo que se está haciendo en *Vaccinia virus*, se puede intentar hacer una vacuna recombinante del virus mixoma utilizando como base los trabajos de

atenuación de Vaccinia virus basados en la delección del gen F13L.

I.9.-Objetivos del proyecto

El proyecto realizado plantea el siguiente objetivo principal:

- Generación de una cepa recombinante de Myxoma virus carente de un gen esencial para la virulencia del virus, el gen M022L, que permita establecer las bases iniciales para la generación de una vacuna contra la mixomatosis basada en Myxoma virus recombinante.

El objetivo principal del incluye varios sub-objetivos, íntimamente relacionados con el objetivo principal del proyecto e imprescindibles para el cumplimiento del mismo. Los sub-objetivos que se plantean son los siguientes:

1. Obtención de evidencias de homología entre el gen M022L de Myxoma virus y el gen F13L de Vaccinia virus que acrediten al gen M022L como gen a eliminar para la obtención de un recombinante no virulento.
2. Obtención del plásmido recombinante portador de las secuencias que permitan la recombinación con el genoma viral para la sustitución del gen esencial.
3. Identificación de la línea celular óptima para la realización de la recombinación homóloga entre el virus y el plásmido recombinante mediante la cuál se generará la cepa de virus recombinante.
4. Optimización del proceso de recombinación homóloga para la obtención del virus recombinante.

II.-Materiales y métodos

II.1.- Cepa viral

El virus utilizado durante todo el proyecto fue Myxoma virus de la cepa Lausanne (ATCC VR-115), que es la cepa de referencia de Myxoma virus.

II.2.- Líneas celulares

La línea celular utilizada principalmente fue RK-13 (ATCC CCL-37), constituida por células epiteliales de riñón de conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*).

Además de RK-13 se utilizaron otras dos líneas celulares: HEK-293 (ATCC CRL-1573) y Vero (ATCC CCL-81). Las células HEK-293 son células embrionarias de riñón humano. Las células Vero son células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

II.3.- Microorganismos

La cepa utilizada para la propagación del plásmido recombinante fue *Escherichia coli* XL-1 Blue: *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac* [F' *proAB, lacI^qZΔM15, Tn10 Tet^r*].

II.4.- Medios de cultivo

Para el cultivo de RK-13, HEK-293 y Vero se utilizó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) de Life Technologies suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina, aminoácidos no esenciales y gentamicina como antibiótico.

Para los experimentos de infección y transfección el medio de cultivo normalmente utilizado se modificó para adaptarlo a las necesidades de cada uno de los protocolos. Para las infecciones virales se utilizó medio DMEM sin suero. Para los experimentos de transfección de DNA se utilizó medio optiMEM de Life Technologies, medio MEM con baja concentración de suero diseñado específicamente para transfecciones utilizando lípidos catiónicos como la lipofectamina.

Las células fueron cultivadas en todo momento en un incubador a 37°C manteniendo el nivel de CO₂ al 5%.

Para el cultivo de las células *E.coli* XL-1 Blue se utilizó medio LB (Luria-Bertani), con 1,5% agar para la formación de placas de cultivo y sin agar para el medio líquido. Se utilizó ampicilina como antibiótico de selección de los transformantes, a una concentración final de 100µg/ml. Se utilizaron además isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) para la selección de recombinantes. La incubación de estas células se realizó en una estufa a 37°C.

II.5.-Programa utilizado para el análisis de secuencias

Se utilizó la aplicación online blastp del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para alinear la secuencia de aminoácidos del producto del gen F13L de Vaccinia virus (UniProtKB/Swiss-Prot: P04021.1) y del producto del gen M022L de MYXV (GenBank: ACB28644.1).

Se utilizó también el programa de análisis de ácidos nucleicos Vector NTI de Invitrogen para realizar el alineamiento entre el producto del gen F13L de Vaccinia virus y el producto M022L de MYXV y para el estudio de ambos genes.

II.6.- Vectores

Para la generación del plásmido recombinante con el que se realizó la recombinación homóloga se utilizó el vector plasmídico comercial pGEM-T Easy Vector de Promega.

Para obtener el gen *gfp*, así como para estudiar la eficiencia de transfección de las células HEK, Vero y RK-13 se utilizó el plásmido pcDNAGFP, que contiene la secuencia del gen *emGFP* bajo el control del promotor CMV.

II.7.- Cebadores utilizados para la obtención del plásmido recombinante

Para obtener el plásmido recombinante con el que realizar la recombinación homóloga fue necesario la amplificación de los fragmentos F1 y F2 de Myxoma virus, así como el fragmento *gfp* de pcDNAGFP . Para la amplificación de dichos fragmentos se utilizaron los cebadores que se muestran en la Tabla1 y en la Tabla2.

Fragmento a amplificar	Cebadores utilizados	
F1	FwM022	5' GTCACGTACGAATTTTGCCG 3'
	RvOv	5'CTTTTTTCTAAGCCACCCCAGATCTGGCCCCATGGGCCGG GAAAATCCCCGCAATACG 3'
F2	RvM022	5' CGCTGTTTGACACGTCTCTG 3'
	FwOv	5'CGTATTGCGGGGATTTTCCC GGCCCATGGGGCCAGATCTG GGGTGGCTTAGAAAAAAG 3'
	Fw gfp	5'GGGGATTTTCCC GGCCCATGGGGCCAAAAGTAGAAAATA TATTCTAATTTATTGCACTCGAGCATGGTGAGCAAGGGCGA GG 3'

gfp	Rvgfp	5' CTAAGCCACCCCAGATCTTTACTTGTACAGCTCGTCC 3'
-----	-------	---

Tabla1.- Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos F1, F2 y *gfp* utilizados en las dos primeras estrategias de obtención de F1*gfp*F2.

Fragmento a amplificar	Cebadores utilizados	
F1	FwM022	5' GTCACGTACGAATTTTGCCG 3'
	SfiRv	5'GCTCCTCGCCTTGCTCACCATGCTCGAGTGCAATAAATTAGAA TATATTTTCTACTTTTGGCCACGTAGGCCGGGAAAATCCCCGCA ATACGGTGG 3'
gfp	SfiFw	5'CCACCGTATTGCGGGGATTTTCCCGGCCTACGTGGCCAAAAG TAGAAAATATATTCTAATTTATTGCACTCGAGCATGGTGAGCAA GGGCGAGGAGC 3'
	BglRv	5'GCTATCACTTTTTTCTAAGCCACCCCAGATCTTTACTTGTACA GCTCGTCCATGCCGAG 3'
F2	BglFw	5'CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGATCTGGGGTGGCT TAGAAAAAAGTGATAGC 3'
	RvM022	5' CGCTGTTTGACACGTCTCTG 3'

Tabla2.- Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación de los fragmentos F1, F2 y *gfp* utilizados en la tercera estrategia de obtención de F1*gfp*F2.

Las secuencias marcadas en rojo y en azul se corresponden con sitios de restricción de las enzimas *Sfi*I y *Bgl*II, respectivamente, incluidos para facilitar la restricción diagnóstica de los distintos fragmentos. Además, la secuencia marcada en verde se corresponde con la secuencia de un promotor tardío sintético de *Vaccinia* [Davison *et al*, 1990; Yuen *et al*, 1987], el promotor p7.5, incluido para permitir la expresión de *gfp* en aquellas células infectadas con MYXV.

II.8.- Condiciones de amplificación

Para la amplificación de los distintos fragmentos F1, F2 y *gfp* mediante PCR se utilizó el kit LA Taq de TaKaRa. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

- 2 minutos a 94°C
- 30 ciclos de:

- 30 segundos a 94°C (tiempo de desnaturalización)
- 30 segundos a 55°C (tiempo de hibridación)
- 1 minuto a 68°C (tiempo de elongación)
- 5 minutos a 68°C

Para la PCR solapante con la que se unieron los tres fragmentos F1, F2 y *gfp*, las condiciones fueron las mismas excepto el tiempo de elongación de cada ciclo que se aumentó a 1:45 minutos.

II.9.-Obtención del plásmido recombinante pGEMF1gfpF2

Mediante PCR solapante utilizando como molde los fragmentos F1, F2 y *gfp* se obtuvo el fragmento F1gfpF2. Dicho fragmento se incorporó al plásmido comercial pGEM-T Easy Vector de Promega utilizando el kit pGEM®-T Easy Vector Systems, siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el producto de ligación se transformaron células *E. coli* XL-1 Blue mediante choque térmico a 42°C durante 30 segundos, y se sembraron en placas de medio LB-agar. Se prepararon minipreps con las colonias recombinantes obtenidas y se purificó el DNA de dichos minipreps utilizando el kit FavorPrep Plasmid DNA Extraction Mini de Favorgen.

II.10.- Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción utilizadas para la restricción diagnóstica durante todo el proyecto fueron *EcoRI*, *SfiI* y *BglII*. El enzima *EcoRI* utilizada fue de Life Technologies. En el caso de los enzimas *SfiI* y *BglII* se utilizaron enzimas FastDigest de Life Technologies. Todas las enzimas fueron utilizadas con el tampón suministrado por el fabricante y de acuerdo al protocolo sugerido por el mismo.

Tras la PCR realizada para la obtención de los fragmentos F1 y F2 se utilizó el enzima *DpnI* de Takara para eliminar restos de DNA viral.

II.11.- Purificación de DNA

En todos aquellos pasos en que fuese necesaria la purificación del DNA se utilizó el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-up System de Promega, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

II.12.- Electroforesis de DNA

Para la separación de los distintos fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa al 0.8% en tampón TAE (Tris-Acetato 0.04 mM, EDTA 2 mM). Para la visualización del DNA se utilizó el agente de tinción Red Safe de iNtRON Biotechnology, e iluminación con luz ultravioleta. Los marcadores utilizados para determinar el tamaño de las distintas bandas obtenidas fueron O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder 0.1 µg/µl.

II.13.-Anticuerpos utilizados para inmunocitoquímica

Para determinar la presencia de MYXV en el interior de las células infectadas se utilizaron dos anticuerpos: un suero policlonal de conejo obtenido anteriormente tras infección experimental con Myxoma virus, y el anticuerpo comercial Alexa Fluor 633 goat anti-rabbit IgG (H+L) 2mg/mL.

II.14.- Infección con Myxoma virus

Para la infección con MYXV, se sembraron 600.000 células/ pocillo en placas de 6-pocillos 24 horas antes de la infección. Una hora antes de la infección se cambió el medio DMEM por medio DMEM sin suero. Después de una hora y tras retirar el medio, se añadió 1mL a cada pocillo de una mezcla de inóculo viral y DMEM sin suero. Al cabo de hora y media se retiró el inóculo viral y se añadió medio DMEM.

II.15.- Transfección

Para la transfección de las células con el plásmido se sembraron 600.000 células/pocillo en placas de 6-pocillos 24 horas antes de la transfección. Una hora antes de la transfección se cambió el medio DMEM por medio opti-MEM. Se mezclaron 8 μL Lipofectamina 2000 de Invitrogen con la cantidad correspondiente de DNA, y se añadió medio hasta los 200 μL . Se dejó la mezcla 20 minutos y, tras dejar las células en 500 μL de medio opti-MEM, se añadió a cada pocillo la mezcla de DNA y Lipofectamina. Al cabo de una hora se cambió el medio por medio DMEM.

II.16.-Inmunocitoquímica

Para la inmunocitoquímica se fijaron las células con paraformaldehído 4% durante media hora. Tras el periodo de fijación se retiró el formaldehído y se dejaron en una solución de PBS+0.1% Triton X-100 durante 15 minutos. Se bloquearon con PBS+1% BSA durante 60 minutos. Se incubaron con el anticuerpo primario durante una hora y tras unos lavados con PBS se incubaron con el anticuerpo secundario (0.2 μg por pocillo) durante otra hora. Finalmente se lava con PBS y se montan las preparaciones con medio de montaje.

II.17.-Infección y transfección simultaneas

Tanto la infección como la transfección se realizaron de forma idéntica a la explicada en los apartados anteriores. Primero se realizó la infección con Myxoma virus y tras el periodo de incubación se realizó la transfección con el plásmido correspondiente.

II.18- Titulación de los stocks virales

Para la titulación de los stocks virales se sembraron 600.000 células/pocillo en placas de 6-pocillos 24 horas antes de la titulación. Al día siguiente se realizaron diluciones seriadas en base 10 del stock viral, y se infectaron las células con dichas diluciones. Una vez transcurrido el tiempo de infección, se retiró el inóculo y se añadió a cada pocillo una mezcla al 50% de DMEM 2x y agarosa de bajo punto de fusión al 2%.

II.19.- Aislamiento de placas de lisis recombinantes

El aislamiento de las placas de lisis individuales se realizó mirando las placas al microscopio de fluorescencia y utilizando una pipeta para recoger las células de forma cuidadosa. Es necesario rascar con la punta la zona de la placa a levantar, tratando de recoger todas las células que expresen *gfp* debido a la infección con virus recombinante, pero sin coger demasiadas células que no expresen *gfp*.

III.Resultados

III.1.-Identificación de M022L como gen a deleccionar para la generación de Myxoma virus recombinante atenuado

El gen M022L de MYXV ha sido identificado como el gen homólogo de F13L de Vaccinia virus [Cameron *et al*, 1999], pero no hay datos experimentales que lo avalen. Esta homología implica que codifica una proteína palmitilada de la envuelta del virión relacionada con la formación de EEV. En el producto del gen F13L, la proteína p37, se han descrito una serie de dominios clave para su función. Estos dominios están presentes en proteínas con función similar, por lo que es de esperar que en el producto del gen M022L estén también presentes si la función de ambos genes es parecida.

- Se ha visto que en el gen F13L existe un dominio de ensamblamiento viral tardío, YxxL, al igual que ocurre en otros muchos virus como en el VIH [Honeyburch *et al*, 2007]. Dichos dominios de ensamblamiento son necesarios para la correcta formación de EEV capaces de salir de la célula, y mutaciones en dichos dominios reducen la secreción de partículas virales.
- Se ha descrito también la presencia de un dominio HKD (Histidina-Lisina-Aspartato), típico de fosfolipasas, de 16 aminoácidos en el gen F13L. La mutación en dos de sus aminoácidos esenciales, lisina 314 (K314) y aspartato (D319) da lugar a la generación de un virus mutante que forma placas de lisis mucho más pequeñas de lo normal, debido a problemas en la formación de los EEV[Roper *et al*, 1999].
- Se ha reseñado la presencia de dos cisteínas, C185 y C186, implicadas en la palmitilación de la proteína p37, el producto del gen F13L [Grosenbach *et al*, 1997]. La ausencia de palmitilación de la proteína p37 genera viriones incapaces de formar placas de lisis de tamaño normal. Por lo tanto, la unión de un ácido

palmítico a la proteína p37 mediante un enlace tioester parece ser necesaria para que la proteína vaya a la membrana y se produzca la correcta salida de los EEV de la célula.

Se analizó el gen M022L en busca de evidencias que lo relacionen con el gen F13L. Lo primero que se hizo fue un alineamiento entre la secuencia de aminoácidos resultante de la traducción del gen M022L con la secuencia de aminoácidos resultante de la traducción del gen F13L, para comparar ambas y determinar su grado de similitud. En la Figura4 se muestra el alineamiento entre ambas secuencias. La semejanza de ambas secuencias proteicas es del 55% , y el E-valor obtenido es muy bajo.

		1		50
F13L VV	(1)	-MWPFSVPA	GAKCRIVETLPENMDFRSDHLITTFECFNETITLAKKVIYI	
M022L MV	(1)	MLSLFSKPP	GAGCRIVETVPENLGITIQHMHTHECFDELITQAKRYIHI	
		51		100
F13L VV	(50)	ASFCCNPLST	IRGALIFDKLKEASEKGIKIIVLLDERGKRNLGELQSHCP	
M022L MV	(51)	ASFCCNLRIT	DQGRILMKKLKEAAKSGVRVTILVDYQSG-NKDEELLES	
		101		150
F13L VV	(100)	DINFITVNI	DKKNVGILLGCFWVSDDERCYVGNASFTGGSIHTIKTLGV	
M022L MV	(100)	NVEYIKVKI	GKRYNPGVLLGSFWIVDGTRCYIGNASLTGGSSISNIKTLGV	
		151		200
F13L VV	(150)	YSYPPLTDL	RRRFDTFKAFNSAKNSWLNLCSAACCPVSTAYHIKNP	
M022L MV	(150)	YSYAPLADL	RRRFSDFKAFNGNK-SILSILHTACCPVSTAYHIKNP	
		201		250
F13L VV	(200)	GGVFFTDSP	EHLLGYSRDLDTDVVLDKLSAKTSIDIEHLAIVPTTRVDG	
M022L MV	(199)	GGVFLSDSP	DYMLGCSRTLDADVVLGKISKAKKSIKLELLSLVPVIREDE	
		251		300
F13L VV	(250)	NSYWPDIYNS	IEAAINRGVKIRLLVGNWDKNDVYSMATARSLDALCVQ	
M022L MV	(249)	KIVYWPNIY	NELICAAINRGVKVRLVIGSWSNNDIYVMSSVKSLQAMCSN	
		301		350
F13L VV	(300)	NDSLKVF	TIQNNKILIVDIEYVHITSANFDGTHYQNHGFVSNFNSIDKQ	
M022L MV	(299)	NDLIVKVF	YDKNNKIMIVDIEFAHITPANFDGTHYLRHAFVSNFNTVHPE	
		351		374
F13L VV	(350)	LVSEAKKIF	ERDWVSSHKSLSKI-	
M022L MV	(349)	LVHMLNAIF	TRDWENPRNTVYKN-	

Figura4.- Alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas producidas a partir del gen M022L y del gen F13L. La fuente roja resaltada en amarillo indica las regiones totalmente idénticas, la fuente negra resaltada en verde las regiones similares y la fuente negra sin resaltar las regiones distintas. Se muestran enmarcadas las partes de la secuencia esenciales para la función del producto de F13L: en azul celeste el dominio YxxL, en verde la pareja de cisteínas C185 y C186, y en rojo los aminoácidos esenciales del dominio HKD, lisina 314 y aspartato 319.

A continuación se realizó la búsqueda de los dominios esenciales para la función de F13L en la secuencia del producto del gen M022L. Se puede ver en la Figura4 que en

la secuencia del producto del gen M022L se encuentran también las partes esenciales de los tres dominios básicos para la función de F13L:

- El dominio YxxL de ensamblamiento viral.
- Los dos aminoácidos esenciales para el dominio HKD, Lisina 314 y aspartato 319.
- Pareja de cisteínas C185 y C186 necesarias para la palmitilación.

La similitud obtenida en el alineamiento de las secuencias de aminoácidos, la presencia en M022L de los dominios importantes para la función de F13L, así como la situación similar de ambos genes en genoma, parece mostrar la ortología de los F13L y M022L, por lo que se decidió utilizar dicho gen M022L para la generación del virus recombinante atenuado.

III.2.-Generación del plásmido pGEM F1gfpF2

III.2.1.-Estrategia general para la generación la cepa de Myxoma virus recombinante

Para la obtención de la cepa recombinante de Myxoma virus atenuado por eliminación del gen M022L se recurrió a un procedimiento de recombinación homóloga. Se generó un plásmido, pGEM F1gfpF2, que contiene la secuencia del gen *gfp* flanqueada por dos secuencias del genoma de Myxoma virus, denominadas a partir de aquí F1 y F2. Estas secuencias flanquean al gen M022L en el genoma del virus, y permitirán la recombinación homóloga entre el genoma viral y el plásmido recombinante (Figura 5). Una vez se dispuso del plásmido recombinante se realizó un experimento de recombinación homóloga. Gracias a la presencia de las secuencias F1 y F2 tanto en el genoma de MYXV como en el plásmido pGEM F1gfpF2 el gen M022L del genoma de MYXV se sustituyó por el gen *gfp* del plásmido, generando un virus recombinante carente del gen M022L y con el gen *gfp* como gen marcador.

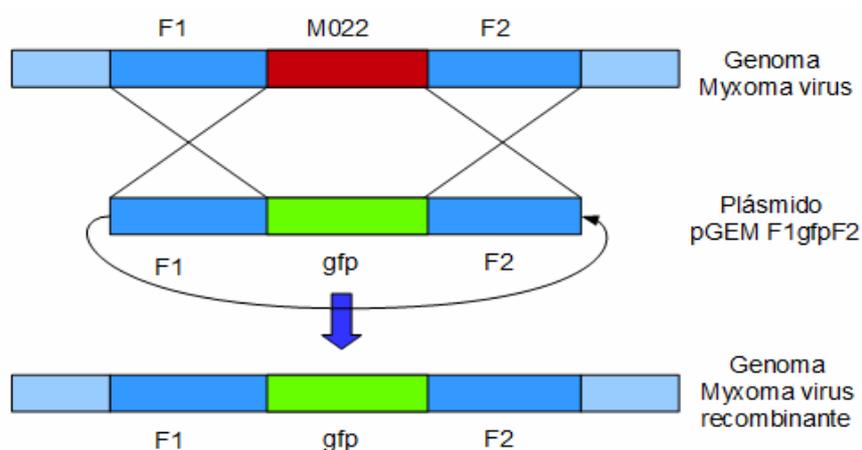


Figura5.- Esquema de la recombinación homóloga entre ambas secuencias laterales F1 y F2 del genoma de Myxoma virus y del plásmido pGEM F1gfpF2 para dar lugar al virus recombinante en el que el gen M022L ha sido sustituido por el gen gfp.

III.2.2.-Amplificación de F1, F2 y gfp y obtención del fragmento F1gfpF2

Para la generación del plásmido recombinante se hizo la amplificación de los fragmentos laterales F1 y F2 a partir de DNA de MYXV de la cepa Lausanne, y la amplificación del fragmento gfp a partir del plásmido de laboratorio pcDNAGFP. Para la obtención de los amplicones y la unión de éstos para formar el fragmento F1gfpF2 se utilizaron tres estrategias distintas, debido a que no se consiguió tener éxito con las dos primeras estrategias utilizadas. Para la amplificación de F1, F2 y gfp en las dos primeras estrategias se utilizaron los cebadores de la Tabla1, y los cebadores de la Tabla 2 en la última de ellas.

En la primera de las estrategias (Figura 6) llevadas a cabo para la obtención del fragmento F1gfpF2, se trató de realizar una PCR solapante para crear un vector de transferencia que contuviese F1 y F2, en el que poder incluir el amplicón gfp mediante las enzimas de restricción *SfiI* y *BglIII*, pero que permitiese además la inclusión de otro amplicón cualquiera en caso de necesidad.

En la segunda de las estrategias diseñadas (Figura 7) se trató de unir los tres amplicones F1, gfp y F2 mediante el uso de enzimas de restricción y ligación,

intentando una ligación simultanea de los tres amplicones para una posterior clonación. Sin embargo, ni siquiera mediante una PCR con los oligos FwM022 y RvM022 nos permitió obtener el fragmento completo formado por F1, gfp y F2.

En la última de las estrategias utilizadas (Figura 8) se trató de realizar una PCR solapante entre los amplicones F1, gfp y F2, de tal forma que se juntasen los tres mediante la ayuda de cebadores diseñados específicamente para ello y no mediante el uso de enzimas de restricción. Para esta última estrategia se tuvieron que utilizar los cebadores de la Tabla2 para la obtención de F1, gfp y F2 a excepción de FwM022 y RvM022.

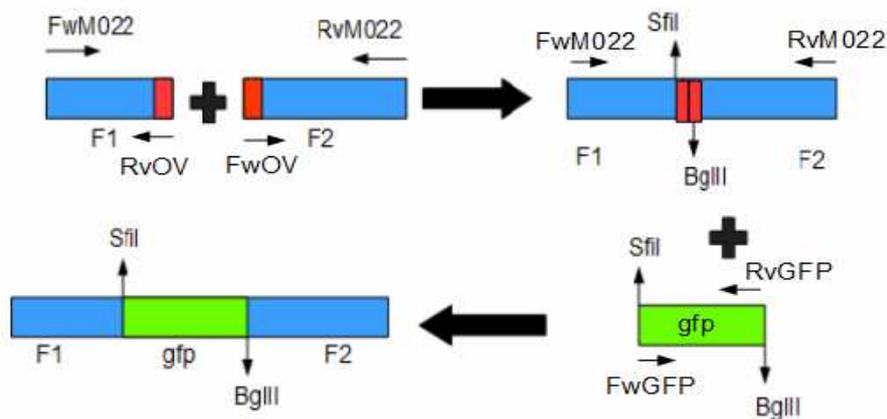


Figura6.- Esquema de la primera de las estrategias utilizadas para la obtención del fragmento F1gfpF2. En rojo se marca la parte de los amplicones que es complementaria a ambos y que permite la hibridación de ambos amplicones en la PCR solapante.

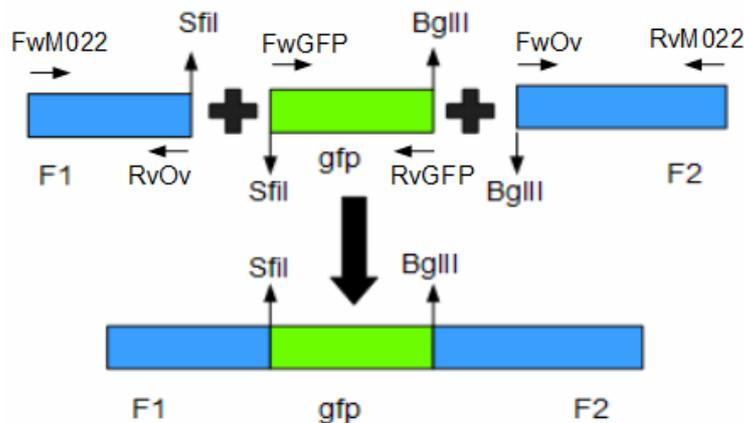


Figura7.- Esquema de la segunda de las estrategias utilizadas para la obtención del fragmento F1gfpF2.

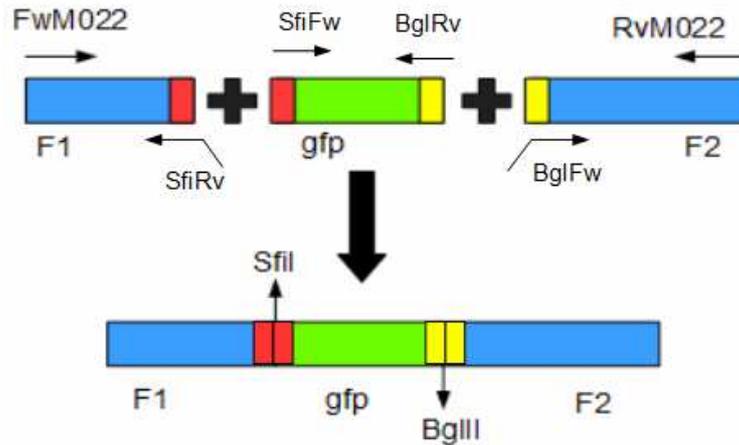


Figura8.- Tercera de las estrategias empleadas para la obtención del fragmento F1gfpF2. En rojo se muestra la parte de los amplicones F1 y gfp que es complementaria a ambos, y en amarillo la parte de secuencia de los amplicones gfp y F2 que es complementaria a ambos. Ambas secuencias complementarias permitirán la hibridación de los fragmentos durante la PCR solapante.

En la amplificación llevada a cabo siguiendo la estrategia número 3, el tamaño de los fragmentos esperados es aproximadamente de 1kb, 1,3kb y 760pb respectivamente. Como se puede observar en la Figura 9, con la última de las estrategias empleadas se consiguieron amplificar los fragmentos de los tamaños deseados. Se realizó la purificación de dichos fragmentos cortando la banda correspondiente del gel y purificando el DNA.

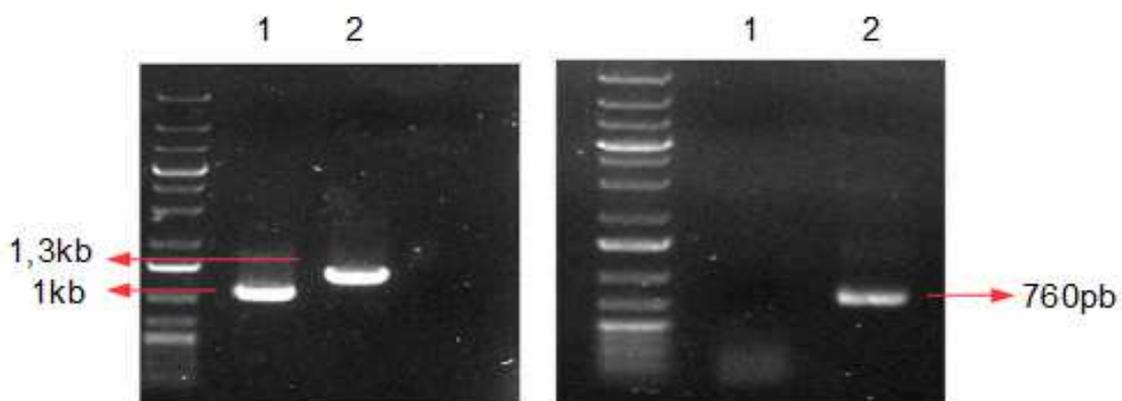


Figura9.- Izda: Electroforesis de los amplicones F1 y F2. La calle 1 se corresponde con el amplicón F1 y la calle 2 con el amplicón F2. Dcha: Electroforesis del amplicón gfp. Las calle 1 se corresponde con el control negativo de la PCR y la calle 2 con el amplicón de gfp.

Una vez se dispuso de los tres amplicones purificados, se realizó la PCR solapante para obtener el fragmento F1gfpF2 (Figura 10). Mediante el uso de las enzimas de restricción *Bgl*III y *Sfi*I se certificó que el producto obtenido estaba formado por los fragmentos deseados. Se purificó el amplicón de interés cortando la banda correspondiente del gel y utilizando un kit de purificación de DNA.

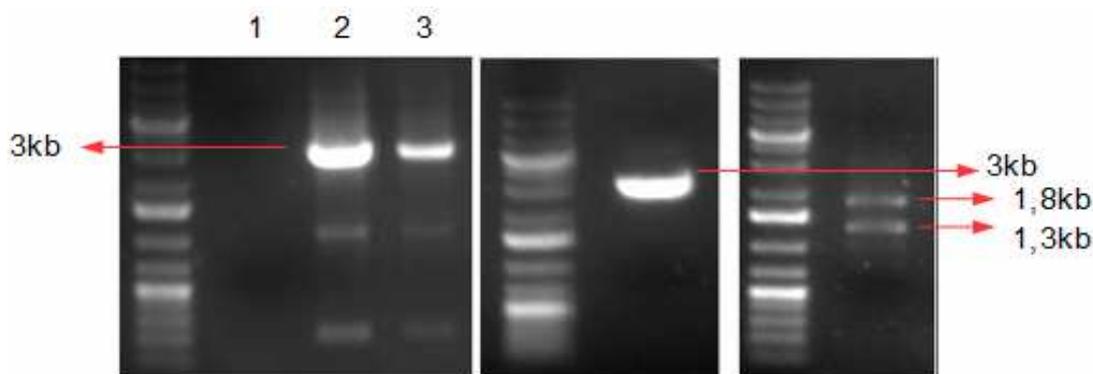


Figura10.- Izda: Electroforesis del producto de la PCR solapante (F1gfpF2) utilizando F1, F2 y *gfp* como DNA molde. La calle 1 corresponde al control negativo de la PCR, mientras que en las calles 2 y 3 se muestran distintas cantidades del producto de PCR (F1gfpF2). Centro: Electroforesis del producto de F1gfpF2 tras el proceso de puificación de la banda correspondiente. Dcha: Electroforesis de la digestión del producto de la PCR solapante (F1gfpF2).

Al cortar el fragmento F1gfpF2 con las enzimas de restricción *Bgl*III y *Sfi*I se esperaban obtener tres fragmentos correspondientes con F1, F2 y *gfp*. Sin embargo, sólo se obtuvieron dos fragmentos. Aún así, los fragmentos obtenidos parecen corresponderse con el fragmento F2 (1,3 kb) y con la suma de los fragmentos F1 y *gfp* (1,8 kb en total). Este resultado es esperable dado que es relativamente frecuente que el enzima *Sfi*I utilizado no actúe adecuadamente.

III.2.3.-Obtención del plásmido pGEM F1gfpF2

Cuando se dispuso del fragmento F1gfpF2 purificado, se procedió a incluir dicho fragmento en el plásmido comercial pGEM F1gfpF2. La ligación de ambos se utilizó para transformar células competentes XL-1 de *E.coli* que se cultivaron en medio LB-agar con IPTG y X-gal. El resultado fue la obtención de 13 colonias blancas de un

total de 40 colonias. Estas colonias blancas se suponen transformadas con un plásmido con inserto, mientras que el resto de colonias se suponen transformadas pero con el plásmido sin inserto. Se prepararon minipreps a partir de dichas colonias y se sometieron a restricción diagnóstica (Figura11), digiriéndolos con *EcoRI*, que extraerá el inserto introducido en el plásmido, y con *BglII* y *SfiI*, que cortarán el inserto para averiguar si se corresponde con F1gfpF2.

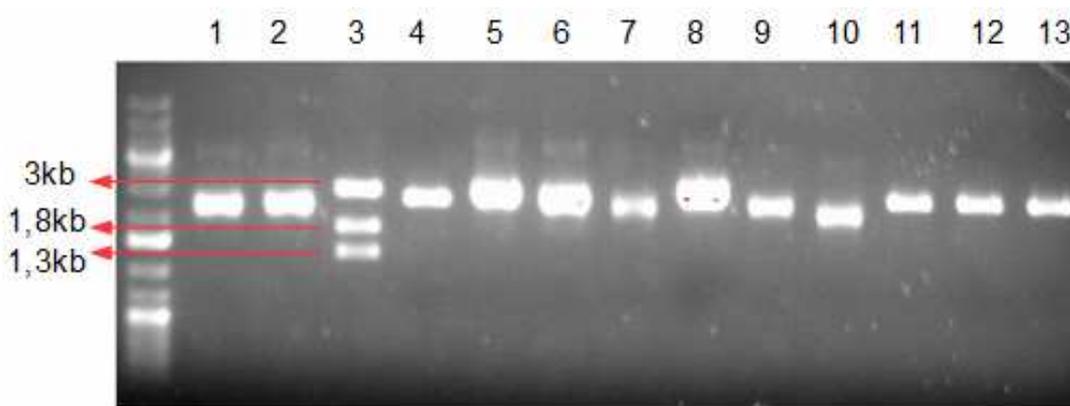


Figura11.- Digestión con *EcoRI*, *BglII* y *SfiI* de los minipreps obtenidos de las colonias transformadas con el plásmido recombinante. Las calles 1-13 muestran los distintos minipreps, siendo el miniprep 3 el que parece seguir el patrón de digestión esperado.

La miniprep número 3 parece corresponderse con el resultado esperado, ya que mediante la restricción diagnóstica se obtuvo el fragmento correspondiente al plásmido sin inserto (3kb) debido a la acción de *EcoRI*, además de las mismas dos bandas que en la digestión del fragmento F1gfpF2 realizada con anterioridad, correspondientes al fragmento F2 y al fragmento formado por F1 y gfp. Parece haberse obtenido por tanto el plásmido pGEM F1gfpF2 deseado (Figura 12), que será el utilizado para realizar la recombinación homóloga con MYXV.

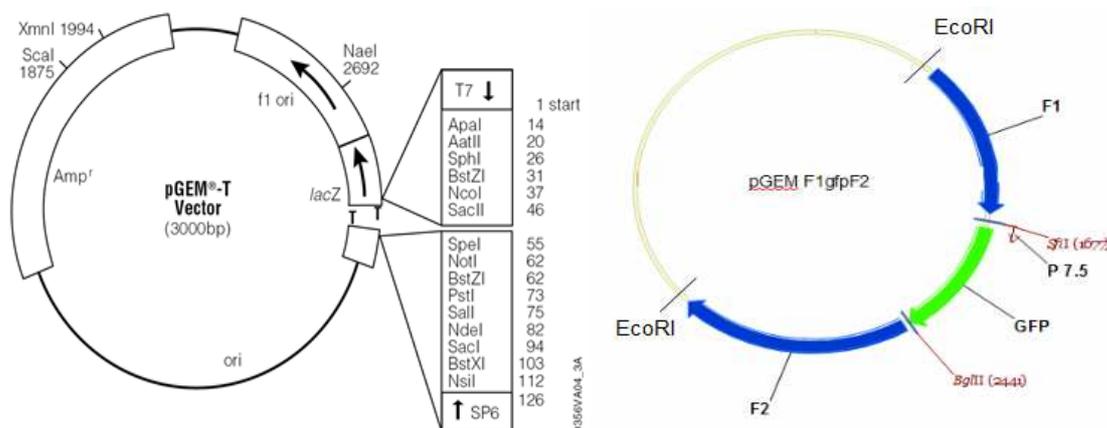


Figura12.- Izda: Esquema del plásmido pGEM-T Easy de Promega utilizado para incluir el fragmento F1gfpF2. Dcha: Esquema del plásmido pGEM F1gfpF2, conteniendo el gen gfp flanqueado por la secuencias laterales F1 y F2.

III.3.- Selección de la línea celular óptima para la recombinación homóloga

Antes de realizar la recombinación homóloga se realizó un experimento para determinar qué línea celular de entre las tres disponibles (RK-13, Vero y HEK-293) era la idónea para ser utilizada en la recombinación homóloga. En el laboratorio se disponía de protocolos optimizados para la transfección de las células Vero y HEK-293, pero no para las células RK-13. Sin embargo, se sabe que las células RK-13 y Vero se infectan bien con MYXV, pero no se sabe si las células HEK-293 se pueden infectar o no.

En primer lugar se realizó la infección de los tres tipos celulares con MYXV, cuya presencia dentro de las células infectadas se detectó con ayuda de anticuerpos policlonales de conejo anti-Myxoma y anticuerpos secundarios que detectan los anticuerpos de conejo primarios y se pueden detectar por microscopia de fluorescencia (Figuras 13, 14). Se utilizaron dos multiplicidades de infección (MOIs) (relación de viriones por célula) distintas para la infección viral, 10pfu/cel y 1pfu/cel (pfu: unidad formadora de placa).

En un experimento paralelo se llevó a cabo la transfección de las células con el plásmido pcDNAGFP. La expresión de *gfp* en el interior de las células transfectadas se determinó por la fluorescencia generada por la proteína GFP expresada, al mirar las células al microscopio de fluorescencia tanto a las 24 (Figuras 15, 16 y 17) como a las 72 horas de la transfección. La eficiencia de transfección obtenida se muestra en la Tabla 3. Se utilizaron dos concentraciones de dicho plásmido para la transfección, 10 $\mu\text{gDNA/pocillo}$ y 0.1 $\mu\text{gDNA/pocillo}$.

En todos los casos se vió fluorescencia emitida por el anticuerpo secundario, por lo que todas las líneas celulares parecen haberse infectado correctamente. Además, todas las líneas celulares parecen haberse transfectado correctamente pues en todas ellas se vió fluorescencia verde. Se pudo apreciar sin embargo que la monocapa de las células transfectadas estaba en peor estado que la monocapa de las células control, quizás por un efecto nocivo de la lipofectamina sobre las células.

Basandonos en el hecho de que las células RK-13 se transfectaron correctamente, y que se sabe por experimentos anteriores que se infectan bien con Myxoma virus, se determinó que las células RK-13 fuesen las utilizadas en los experimentos de recombinación homóloga.

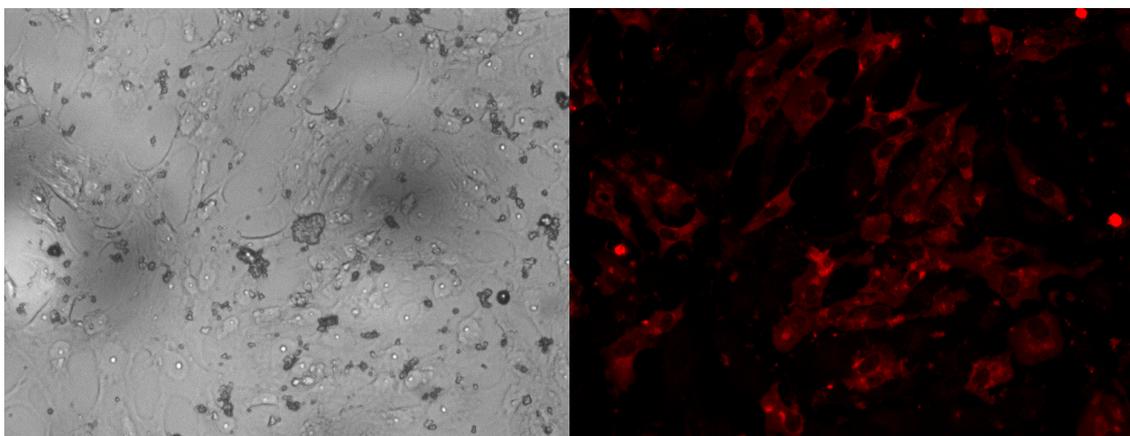


Figura 13.- Imagen de microscopio confocal de células Vero a las 72 horas de la infección con Myxoma

virus. A la izquierda se muestra la monocapa bajo luz visible y la derecha bajo luz ultravioleta, para que se vea sólo la fluorescencia emitida por el marcaje del anticuerpo secundario.

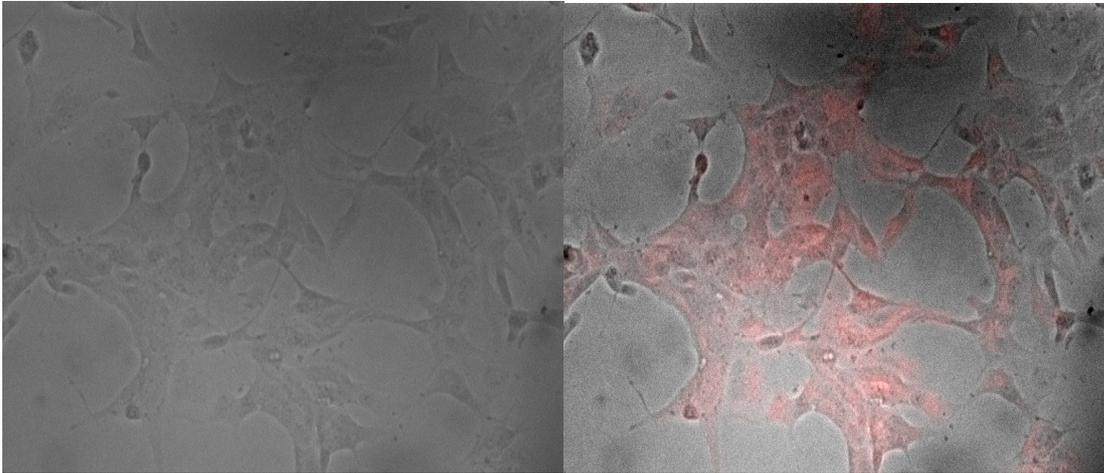


Figura14.- *Imagen de microscopio confocal de células RK-13 a las 72 horas de la infección con Myxoma virus. A la izquierda se muestra la monocapa bajo luz visible y la derecha se muestra la monocapa bajo luz visible y luz ultravioleta, para que se vean tanto la monocapa como la fluorescencia emitida por el anticuerpo secundario.*

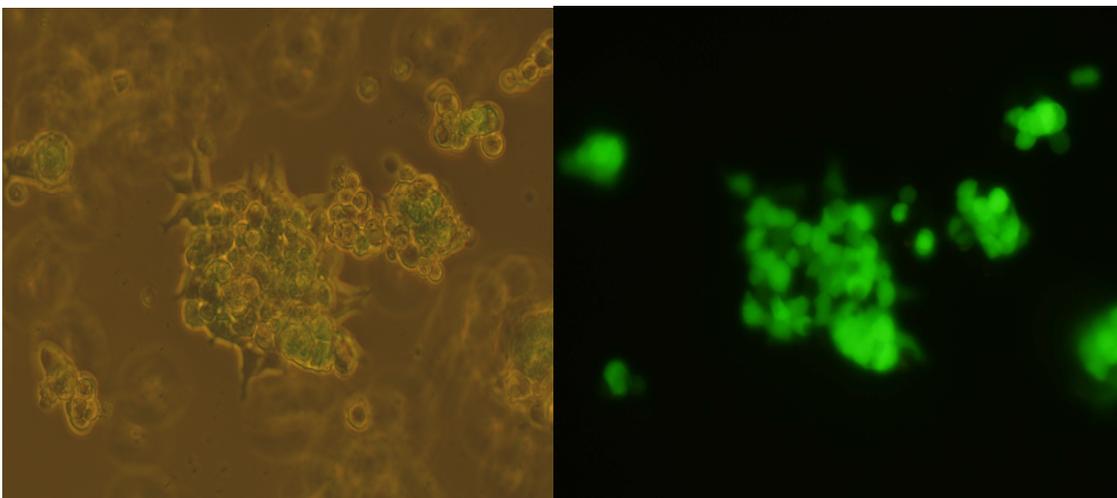


Figura15.- *Imagen de microscopio de fluorescencia de células HEK-293 a las 24 horas de la transfección con pcDNAGFP. A la izquierda se muestra la monocapa bajo luz visible y luz ultravioleta y la derecha sólo bajo luz ultravioleta, para que se vea sólo la fluorescencia emitida por gfp.*

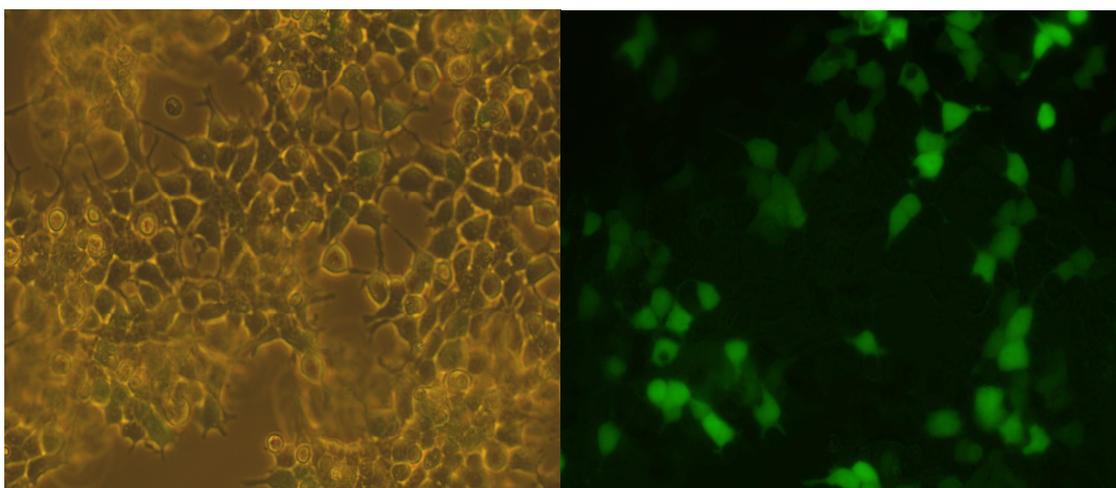


Figura16. Imagen de microscopio de fluorescencia de células RK-13 a las 24 horas de la transfección con pcDNAGFP. A la izquierda se muestra la monocapa bajo luz visible y luz ultravioleta y la derecha sólo bajo luz ultravioleta, para que se vea sólo la fluorescencia emitida por *gfp*.

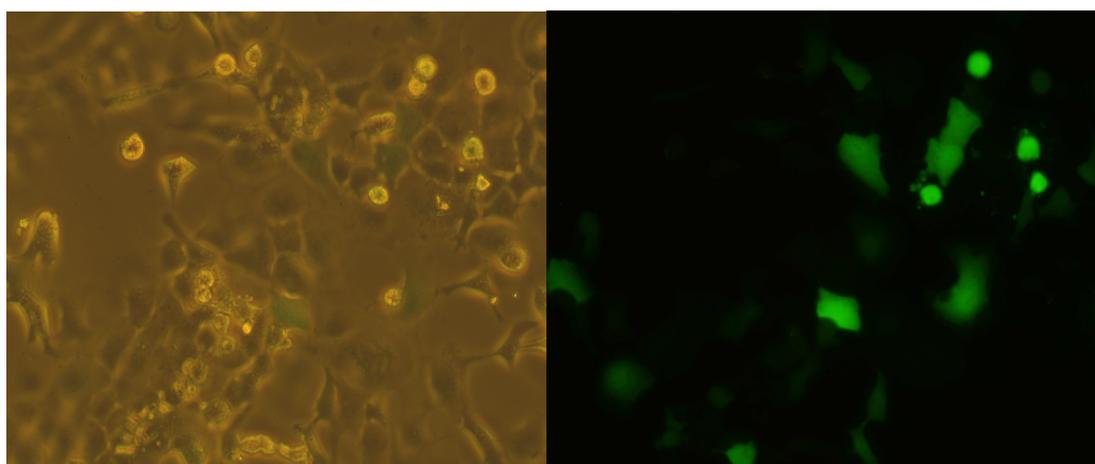


Figura17.- Imagen de microscopio de fluorescencia de células Vero a las 24 horas de la transfección con pcDNAGFP. A la izquierda se muestra la monocapa bajo luz visible y luz ultravioleta y la derecha sólo bajo luz ultravioleta, para que se vea sólo la fluorescencia emitida por *gfp*.

Línea celular	Eficiencia de transfección (%)
RK-13	34
Vero	32
HEK-293	50

Tabla3.- Eficiencia de transfección de las células RK-13, Vero y HEK-293 con el plásmido pcDNA GFP.

III.4.- Obtención de Myxoma virus recombinantes

Una vez se seleccionó la línea celular óptima para la realización de la recombinación homóloga, así como el protocolo de infección y transfección a utilizar, se realizó la infección y la transfección simultánea de las células RK-13 con MYXV cepa Lausanne y con el plásmido recombinante pGEM F1gfpF2.

III.4.1.-Experimento 1

En un primer experimento la transfección se realizó con 4 µg DNA/pocillo del fragmento F1gfpF2, y para la infección se utilizó una MOI de 0.05 pfu/célula [Lorenzo *et al*, 2004].

III.4.2.-Experimento 2

En un segundo experimento la transfección se realizó con la misma cantidad de DNA y la misma MOI, pero utilizando el plásmido pGEM F1gfpF2 en lugar de sólo el fragmento F1gfpF2.

III.4.3.-Experimento 3

Por último, en un intento de optimizar el proceso de recombinación homóloga y conseguir un mayor número de recombinantes, así como una mayor intensidad de la fluorescencia observada, se intentó realizar el experimento utilizando de nuevo el plásmido pGEM F1gfpF2 pero variando la concentración de DNA y la MOI utilizada. Se utilizaron 8 µg DNA/pocillo, y una MOI de 0.01 pfu/célula, debido a que en los experimentos anteriores se observó que la monocapa celular estaba demasiado dañada por el efecto de la infección viral.

III.4.4.- Obtención de recombinantes

72 horas después de la infección y la transfección simultáneas se observaron células fluorescentes al mirar la placa al microscopio de fluorescencia (Figura18). La presencia de fluorescencia indica que ha habido transfección e infección en una misma célula, y que se está produciendo la expresión de *gfp*. Este paso inicial lo denominaremos P0. Se realizó una titulación del stock viral obtenido en P0 para intentar aislar placas de virus recombinantes (Figura19), en un primer paso de la purificación denominado P1. Se observaron placas de virus recombinante, por lo que podemos concluir que parece haber tenido éxito el proceso de obtención de Myxoma virus recombinante. Para generar un stock de virus recombinante purificado se deben realizar pasos adicionales de purificación.

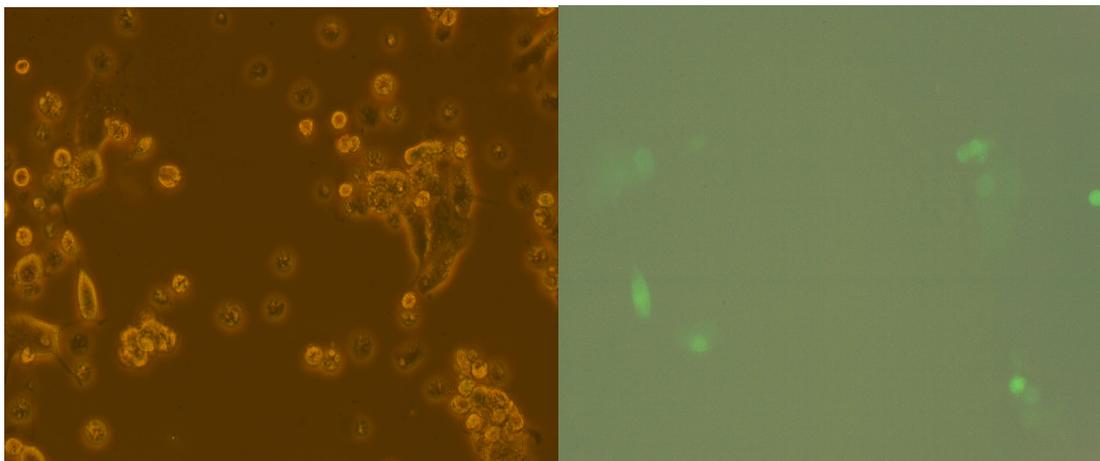


Figura18.- Imagen de microscopio de fluorescencia de células RK13 a las 72 horas de ser infectadas con Myxoma virus y transfectadas con pGEM F1gfpF2. Se muestran bajo luz visible a la izquierda y bajo luz ultravioleta a la derecha.

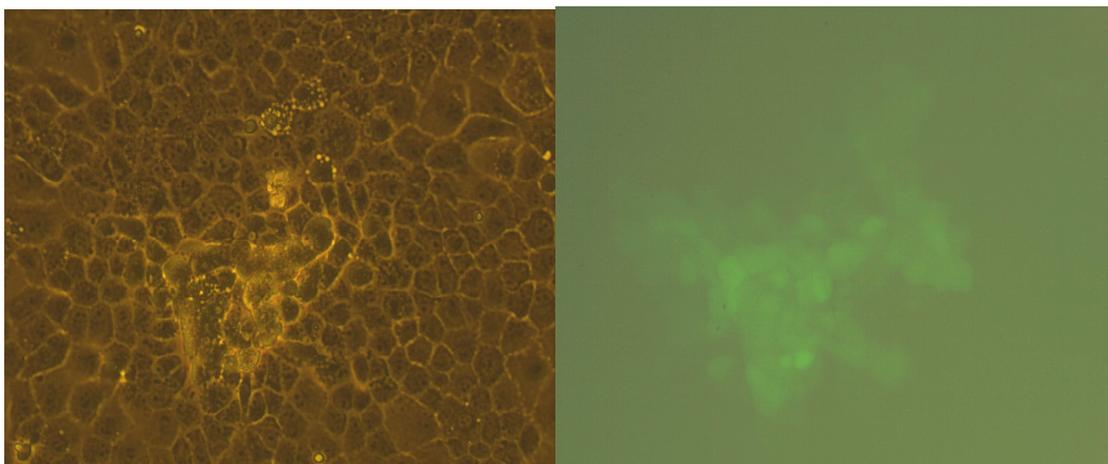


Figura19.- Imagen de microscopio de fluorescencia de células RK-13 a las 72 horas de la infección con *Myxoma virus recombinante* para realizar la titulación del virus.

III.4.5.-Purificación de los recombinantes obtenidos

Para el aislamiento de los recombinantes obtenidos, se picaron placas virales individuales y se realizó la infección de células con los viriones de dichas placas. Tras la infección viral se realizó de nuevo la titulación de los viriones obtenidos para volver a aislar placas recombinantes en un segundo paso de purificación del virus denominado P2. Como se puede ver en la Figura 20, se observaron placas de recombinantes. El número de placas recombinantes no se ve aumentado durante los distintos pasos de purificación, y la fluorescencia fue muy débil en todo momento. En un tercer paso de purificación (P3) se dejó de observar fluorescencia.

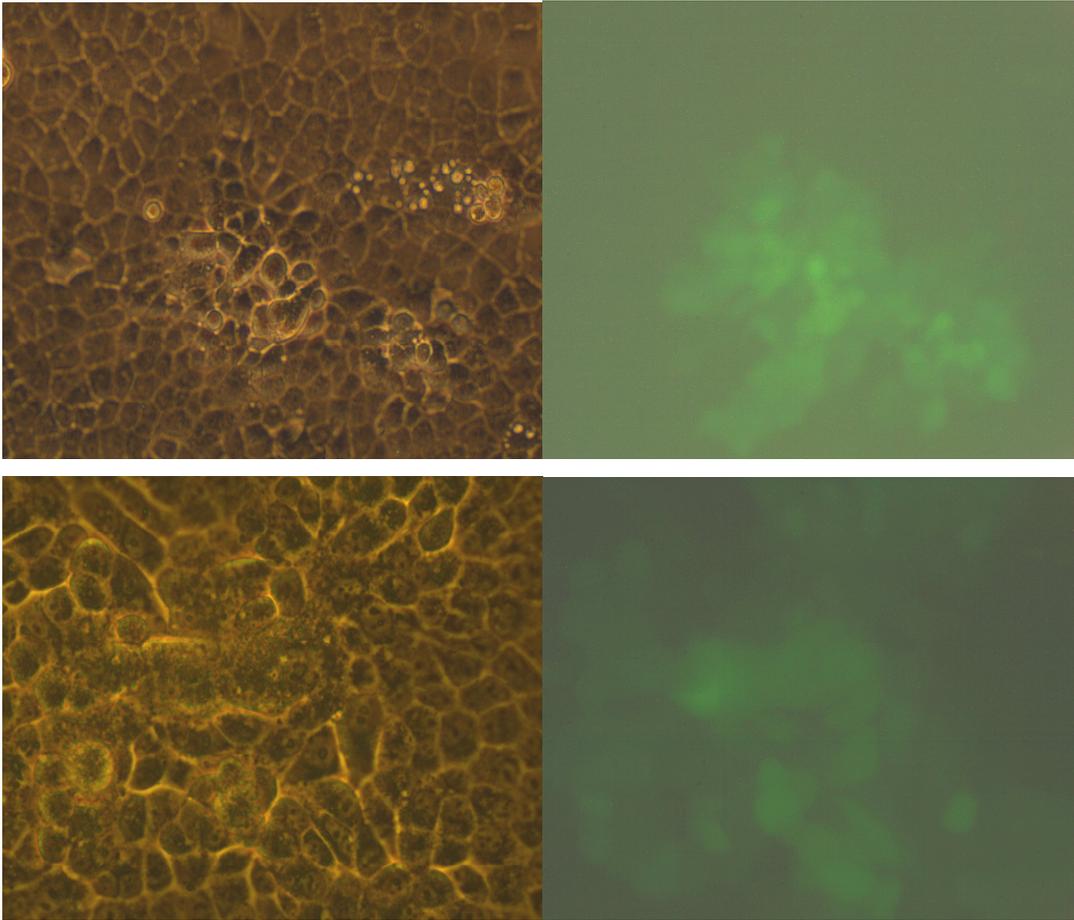


Figura20.- Imagen de microscopio de fluorescencia de células RK-13 a las 72 horas de la infección con *Myxoma virus* recombinante obtenido tras un primer paso de purificación.

IV.-Discusión

El estudio del gen M022L realizado permite aportar evidencias acerca de la homología entre el gen F13L de Vaccinia virus y el gen M022L de MYXV. Ambos genes codifican proteínas con una similitud del 55% en su secuencia de aminoácidos. La similitud en la cadena de aminoácidos puede no parecer muy alta, pero, teniendo en cuenta que son genes pertenecientes a virus con hospedadores distintos y separados evolutivamente desde hace mucho tiempo, una similitud del 55% puede ser algo a tener en cuenta. Ambas secuencias aminoacídicas comparten las partes principales de los dominios esenciales para la realización de la función del producto de F13L. Es de esperar por lo tanto que la proteína codificada por el gen M022L realice una función parecida a la desempeñada por la proteína producida por el gen F13L. Es gracias a estos dominios que la proteína p37, producto del gen F13L, es esencial en la maduración de los viriones de Vaccinia virus para formar los EEV. Dado que lo que se quiere es seleccionar un gen cuya delección implique una deficiencia en la virulencia de virus, seriamente afectada si no se forman EEV, se utilizó el gen M022L como gen a deleccionar del genoma de Myxoma virus, con el fin de que el virus recombinante obtenido no sea capaz de generar los EEV y carezca de virulencia, pudiendo ser utilizado por lo tanto como vacuna sin que se generen problemas relacionados con su actividad infecciosa.

La obtención del plásmido pGEM F1gfpF2 generó muchos problemas, tanto durante la construcción del fragmento F1gfpF2 como en la incorporación de dicho fragmento en el plásmido pGEM-T Easy. Fue necesario la utilización de varias estrategias debido a las dificultades que se presentaron. Sólo se consiguió el fragmento F1gfpF2 deseado cuando se realizó una tercera estrategia, realizando una PCR solapante y clonando el producto de dicha PCR en el plásmido pGEM-T Easy.

El número de colonias recombinantes obtenido fue siempre muy pequeño, quizás por la posible de toxicidad del fragmento F1gfpF2, o por algún problema relacionado con la ligación de dicho fragmento F1gfpF2 con el plásmido. De todas formas, se logró

obtener colonias recombinantes a partir de las cuales se pudo purificar DNA plasmídico. Dicho DNA plasmídico fue sometido a restricción diagnóstica mediante el uso de enzimas de restricción para ver si contenía el inserto de interés. Aunque contiene un inserto de tamaño total esperado, se observó un problema durante la restricción diagnóstica. Se utilizaron dos enzimas de restricción que deberían cortar y separar los tres fragmentos F1, *gfp* y F2, ya que su secuencia de corte fue incluida en los cebadores utilizados. Se vió que el enzima *Bgl*III cortaba pero que el enzima *Sfi*I no. A pesar de que se repitió varias veces dicha restricción cambiando las condiciones utilizadas, no se consiguió en ningún momento que *Sfi*I cortase de forma exitosa. Se cree que pudo haberse producido una mutación durante la amplificación de los fragmentos individuales o durante la PCR solapante, que afectó al sitio de corte haciendo que *Sfi*I no fuese capaz de cortar donde se esperaba. A pesar de ello, los resultados obtenidos cuadran con lo esperado, pues se obtuvo por un lado el fragmento correspondiente al plásmido sin inserto, debido a la acción de *Eco*RI, y por otro lado dos fragmentos, uno correspondiente al fragmento F2, y otro correspondiente a la suma de los fragmentos F1 y *gfp*, entre los cuales debería cortar *Sfi*I. Se consideró que el fragmento F1*gfp*F2 y el plásmido pGEM F1*gfp*F2 contenían la secuencia de DNA deseada.

Los resultados obtenidos en el experimento de selección de la línea celular idónea para la realización de la recombinación homóloga nos permitieron decidir qué línea celular utilizar durante los subsiguientes experimentos de recombinación homóloga, además de obtener resultados en parte inesperados. Se obtuvo una eficiencia de transfección aceptable en todas las líneas celulares, especialmente sorprendente en el caso de las células RK-13, que no habían sido transfectadas correctamente en experimentos anteriores y de las que no se disponía de ningún protocolo de transfección. Como se puede observar en los resultados, en todos los casos hay gran cantidad de fluorescencia verde, lo cual indica que el plásmido ha entrado bien en las células, y que el protocolo de transfección utilizado parece que ha sido un éxito. La transfección de DNA podría ser un paso limitante a la hora de obtener recombinantes, pues si no entra el plásmido en las células no es posible que haya recombinación con MYXV. Sin embargo, la razonablemente alta eficiencia de transfección obtenida nos da

pie a pensar que el paso de transfección de DNA no supondrá ningún problema y no será un paso limitante a la hora de obtener recombinantes. De todas formas, lo más sorprendente de todo el experimento es la buena infección obtenida en las células HEK-293, que no se esperaba que fuesen a ser infectadas correctamente, y la poca infección que parece haber tenido lugar en las células RK-13. Éstas últimas células son las que más fácilmente deberían infectarse porque son células de conejo, el hospedador de MYXV, pero, por alguna razón desconocida, no ha tenido lugar la infección de la forma esperada. Si tomamos los resultados de forma conjunta, vemos que cualquier línea celular parece ser susceptible de ser usada para la realización de la recombinación homóloga, pues en todas se consiguió la transfección de forma exitosa y en todas ha habido infección viral. Sin embargo, dado que el factor limitante esperabamos que fuera la transfección y ésta ha tenido éxito en todos los tipos celulares, y que las células RK-13 proceden del hospedador habitual de MYXV y es sabido por otros experimentos que se infectan bien, decidimos utilizar la línea celular RK-13 para los experimentos de recombinación homóloga, a pesar de que tanto HEK-293 como Vero parecen ser también buenos candidatos.

En todos los experimentos hechos para generar MYXV recombinantes, la fluorescencia obtenida fue muy débil, y el número de células fluorescentes muy bajo. Una de las posibilidades de fracaso que se presentaba desde el primer momento era que el promotor p7.5 escogido para iniciar la transcripción de *gfp* en los virus recombinantes no fuera el adecuado y no se diese expresión del gen *gfp* aunque hubiera sido exitosamente introducido en el genoma de MYXV. Sin embargo, dado que se observó fluorescencia tras la recombinación homóloga, se puede concluir que ha habido expresión de dicho gen *gfp*, a pesar de no haber sido al nivel esperado, por lo que el promotor utilizado parece ser correcto y funcional. Quizás se podría tratar de optimizar la secuencia del promotor utilizada para tratar de obtener un mayor nivel de expresión del gen *gfp*. La utilización de un promotor específico de MYXV, como puede ser el propio promotor del gen M022L, podría ser también estudiada con el fin de aumentar la expresión de *gfp*. Sin embargo, la baja fluorescencia obtenida puede que no tenga nada que ver con el nivel de expresión de *gfp* sino que puede deberse a otras causas.

Durante el proceso de purificación de placas virales del stock recombinante obtenido en el primer experimento se esperaba que a cada ciclo de purificación la fluorescencia obtenida fuese mayor, especialmente en cuanto al número de células que presentasen fluorescencia. Sin embargo, tras una segunda ronda de purificación del stock viral recombinante apenas se pudo ver fluorescencia alguna. Lo primero que podemos pensar es que a pesar de que se produjese recombinación homóloga entre el plásmido recombinante y el genoma de MYXV, dicha recombinación homóloga pudo haber sido solamente transitoria, revirtiéndose los efectos de la recombinación homóloga y perdiendo el virus recombinante el gen *gfp* de forma progresiva hasta dejar de observar fluorescencia alguna a causa de la ausencia de dicho gen. Otra de las posibilidades que pueden justificar la pérdida de la fluorescencia es la posibilidad de que, por algún motivo, la presencia del fragmento F1*gfp*F2 en el genoma viral sea tóxico para el virus, haciendo que no sea posible su correcta replicación, afectando mucho más de lo esperado a la generación de viriones maduros. Además, si la recombinación homóloga tiene lugar en otra parte del genoma viral además de en el lugar esperado, puede que se vean afectados otros genes mucho más relevantes a la hora de que el virus sea capaz de replicarse.

En los primeros experimentos para la generación de un recombinante por recombinación homóloga realizados la MOI utilizada resultó ser demasiado alta, pues el efecto citopático del virus sobre las células fue muy dañado y resultó en el poco crecimiento de la monocapa celular y en la rotura de demasiadas células de forma muy precipitada. Durante el proceso de optimización de la recombinación homóloga, la MOI utilizada fue menor que en los experimentos anteriores, con el fin de que la monocapa celular permaneciese más íntegra a pesar de la infección viral, dando mayor tiempo para que se produjese la recombinación homóloga y a que más células permaneciesen íntegras. Sin embargo, la reducción de la MOI no pareció haber sido suficiente y todavía hubo signos de demasiada actividad viral a las 72 horas. Reduciendo aún más la MOI utilizada puede que se obtuviesen mejores resultados, ya que las células pueden permanecer infectadas y transfectada durante más tiempo y es más probable que se produzca recombinación homóloga. En pasos siguientes de la optimización del proceso

debería estudiarse la reducción de la MOI como uno de los factores críticos para la obtención de recombinantes. Se podría estudiar también la recogida de los virus a tiempos anteriores a 72 horas, tras sólo una o dos rondas de replicación viral, para que no se produjese tanta rotura de las células debido a la infección.

De la misma forma, la cantidad de DNA utilizada en el proceso de optimización de la recombinación homóloga fue mayor a la cantidad utilizada durante los experimentos iniciales, para ver si la cantidad de DNA influía en la cantidad de recombinantes obtenidos. Además, se utilizó también DNA linealizado para tratar de favorecer el proceso de recombinación homóloga. En el caso de la utilización de DNA linealizado no parece que cambie nada con respecto a la utilización de DNA no linealizado, pues no se obtiene mayor cantidad de recombinantes. Sin embargo, la cantidad de DNA utilizado si puede que sea un factor crítico a tener en cuenta. En el pocillo en que se utilizó una mayor cantidad de DNA se observó mayor fluorescencia que en el resto de pocillos. Por lo tanto, en los siguientes pasos de optimización del proceso debería estudiarse la cantidad de DNA como uno de los factores críticos a la hora de obtener recombinantes, pues el proceso de recombinación homóloga parece verse afectado positivamente por la cantidad de DNA utilizado para la transfección.

Por falta de tiempo, no fue posible realizar la secuenciación del plásmido pGEM F1gfpF2 utilizado para la recombinación homóloga. Sin embargo se va a trabajar en ello, pues la secuencia de dicho plásmido nos permitiría saber si realmente el plásmido de que se dispone contiene el gen *gfp* flanqueado por las secuencias F1 y F2, y si realmente el sitio de corte de *Sfi*I ha sido mutado y por eso no se produce el corte durante la restricción diagnóstica. La secuenciación de parte del genoma del virus recombinante obtenido, particularmente la parte donde se produjo la recombinación homóloga, hubiera sido también de gran interés. Mediante secuenciación se hubiera podido determinar si el virus recombinante contiene el gen *gfp*, y si se ha producido realmente recombinación homóloga. Tras picar placas virales se consiguió fluorescencia en P1 y en P2, pero no se observó fluorescencia en una tercera ronda de purificación P3. Haría falta disponer de cantidad suficiente de los stocks virales en los distintos pasos de

purificación para la extracción del DNA y la secuenciación con el fin de comparar y poder determinar las causas de la pérdida de fluorescencia en éste último paso de purificación

Con respecto a los objetivos que se plantearon al comienzo del proyecto, se puede decir que se han cumplido, aunque hubiera sido preferible disponer de más tiempo para concretar algunos de los resultados y realizar experimentos adicionales que permitiesen una mayor confirmación de éstos. Hubiera sido especialmente interesante poder continuar con la optimización del protocolo de recombinación homóloga y realizar experimentos para determinar las características de replicación del virus recombinante obtenido, así como la secunciación de su genoma.

V.-Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos y a los objetivos establecidos al inicio del proyecto, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- Basados en el análisis bioinformático realizado, el gen M022L de MYXV parece ser ortólogo del gen F13L de Vaccinia virus.
- Es posible la generación de un recombinante de MYXV mediante recombinación homóloga.
- El gen *gfp* es adecuado como gen marcador, permitiendo la selección y el aislamiento de placas de virus recombinantes.
- Serán necesarios futuros experimentos para la caracterización del virus recombinante obtenido, mediante secuenciación y mediante estudios de replicación viral.

VI.-Referencias bibliográficas

- Adams, M.M., van Leeuwen, B.H., Kerr, P.J.** Construction and evaluation of live attenuated myxoma virus vaccines with targeted virulence gene deletions. *Vaccine*. 2008. 26(46):5843-5854
- Angulo E., Bárcena J.** Towards a unique and transmissible vaccine against myxomatosis and rabbit haemorrhagic disease for rabbit populations. *Wildlife Research*. 2007; 34(7) 567–577
- Arthur C.P., Louzis C.** A review of myxomatosis among rabbits in France. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 1988; 7 (4), pp. 959–976
- Blasco R., Moss B.** Extracellular Vaccinia Virus Formation and Cell-to-Cell Virus Transmission Are Prevented by Deletion of the Gene Encoding the 37,000-Dalton Outer Envelope Protein. *J Virol*. 1991; 65(11): 5910–5920.
- Chen X., Anstey A.V., Bugert J.J.** Molluscum contagiosum virus infection. *Lancet Infectious Disease*. 2013;13(10):877-88
- Cameron C., Hota-Mitchell S., Chen L., Barret J., Cao J.X., Macaulay C., Willer D., Evans D., McDaffen G.** The complete DNA sequence of myxoma virus. *Virology*. 1999; 264(2):298-318.
- Dalton K.P., Nicieza I., de Llano D., Gullón J., Inza M., Petralanda M., Arroita Z., Parra F.** Vaccine breaks: Outbreaks of myxomatosis on Spanish commercial rabbit farms. *Veterinary Microbiology*. 2015; 5, Pages 208–216.
- Day M.F., Fenner F., Woodroffe G.W. McIntyre G.A.** Further studies on the mechanism of mosquito transmission of myxomatosis in the European rabbit. *J Hyg*. 1956; 54(2):258–283.
- Davison A.J., Moss B.** Laboratory of Viral Diseases, National InNew vaccinia virus recombination plasmids incorporating a synthetic late promoter for high level expression of foreign proteins. *Nucleic Acids Research*, 1990; Vol. 18, No. 14
- Delibes M., Hiraldo F.** The rabbit as prey in the Mediterranean ecosystem. *Proceedings of the World Lagomorph Conference*. Eds K. Myes, C. D. MacInnes. Guelph, Canada, 1979. 614-622
- Farsang, A., Makranszki, L., Dobos-Kovacs, M., Virag, G., Fabian, K., Barna, T., Kulcsar, G., Kucsera, L., Vetesi, F.** Occurrence of atypical myxomatosis in Central Europe: clinical and virological examinations. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2003. 51 :493-501.

- Fenner F., Marshall I.D.** A comparison of the virulence for European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) of strains of myxoma virus recovered in the field in Australia, Europe and America. *J Hyg* . 1957. 55: 149–191.
- Freeman G., Perera, Fang V.J., Leung G.M., Peiris S.M., Cowling B.J.** Multivariate analysis of factors affecting the immunogenicity of trivalent inactivated influenza vaccine in school-age children. *Epidemiology and Infection*, 2015; 143(3), pp 540-549
- Hawken J., Troy S.B.** Adjuvants and inactivated polio vaccine: A systematic review. *Vaccine*, 2012; 30(49); Pages 6971–6979
- Fenner F., Ratcliffe F.N.** *Myxomatosis*. Cambridge University Press. 1965
- Grosenbach, D.W., Ulaeto D.O., Hruby D.E.** *Palmytilation of the Vaccinia Virus 37-kDa Major Envelope Antigen. Identification of a conserved acceptor motif and biological relevance*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997; Vol. 272, No. 3, pp. 1956–1964.
- Honeychurch K.M., Yang G., Jordan R., Hruby D.E.** The Vaccinia Virus F13L YPPL Motif Is Required for Efficient Release of Extracellular Enveloped Virus. *Journal of Virology*, 2007; Vol. 81, No. 13 p. 7310–7315.
- Katz, E., Wolffe, E., Moss, B.** Identification of second-site mutations that enhance release and spread of vaccinia virus. 2002; *J. Virol.* 76, 11637–11644.
- Katz, E., Ward, B.M., Weisberg, A.S., Moss, B.** Mutations in the vaccinia virus A33R and B5R envelope proteins that enhance release of extracellular virions and eliminate formation of actin-containing microvilli without preventing tyrosine phosphorylation of the A36R protein. *J. Virol.* 2003; 77, 12266–12275
- Kerr P.J., McFadden G.** *Leporipoxvirus*. 2^a Ed. Nueva York: Springer; 2011
- Kerr P.J.** Myxomatosis in Australia and Europe: a model for emerging infectious diseases. *Antiviral Res.* 2012; 93(3): 387-415.
- Kerr P.J., Ghedin E., DePasse J.V., Fitch A., Cattadori I.M., Hudson P.J., Tschärke D.C., Read A.F., Holmes E.C.** Evolutionary History and Attenuation of Myxoma Virus on Two Continents. *PLoS Pathog.* 2012; 8(10)
- Kerr P.J., Liu J., Cattadori I., Ghedin E., Read A.F., Holmes E.C.** Myxoma virus and the Leporipoxviruses: an evolutionary paradigm. *Viruses*. 2015;7(3):1020-61.
- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J.** *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego: 2012
- Kritas, S.K., Dovas, C., Fortomaris, P., Petridou, E., Farsang, A., Koptopoulos, G.** A pathogenic myxoma virus in vaccinated and non-vaccinated commercial rabbits.

- Research in Veterinary Science. 2008. 85:622-624
- Lees A.C., Bell D.J.**, A conservation paradox for the 21st century: the European wild rabbit *Oryctolagus cuniculus*, an invasive alien and an endangered native species. *Mammal Review*. 2008; Volume 38(4):104-320.
- Lorenzo M.M., Galindo I., Blasco R.** Construction and Isolation of Recombinant Vaccinia Virus Using Genetic Markers. *Methods Mol. Biol.*, 2004; 269:15-30
- Baltimore D.** Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*. 1971; 35(3): 235–241.
- Marlier, D., Herbots, J., Detilleux, J., Lemaire, M., Thiry, E., Vindevogel, H.** Cross-sectional study of the association between pathological conditions and myxoma-virus seroprevalence in intensive rabbit farms in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*. 2001. 48:55-64.
- Marlier D.** Vaccination strategies against myxomavirus infections: are we really doing the best? *Tijdschrift Voor Diergeneskunde*. 2010; 135(5):194-198
- Mercer A., Schmidt A., Weber O.** Poxviruses. Birkhäuser; 2007
- Morales M., Ramírez M.A., Cano M.J., Párraga M., Castilla J., Pérez-Ordoyo L.I., Torres J.M., Bárcena J.** Genome Comparison of a Nonpathogenic Myxoma Virus Field Strain with Its Ancestor, the Virulent Lausanne Strain. *J. Virol*. 2009 vol. 83 no. 5 2397-2403
- Muller, A., Silva, E., Abrantes, J., Esteves, P.J., Ferreira, P.G., Carvalheira, J.C., Nowotny, N., Thompson, G.** Partial sequencing of recent Portuguese myxoma virus field isolates exhibits a high degree of genetic stability. *Veterinary Microbiology*. 2010. 140:161-166.
- Roper R.L., Moss B.** Envelope Formation Is Blocked by Mutation of a Sequence Related to the HKD Phospholipid Metabolism Motif in the Vaccinia Virus F13L Protein. *Journal of Virology*, 1999; Vol. 73, No. 2 p. 1108–1117
- Ryder A.B., Buonocore L., Vogel L., Cachbagauer R., Krammer F., Rose J.K.**
A Viable Recombinant Rhabdovirus Lacking Its Glycoprotein Gene and Expressing Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase Is a Potent Influenza Vaccine. *J. Virol*. 2015; vol. 89 (5) 2820-2830
- Service M.W.**, A reappraisal of the role of mosquitoes in the transmission of myxomatosis in Britain. *J.Hyg., Camb.*(1971),69,105.
- Smith G. L., Vanderplasschent A., Law M.** The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *Journal of General Virology*, 2002, 83, 2915–2931.
- Vliegen I., Yang G., Hruby D., Jordan R., Neyts J.** Deletion of the vaccinia virus F13L gene results in a highly attenuated virus that mounts a protective immune response against subsequent vaccinia virus challenge. *Antiviral Research*, 2012; 93(1) 160–166

- de Wit E., Marzi A., Bushmaker T., Brining D., Scott D., Richt J.A., Geisbert T.W., Feldmann H.** Safety of Recombinant VSV–Ebola Virus Vaccine Vector in Pigs. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21(4): 702–704.
- Yuen L., Davison A.J., Moss B.** Early promoter-binding factor from vaccinia virions. *Proc. Nati. Acad. Sci.* 1987; Vol. 84, pp. 6069-6073