

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

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

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

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

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

The alphaherpesvirus bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) is considered the most important etiologic agent of bovine respiratory diseases that cause major economic losses in cattle industries. Although BoHV-1 vaccination reduces both infection and clinical signs of disease, it does not prevent infection of vaccinated animals. Consequently, vaccinated animals may represent latent foci of BoHV-1 wt infection. Most control strategies of BoHV-1 are related to eradication programmes based on the serological identification and elimination of infected animals. To carry out these programmes it is necessary to vaccinate with marker vaccines defective in one or more genes, thereby generating an immune response different from that occurring in BoHV-1 wt infected animals. These vaccines are used in conjunction with serological tests that detect antibodies directed against those glycoprotein/s absent in the marker vaccine in the sera of BoHV-1 wt infected animals.

Our group developed a BoHV-1 live virus marker vaccine defective in the glycoprotein E (gE) (BoHV-1 gE⁻). In parallel with the BoHV-1 gE⁻ construction, we attempted the recombinant expression of the gE of BoHV-1 in *Escherichia coli*. The gE expression was necessary for both the final characterization of the defective virus and the development of a serological test for the differentiation between BoHV-1 gE⁻ vaccinated and BoHV-1 wt infected animals. The results indicated that the recombinant expression of BoHV-1 gE was toxic for *E. coli*.

In the present work we have determined that the amino acid TRAPP sequence of BoHV-1 gE is responsible for the toxicity associated with the expression of the extracellular domain on this glycoprotein in *E. coli*. Partial suppression of the TRAPP sequence is enough requisite to restore both normal culture growth and protein accumulation. We have determined that the TRAPP sequence is also toxic when expressed in native proteins of *E. coli*. The TRAPP toxicity resides in the nature of the sequence and does not respond to either a codon usage different than that of *E. coli* or the activation of the main proteases of the bacteria. Additionally, the toxicity of the TRAPP sequence correlates well with the absence of this sequence in all polypeptides codified in *E. coli*. The determination of the TRAPP sequence has led us to identify many more peptides likewise infrequent in *E. coli* proteins, and consider this fact relevant for the expression of heterologous proteins in *E. coli*.

Furthermore, we have constructed a BoHV-1 strain defective in the RAPP sequence of gE (BoHV-1 RAPP⁻) by using homologous recombination techniques. The results show that the TRAPP sequence is not essential for the function of gE, i.e., the cell-to-cell spread of BoHV-1. On the contrary, the substitution of the RAPP sequence implies a subtle change presumably in the way the virus interacts with components of either the cellular membrane or the extracellular matrix.

Finally, in this experimental work we have also obtained a panel of monoclonal antibodies directed against the gE of BoHV-1 for the development of a differential serological test to be used in conjunction with the BoHV-1 gE⁻ vaccine. The test, a blocking ELISA, detects antibodies against the gE of BoHV-1 in a sensitive and specific way, and represents a promising step towards the development of a definitive test.