

UCH-FC.  
MAG-B  
M971  
C.1



## **"CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA REGIÓN TRONCAL DE LA PROTEÍNA G<sub>c</sub> DEL HANTAVIRUS ANDES"**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas.

**IGNACIO ALEJANDRO MUÑOZ LEÓN**

Directora de Tesis: Dra. Nicole Tischler

Co-Director de Tesis: Dr. Octavio Monasterio

Noviembre 2011

Santiago – Chile



**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

**Ignacio Muñoz León**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el exámen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 26 / 09 / 2011

Dra. Nicole Tischler  
**Directora de Tesis**

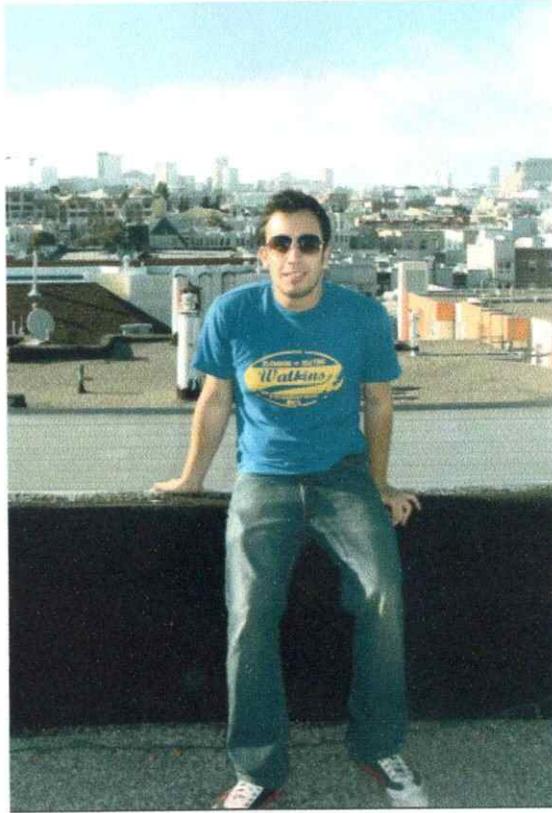
Dr. Octavio Monasterio  
**Co-Director**

**Comisión de Evaluación**

Dr. Christian González-Billaud  
**Presidente Comisión**

Dr. Alejandro Roth  
**Evaluador**





*A mi mamá*

## BIOGRAFÍA

Desde chico me gustaba la ciencia, me cuestionaba porqué ocurrían las cosas a mí alrededor y siempre tuve otro punto de vista, más crítico decía mi mamá. Pensé que quería estudiar Medicina, era lo que único que conocía, hasta que en tercero medio escuché de esta carrera "rara", no muy conocida en ese tiempo: Ingeniería en Biotecnología Molecular. Averigüé y averigüé y me enamoré. Era lo único que quería estudiar, realmente Medicina no era lo mío. Y así entré a la carrera. 8 años atrás ya!

Con una segunda tesis bajo el brazo, no diré que nunca me he cuestionado esta decisión, que nunca me he quejado, puesto que creo que todos hemos pasado por ese proceso. El amor y el odio que le tenemos a la ciencia. Que es desgastante, consume todo tu tiempo, es frustrante, etc, etc. Pero viendo la película completa, no me arrepiento.

Con esta tesis termina mi etapa formativa dentro de la Universidad de Chile, dónde conocí muy buenos amigos, buenos profesores y también, buenas enseñanzas de vida. Me llevo los mejores recuerdos.

Ahora, me encuentro en otra etapa. Pasé de tesista a Jefe de laboratorio. Mi trabajo actual queda en Fundación Ciencia para la Vida, lugar en el que he estado por más de tres años y que le tengo mucho cariño, pasamos a ser no más de 40 personas a cerca de 100. Llegué a realizar mi tesis de pre-grado y continué con la tesis de Magíster. Conocí mucha gente, amigos y tutores.

Fundación me abrió muchas puertas en lo profesional, realicé mis dos tesis y además me permitió realizar una pasantía en el extranjero donde logré trabajar durante seis meses en un laboratorio con otro nivel de equipamiento y recursos. Por azares de la vida hoy trabajo en una empresa Start-Up de biotecnología (EvolveMol), también está ubicada en Fundación. Este trabajo lo describiría como algo dinámico, con mucho potencial y con un excelente ambiente. He tenido la oportunidad de expresar y poner en práctica todo lo aprendido, tanto racional como emocional. Sin lugar a dudas, lo mejor está por venir!

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a todos aquellos que me ayudaron durante el proceso de esta Tesis. En primer lugar al profesor Pablo Valenzuela, quien me dio su apoyo incondicional tanto durante el desarrollo cómo el término de ésta. Sin su respaldo la culminación de ésta hubiese sido completamente diferente.

También a todos mis compañeros de laboratorio, quienes siempre me demostraron su amistad y apoyo siempre cuando lo necesité. En particular a Margarita, Nicolás, Gonzalo, Victoria, Fernando y Rodrigo.

También al profesor Robert Stroud de la Universidad de California San Francisco, donde realicé una pasantía de seis meses. Gracias a él y su confianza logré desenvolverme en un laboratorio con equipamiento y recursos de primer nivel, aprendí múltiples técnicas y además conocí personas que hasta hoy mantengo el contacto. Sin duda fue una experiencia que nunca olvidaré.

Gracias a todos mis amigos que siempre estuvieron conmigo, Tami, Fran, Franche, Ulises, Fer, Nicole y muchos otros, puesto que siempre me dieron la palabra de apoyo necesaria en el momento indicado.

Y finalmente, muchas gracias a mi familia. Sin sus consejos, respaldo incondicional y cariño no hubiese logrado terminar esta etapa de mi vida.

Sin dudas, para mí este proceso fue complicado, pero en los momentos difíciles es cuando uno se da cuenta de quienes son los verdaderos amigos y, sin lugar a dudas, puedo decir que tengo muy buenos amigos, una familia que me quiere y la confianza de un gran mentor.

Gracias de todo corazón,

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>INDICE DE TABLAS</b> _____	V
<b>INDICE DE FIGURAS</b> _____	VI
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> _____	VII
<b>RESUMEN</b> _____	VIII
<b>ABSTRACT</b> _____	X
<b>INTRODUCCIÓN</b> _____	1
I.1. Hantavirus	1
I.1.1.- Características generales .....	1
I.1.2.- Estructura del virión .....	2
I.1.3.- Ciclo replicativo de los hantavirus .....	2
I.1.4.- Tratamiento y prevención .....	4
I.2. Fusión de membranas	4
I.2.1.- Proteínas de fusión virales .....	4
I.2.2.- Proteínas de fusión clase II .....	7
I.2.3.- Mecanismo de fusión de membranas .....	8
I.3. Regiones funcionales dentro de las proteínas de fusión	9
I.3.1.- Péptido de fusión, segmento transmembrana y región preTM/troncal .....	9
I.3.2.- Región troncal de proteínas de fusión clase II .....	12
I.3.3.- Región troncal de la proteína Gc del hantavirus Andes (ANDV-GcSt) .....	14
<b>HIPOTESIS</b> _____	16
<b>OBJETIVO GENERAL</b> _____	16
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> _____	16
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> _____	17
II.1. Interacción de péptidos análogos de ANDV-GcSt con membranas modelos	17
II.1.1.- Síntesis y marcaje de péptidos .....	17
II.1.2.- Preparación de liposomas .....	18
II.1.3.- Coflotación de liposomas y péptidos .....	19
II.1.4.- Detección de liposomas y péptidos .....	20
II.2. Mutagénesis de ANDV-GcSt	21

II.2.1.- Líneas celulares de mamífero .....	21
II.2.2.- Obtención de mutantes sitio dirigidas de la región troncal de ANDV-Gc	21
II.2.2.1.- Obtención de mutantes mediante PCR .....	21
II.2.2.2.- Clonamiento al vector de expresión pl.18 .....	22
II.2.3.- Obtención de mutante que carece de la región troncal de ANDV-Gc .....	23
II.2.4.- Expresión de Gc silvestre y mutantes	24
II.2.4.1.- Transfección de células 293 FT .....	24
II.2.4.2.- Detección de Gc .....	26
II.2.5.- Detección de Gc silvestre y mutante en la superficie celular .....	26
II.2.6.- Ensayo de fusión entre células	27
II.2.6.1.- Transfección de células Vero E6 .....	27
II.2.6.2.- Microscopía de Inmuno Fluorescencia Indirecta ....	28
<b>RESULTADOS</b> _____	30
III.1. Interacción de péptidos análogos de ANDV-GcSt con membranas modelos .....	30
III.2. Mutagénesis de ANDV-GcSt	35
III.2.1.- Diseño y obtención de mutantes de la región troncal de ANDV-Gc .....	35
III.2.2.- Expresión y localización en membrana plasmática de las diferentes mutantes de ANDV-GcSt .....	39
III.2.3.- Actividad fusogénica de las diferentes mutantes de ANDV-GcSt .....	42
<b>DISCUSION</b> _____	46
<b>CONCLUSIONES</b> _____	54
<b>PROYECCIONES</b> _____	55
<b>ANEXO</b> _____	56
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> _____	59

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Partidores utilizados .....	56
<b>Tabla 2.</b> Mezcla de reacción de PCR para la amplificación de los fragmentos río arriba y abajo de ANDV-GcSt .....	57
<b>Tabla 3.</b> Mezcla de reacción de PCR para la obtención de mutantes sitio dirigidas de ANDV-GcSt .....	57
<b>Tabla 4.</b> Protocolo de PCR utilizado para amplificar el fragmento río arriba de la región codificante de ANDV-GcSt de 3212 pb .....	58
<b>Tabla 5.</b> Protocolo de PCR utilizado para amplificar el fragmento río abajo de la región codificante de ANDV-GcSt de 125 pb .....	58
<b>Tabla 6.</b> Protocolo de PCR utilizado para obtener las mutantes sitio dirigidas de la región troncal de ANDV-Gc .....	58

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo replicativo de los hantavirus .....	3
<b>Figura 2.</b> Clases de proteínas de fusión virales .....	6
<b>Figura 3.</b> Modelo para la fusión de membranas mediada por proteínas de fusión clase II .....	9
<b>Figura 4.</b> Secuencia y estructura 2D de ANDV-GcSt .....	15
<b>Figura 5.</b> Coflotación de GcSt con liposomas .....	32
<b>Figura 6.</b> Coflotación de GcSt H1 con liposomas .....	33
<b>Figura 7.</b> Coflotación de GcSt H2 con liposomas .....	34
<b>Figura 8.</b> Obtención del constructo que codifica para la mutante que carece de la región troncal de Gc (GcDSt) .....	36
<b>Figura 9.</b> Obtención de los constructos que codifican para las mutantes sitio dirigidas de la región troncal de Gc .....	38
<b>Figura 10.</b> Síntesis y localización de Gc silvestre y mutantes .....	42
<b>Figura 11.</b> Actividad de fusión entre células mediada por Gc silvestre y mutantes .....	44
<b>Figura 12.</b> Índice de fusión .....	45
<b>Figura Anexo 1.</b> Fluorescencia de DPH en las diferentes fracciones del gradiente de flotación de liposomas de diferente composición .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANDV	Virus Andes
ADN	Ácido Desoxribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARN Pol ARN dep	ARN polimerasa dependiente de ARN
CMFDA	diacetato de 5-clorometilfluoresceína
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DENV	Virus Dengue
D-MEM	Medio Dulbecco de Eagle modificado
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
E-MEM	Medio Esencial Mínimo de Eagle
FHSR	Fiebre hemorrágica con síndrome renal
GcDSt	Proteína mutante de Gc que carece de la región troncal
GPC	<i>Glycoprotein precursor</i> (precursor de glicoproteínas)
HNTV	Virus Hantaan
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (peroxidasa de rábano)
LUV's	Vesículas unilamelares grandes
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
preTM	Segmento pre-transmembrana
PVDF	Polivinilidenofluoruro
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (fosfatasa alcalina de camarón)
SPHV	Síndrome pulmonar por hantavirus
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
TBEV	Virus de la encefalitis originado de garrapata
TM	Transmembrana
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
WW	Hidrofobicidad interfacial Wimley & White

## RESUMEN

Los hantavirus son virus envueltos, con un genoma tripartito de RNA monohebra sentido negativo que infectan humanos. En Chile, desde el año 1995 se ha descrito la presencia de la especie de hantavirus: Andes (ANDV). En su membrana de envoltura se encuentra anclada la glicoproteína Gc, la cual es la encargada de fusionar la membrana viral con la membrana celular, proceso que permite, la entrada de las ribonucleocápsides virales al citoplasma celular. Gc comparte características con proteínas de fusión clase II, las cuales poseen un gran ectodominio amino-terminal y están ancladas a la membrana viral por un segmento transmembrana. La región troncal corresponde a la región que comunica el ectodominio con el segmento transmembrana. Estudios previos identificaron que ésta corresponde a una región de 44 residuos altamente conservada dentro del género *Hantavirus*. La caracterización de la región troncal de ANDV-Gc indicó que posee un alto contenido  $\alpha$  helicoidal y que además interactúa con membranas modelos. Como continuación, en este trabajo se planteó determinar cuáles son los lípidos necesarios para la interacción de la región troncal de la proteína Gc del virus Andes con membranas. También, se analizó mediante mutagénesis, si esta región es esencial dentro del proceso de fusión de membranas. Usando un ensayo de coflotación de péptidos análogos de la región troncal con liposomas, se encontró que sólo fosfatidilcolina es requerida para la interacción de la región

troncal con membranas. Por otra parte, diferentes mutantes de la región troncal de fueron introducidas en la proteína Gc de ANDV, su expresión y transporte a la membrana plasmática corroborada y su actividad fusogénica analizada en un ensayo de fusión célula – célula. La mutante que carece de esta región, así como la mutante L414E, perdieron dicha actividad, indicando que esta región es esencial dentro del proceso de fusión de membranas. No se logró detectar la síntesis de la mutante Gc W441E.

Cómo continuación de esta tesis se plantea el generar un mayor número de sustituciones en la región troncal y determinar en que etapa dentro del proceso de fusión de membranas las mutantes pierden la actividad. Estos estudios permitirán determinar residuos esenciales dentro de esta región y la función de ésta en el proceso de fusión de membranas.

## ABSTRACT

Hantaviruses are enveloped viruses with a tripartite genome consisting of single strand negative polarity RNA that to infect humans. In Chile, the presence of the Andes virus (ANDV) has been described since 1995. In their envelope membrane the Gc glycoprotein is anchored, which promotes the fusion between the viral and the cellular membrane, allowing the entry of the viral ribonucleocapsids into the cellular cytoplasm. Gc share characteristics with class II fusion proteins, which have a large N-terminal ectodomain and is anchored to the viral membrane through a transmembrane segment. The stem region connects the ectodomain with the transmembrane segment. Among the *Hantavirus* genus, previous studies indicate that the stem region has 44 residues length and is highly conserved. It was further found that the stem region of ANDV- Gc has a high  $\alpha$  -helical content and that analogous peptides interact with model membranes. As a continuation, this work aimed to determine which lipids are necessary for the interaction of the stem region of ANDV-Gc with model membranes. And if this region is essential in the Gc membrane fusion process. Using a coflotation assay of analogous peptides of the stem region with liposomes it was found, that only phosphatidilcholine is required for the interaction with membranes. Further, different mutations of the stem region were generated into ANDV-Gc, and the synthesis of the mutants and transport to the plasma membrane tested. Their fusogenic activity analyzed through a cell-cell fusion assay. Whilst it was not possible to detect the synthesis of the W441E mutant, the deletion mutant and the L414E mutant lost their fusogenic

activity. This results indicate that the stem region is essential in the membrane fusion process mediated by Gc.

As a continuation of this thesis it is proposed to generate more residue substitutions within the stem region and to determinate in which step of the membrane fusion process the mutants lose their activity. These studies will allow to identify key residues in this region and to characterize it's function in the membrane fussion process.

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. Hantavirus

#### I.1.1- Características generales

Los hantavirus son patógenos humanos que pertenecen a la familia *Bunyaviridae* y se encuentran distribuidos a nivel global. Virus de este género persisten en roedores de la familia *Muridae*, siendo la vía de contagio hacia humanos la inhalación de aerosoles provenientes de heces y saliva de animales infectados. Dos grupos de hantavirus han sido descritos en base a los severos cuadros clínicos que ocasionan en humanos: los que producen Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (FHSR) y los que causan Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPHV). La distribución espacial de estos dos grupos virales es diferente. En Europa y Asia las infecciones por hantavirus ocasionan FHSR, mientras que en América, las infecciones por hantavirus ocasionan SPHV. En Eurasia las infecciones datan desde los años 50, en medio de la guerra de Corea, con la detección del virus Hantaan (HTNV). En América, recién en 1993 se describió el primer caso de infección humana por un hantavirus (especie *Sin nombre virus*, en EE.UU.) y desde la fecha, se han producido casos a lo largo de todo el continente. En Chile y Argentina se encuentra presente el virus Andes (ANDV), cuyo primer caso de infección se describió en 1995 (López y cols, 1996). Este virus causa una mortalidad cercana al 40% y es transmitido por el roedor *Oligoryzomys longicaudatus* (Levis y col, 1998). A diferencia de infecciones mediadas por otros hantavirus, está descrito que ANDV puede ser transmitido de persona a persona (Padula y cols, 1998).

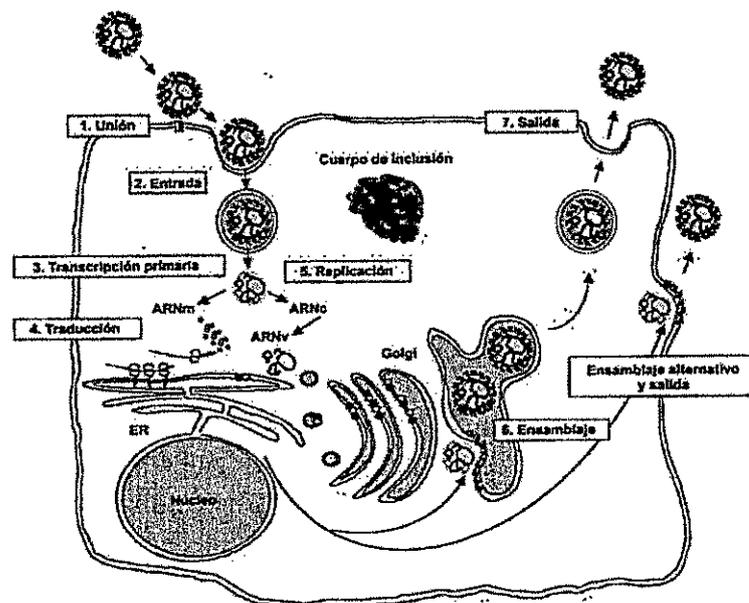
### I.1.2- Estructura del virión

La familia *Bunyaviridae* se caracteriza por su organización genómica de ARN simple hebra tripartito con polaridad negativa, el cual codifica para cuatro proteínas diferentes: el segmento de mayor tamaño (L) codifica para una ARN polimerasa dependiente de ARN (ARNpol ARNdep); el segmento de menor tamaño (S) codifica para una nucleoproteína; mientras que el segmento mediano (M) codifica para una proteína precursora glicosilada: GPC (*glycoprotein precursor*) la cual es cortada en originando dos proteínas: Gn y Gc (de acuerdo a su posición N- o C- terminal en el precursor). Éstas corresponden a proteínas de superficie y se localizan ancladas en la envoltura lipídica del virus. De forma general, las glicoproteínas virales son responsables del reconocimiento del receptor celular y posterior entrada del virus a la célula, mediante la fusión de la membrana viral con la membrana blanco. En el caso de los hantavirus, Gc corresponde a la proteína que media la fusión de membranas (Cifuentes y col, 2010; Tischler y col, 2005).

### I.1.3.- Ciclo replicativo de los hantavirus

La replicación de los hantavirus ocurre en células endoteliales y macrófagos del pulmón y/o riñón (revisado por Muranyi y col, 2005). La entrada a la célula huésped ocurre por reconocimiento de los receptores del tipo integrina  $\alpha_v\beta_3$  de la superficie celular (Gavrilovskaya y col, 1998) y posterior endocitosis mediada por clatrina (Jin y col, 2002). Durante la maduración del endosoma, su pH disminuye y aquí es cuando se

fusionan la membrana viral con la membrana endosomal, liberándose las ribonucleocápsides al citoplasma. En el caso del virus Andes, se requiere que el pH del endosoma sea menor a 5.8, puesto que a este pH Gc se activa, ocasionando de esta forma la fusión de membranas (Cifuentes-Muñoz y col, 2010). La ARNpol ARNdep dirige la transcripción de los genes virales y la replicación de los tres segmentos genómicos. Los ARN mensajeros de la nucleoproteína y de la ARNpol ARNdep son traducidos en el citoplasma, mientras que el ARN mensajero de GPC es translocado al lumen del retículo endoplasmático, donde GPC es cortada originando a Gn y Gc (Löber y col, 2001). Éstas son posteriormente transportadas al aparato de Golgi para su glicosilación final. Los viriones se forman por yemación en las membranas del aparato de Golgi, saliendo de la célula mediante exocitosis; alternativamente, se ensamblan y yeman desde la membrana plasmática (figura 1).



**Figura 1. Ciclo replicativo de los hantavirus.** Tomado de Fields, 1996.

Se muestran las diferentes etapas dentro del ciclo replicativo de los hantavirus, desde la unión al receptor e internalización vía endocitosis hasta salida de partículas infectivas por exocitosis.

#### **I.1.4.- Tratamiento y prevención**

A la fecha no existe ninguna droga antiviral específica contra infecciones por hantavirus. El tratamiento de pacientes con HFSR y HPS está restringido a procedimientos de soporte que ayudan a controlar los síntomas. El uso de agentes anti-virales como ribavirina es ineficiente en pacientes con SPHV (Mertz y col, 2004). Vacunas de ADN que expresan proteínas estructurales virales también han sido desarrolladas, a pesar de inducir un alto título de anticuerpos neutralizantes en animales modelos (Hooper y col, 1999; Hooper y col, 1999; Custer y col, 2003), aún no existe ninguna vacuna comercial contra infecciones por hantavirus.

### **I.2. Fusión de membranas**

#### **I.2.1.- Proteínas de fusión virales**

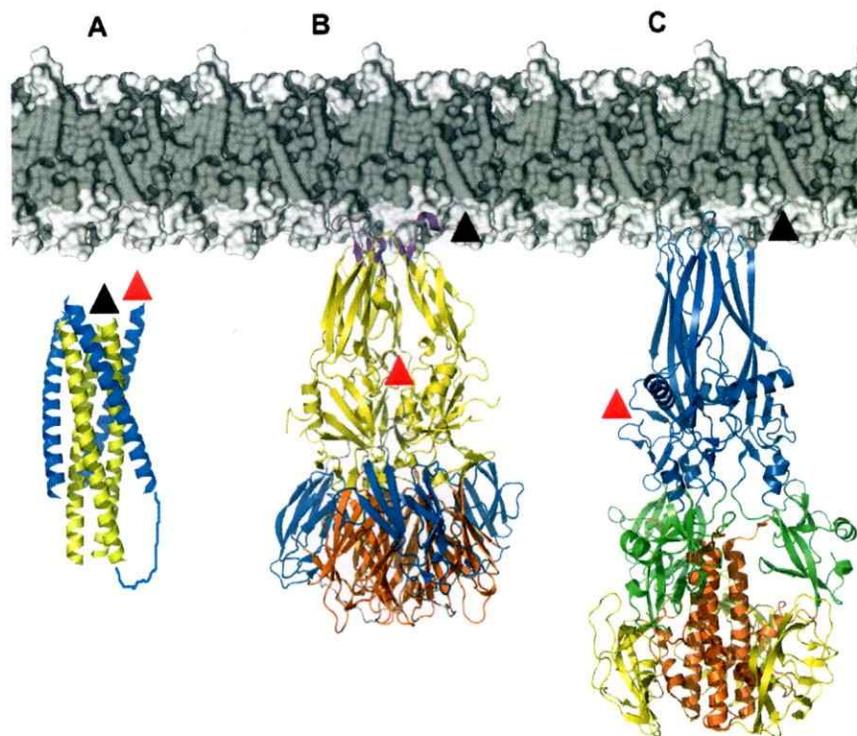
La fusión de la membrana viral con la membrana blanco (membrana endosomal en el caso de los hantavirus) es una etapa esencial dentro de la infección por virus envueltos, siendo mediada por la proteína de fusión viral. Como la bicapa lipídica es una estructura altamente estable, la fusión de membranas es un proceso altamente endergónico. Se cree que la energía requerida para que ocurra la fusión entre membranas proviene del cambio conformacional de la proteína de fusión (Kielian & Rey, 2005). El gatillante de este cambio depende del virus en cuestión, por ejemplo, para los hantavirus uno de los factores de iniciación es el bajo pH que se encuentra dentro del endosoma (Arikawa y col, 1985), mientras que para otros virus, por ejemplo para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el inicio de la fusión es gatillado

por la interacción secuencial con el receptor (CD4) y un co-receptor (CCR5/ CXCR4) (Gallo y col, 2003).

En base a sus características estructurales, tres clases de proteínas de fusión han sido descritas. Dentro de las proteínas de fusión de clase I se encuentran entre otras: gp41 del VIH, hemaglutinina HA2 del virus de la influenza y GP2 del virus Ebola, poseyendo todas un alto contenido de hélices  $\alpha$  (ver figura 2A) (revisado en Harrison, 2010 y Kielian & Rey, 2005). En su conformación pre-fusión, éstas están formando un homotrímero, el cual se encuentra en un estado metaestable en la superficie del virión. Cuando la proteína es activada, sufre un cambio conformacional que termina en un homotrímero altamente estable. El péptido de fusión corresponde a un péptido helicoidal de carácter anfipático localizado en el extremo N-terminal. Éste se inserta en la membrana blanco e inicia el proceso de fusión, el cuál termina con la formación de un poro, conectando los dos compartimentos membranosos (revisado en Gallo y col, 2003; Jardetzky & Lamb, 2004 y en Kielian & Rey, 2006).

Proteínas de fusión de clase II y clase III también catalizan la formación de un poro de fusión mediante un mecanismo esencialmente similar (Zaitseva y col, 2005), pero sus estructuras son diferentes a la de clase I (figura 2). Respecto a la proteína Gc de los hantavirus, existe evidencia que indica que comparte características estructurales con proteínas de fusión de clase II (Tischler y col. 2005). Los miembros clásicos de proteínas de fusión clase II son las proteínas de fusión E del virus Dengue (DENV), del virus de la encefalitis de la garrapata (TBEV), ambos pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, y la proteína E1 del alfavirus *Semliki Forest* (SFV), perteneciente a la familia *Togaviridae*. A pesar de su baja similitud a nivel de secuencia aminoacídica, sus

estructuras secundarias y terciarias son altamente similares (Zhang y col, 2003; Modis y col, 2004; Gibbons y col, 2004). La estructura de las proteínas de fusión clase III consiste tanto en hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$  (figura 2C); formando, al igual que la clase I, homotrimeros antes y después de la fusión. A esta clase pertenecen las proteínas de fusión gB del virus herpes simple y G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) de las familias *Herpesviridae* y *Rhabdoviridae*, respectivamente (revisado en Weissenhorn y col, 2007).



**Figura 2. Clases de proteínas de fusión virales.** Diagrama de cintas para tres ectodominios en su estado trimérico post-fusión. **(A)** Clase I: proteína gp41 del VIH. **(B)** Clase II: proteína E del virus Dengue. **(C)** Clase III: proteína G de VSV. Los péptidos de fusión se indican con un triángulo negro. Sólo existe información cristalográfica de los ectodominios, es por eso que no se muestran ni la región troncal ni el segmento transmembrana. El triángulo rojo muestra donde comienza la región troncal (de Weissenhorn y col, 2007).

### 1.2.2.-Proteínas de fusión clase II

Estructuralmente, las proteínas de fusión de clase II poseen un gran ectodominio amino terminal, el cual está formado por tres dominios globulares compuestos principalmente por hojas  $\beta$  (ver figura 2B). El dominio II contiene el péptido de fusión en su extremo. A diferencia de las proteínas de fusión de clase I, éste corresponde a una horquilla anfipática y no a una hélice anfipática N-terminal. El dominio I contiene el extremo N-terminal y conecta al dominio II con el dominio III. El segmento transmembrana, localizado al C-terminal ancla la proteína a la membrana viral. El ectodominio es conectado mediante el dominio III al segmento transmembrana mediante una región de tamaño variable denominada región troncal o región pre-transmembrana (ver figura 3A) (Kielian, 2006).

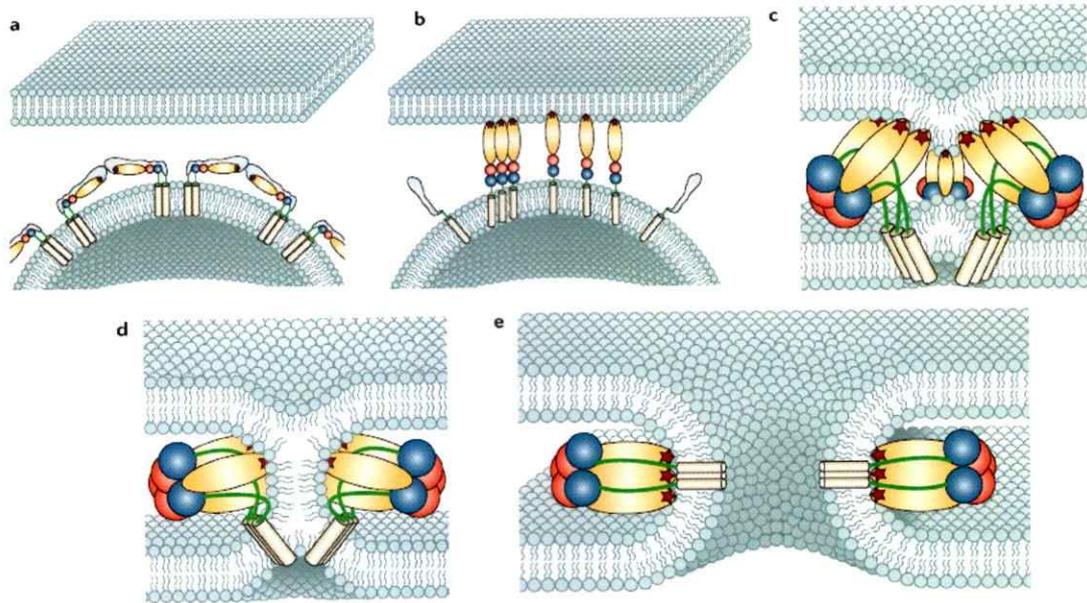
A diferencia de las proteínas de fusión de clase I y clase III, las proteínas de fusión de clase II sufren un cambio oligomérico, pasando de un heterodímero metaestable a un homotrímero estable (en el caso de los Bunyavirus el heterodímero consiste en Gn-Gc (Hepojoki y col, 2009; Huisken y col, 2010). Durante la fusión, las proteínas de fusión clase II se disocian del dímero, se reorientan, pasando de estar paralelas a ubicarse perpendicularmente respecto a la superficie viral (Gibbons y col, 2004). En esta posición pueden insertar el péptido de fusión en la membrana blanco y al encontrarse paralelas entre sí, se permite la trimerización. En este momento, el ectodominio comienza a sufrir una reorganización, en el cual el dominio III con la región troncal llegan a desplazarse hasta 40 Å hacia una cavidad localizada entre los dominios I y II. Al término de esta reorganización, el segmento transmembrana se localiza junto al péptido de fusión, y las membranas se han fusionado formando un poro de fusión (ver figura 3) (Kielian & Rey, 2006).

### I.2.3.- Mecanismo de fusión de membranas

La fusión de dos membranas biológicas implica al menos tres etapas: el contacto inicial entre las dos bicapas, la hemifusión de éstas (estado intermedio en el cual sólo las monocapas exteriores de las bicapas se han fusionado, pero las monocapas internas se mantienen intactas (ver la membrana de la figura 3D), terminando con la formación y expansión de un poro de fusión.

El contacto inicial de las dos bicapas depende de la capa de hidratación y de que la zona de contacto se encuentre libre de proteínas. Este establecimiento no es suficiente para que ocurra la hemifusión de membranas, si no que se requiere energía extra, la cual puede provenir al inducir un estrés elástico en la membrana (Chernomorkik y Kozlov, 2003). Las proteínas de fusión ocasionan un cambio en la curvatura de la membrana al insertar el péptido de fusión, generando estrés elástico en ésta y de esta forma, promoviendo la hemifusión de las membranas viral y blanco (Chernomordik y col, 2006).

Para completar la fusión, el intermedio de hemifusión debe transformarse en un poro que conecta los dos compartimientos membranosos. Modelos matemáticos muestran que, el estrés elástico de curvatura y también de la inclinación de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos proporcionan la energía para que se separen las monocapas externas, generándose así, el poro de fusión (Chernomorkik y Kozlov, 2003).



**Figura 3. Modelo para la fusión de membranas mediada por proteínas de fusión clase II.** (A) En la superficie del virión se encuentran las proteínas de fusión en su estado pre-fusogénico en forma de heterodímero. (B) Al activarse se disocian, se relocalizan perpendicularmente respecto a la membrana insertando el péptido de fusión en la membrana blanco. (C) Al trimerizar comienza el reordenamiento del dominio III y la región troncal. (D) Debido al reordenamiento, las membranas comienzan a fusionarse pasando por el estado intermedio de hemifusión. (E) Formación de un poro de fusión y estado post-fusión de la proteína. El dominio I se representa en amarillo; el dominio II, en rojo; el dominio III, en azul; la región troncal se encuentra trazada verde; el segmento transmembrana es indicado en blanco y el péptido de fusión es representado por una estrella roja (Tomado de Kielian & Rey, 2006).

### I.3. Regiones funcionales dentro de las proteínas de fusión

#### I.3.1.- Péptido de fusión, segmento transmembrana y región pre-TM/troncal

El mecanismo mediante el cual las proteínas de fusión permiten la formación de un poro de fusión es un proceso que involucra diferentes regiones dentro de la misma proteína. Así, se ha demostrado, para las proteínas de fusión de retrovirus y coronavirus (ambas de clase I), que existen diferentes regiones dentro de ésta que

interactúan con membranas, indicando que podrían tener un rol en el proceso de fusión viral (Guillén y col, 2005; Moreno y col, 2006). Regiones que generen estrés elástico en la membrana, tanto viral como blanco, favorecerán la fusión de membranas, por lo que tanto el péptido de fusión como la región transmembrana son fundamentales para este proceso (Peisajovich y Shai, 2003). El péptido de fusión, en general, no acepta mutaciones (revisado por Epan, 2003), y el segmento transmembrana no puede ser reemplazado por una región de anclaje periférico a membrana (anclaje de glicofosfatidilinositol), sino que debe estar presente la secuencia aminoacídica hidrófoba que atraviesa la membrana (Odell y col, 1997), además se requiere que este segmento posea un largo mínimo (Armstrong y col, 2000).

Por otra parte, al analizar las regiones pre-transmembranas (preTM)<sup>1</sup> de diferentes familias virales con proteínas de fusión clase I (*Retroviridae*, *Coronaviridae*, *Filoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae*) se ha visto que poseen un alto contenido de aminoácidos aromáticos, en especial, de triptófanos (Suárez y col, 2000). Además muestran una alta tendencia a localizar en interfase membrana/agua y un alto contenido helicoidal (revisado en Lorizate y col, 2008).

Múltiples estudios se han centrado en el segmento preTM de la proteína gp41 del VIH. Usando péptidos sintéticos análogos, mediante Resonancia Magnética Nuclear (NMR), Schilbi y cols (2003) encontraron que esta región forma una hélice  $\alpha$  en micelas de dodecilsulfocolina, donde los residuos aromáticos se localizan en una de las caras de las hélices. Dada las mediciones de los Efectos Nucleares de Overhauser, postulan

---

<sup>1</sup> El término pre-transmembrana es aplicado a proteínas de fusión de clase I y troncal, a las de clase II y III. Ambas hacen referencia a la región que comunica el ectodominio con el segmento transmembrana

que la hélice completa localiza en la interfase de membrana/agua (Schilibi y col, 2001). Otros estudios han demostrado la capacidad de este péptido análogo de fusionar y permeabilizar membranas modelos (Suarez y cols, 2000; Saez-Cirion y cols, 2003). Ensayos similares realizados con segmentos preTM de otras proteínas virales, han encontrado resultados similares a los de gp41, segmentos pre-transmembrana de GP2 de Ebola virus (Saez-Cirion, 2001), gH del virus Herpes simplex (Galdiero y col, 2007) también interactúan con membranas, induciendo la fusión de liposomas y formación de poros en éstos. De ésta forma, el segmento preTM jugaría un rol en la fusión de membranas, al desestabilizarlas.

Mutaciones del segmento preTM de la proteína gp41 también se han realizado. Salzwedel y col (1999) aportaron evidencia de que este segmento está involucrado en la fusión de membranas, ya que proteínas recombinantes que carecen de esta región pierden la actividad fusogénica de la proteína sin afectar su maduración ni transporte. El mismo fenotipo se observó al sustituir los cinco triptófanos conservados por alaninas (W1-5A). Por el contrario, al mutar un triptófano central por prolina (W672P) no hubo efecto en la actividad fusogénica (Salzwedel y col, 1999). En resumen, se requiere que la región preTM de gp41 posea un largo mínimo y que los triptófanos juegan un rol esencial, posiblemente debido a su alta tendencia a localizar en la interfase membrana/agua, pero la estructura helicoidal, aparentemente, no es necesaria. Por otra parte, también se observó que esta región se requiere para la incorporación de la proteína en los viriones, por lo que podría participar también en la fisión de membranas (Salzwedel y col, 1999).

Otros estudios mutacionales se han realizado para gp36 del virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) (clase I) y la proteína G de VSV (clase III). Diferentes partículas virales recombinantes de gp36 con múltiples mutaciones a los triptófanos conservados de preTM fueron producidas. Todas estas partículas fueron no replicativas debido a la pérdida de la actividad fusogénica (Giannecchini y col, 2004). En el caso de proteína VSV-G, mutantes que carecen de ésta región también pierden la actividad fusogénica, sin embargo, la mutación de residuos aromáticos conservados no mostró ningún efecto (Jeetendra y cols, 2003). Además, al co-expresar la región troncal más el segmento transmembrana junto con la glicoproteína completa, la actividad fusogénica de esta última era potenciada en hasta 40 veces (Robinson & Whitt, 2000; Jeetendra y col, 2002). Estos datos indican que, la región troncal de VSV-G contribuye a la fusión de membranas y funcionaría como una unidad fusogénica independiente, sin embargo, los residuos aromáticos conservados no son esenciales para la fusión de membranas.

En resumen, estudio sobre la región preTM de diferentes virus con proteínas de fusión de clase I y III indican que ésta juega un rol en el proceso de fusión de membranas, mientras que los residuos aromáticos pueden o no ser esenciales dependiendo de la proteína en cuestión.

### 1.3.2.- Región troncal de proteínas de fusión clase II

Para proteínas de fusión clase II existen aún pocos estudios sobre la región troncal, los cuáles se han centrado en flavivirus y alfavirus. Dentro de la familia de los flavivirus, la

región troncal de la proteína E del virus Dengue, mediante reconstrucción de una crío microscopía electrónica de una partícula viral, se encontró que está formada probablemente por dos hélices  $\alpha$  localizadas en la cara externa de la membrana viral (Zhang y col, 2003). Mediante análisis mutacionales de la proteína E de TBEV, se ha visto que la región troncal juega un rol fundamental en la formación del homotrímero durante la fusión de membranas (Allison y col, 1999). Un estudio reciente ha demostrado que la región troncal de la proteína E del virus de la hepatitis C posee una hélice anfipática y que mutaciones puntuales dentro de esta región no afectan la actividad fusogénica de la proteína, si no que existiría una cooperatividad dentro de los residuos en la fusión de membranas (Albecka y cols, 2011).

El único estudio hasta la fecha que utilizó péptidos análogos para estudiar el efecto de esta región sobre membranas modelos, está centrado en la proteína E1 del virus de la hepatitis C, encontrando que también forma una hélice anfipática, la cual interactúa con membranas, desestabilizándolas (Pérez-Berná, 2008).

Por otra parte, estudios con la proteína E1 de SFV, encontró que la secuencia de la región troncal no es importante para la actividad fusogénica, puesto que todas las mutantes sitio dirigidas realizadas mantuvieron la actividad, requiriendo sólo un largo mínimo, independiente de su secuencia (Liao & Kielian, 2006). Hasta la fecha, no se han realizado estudios con péptidos análogos de la región troncal de alfavirus.

Como conclusión, no existe un consenso general sobre el rol de la región troncal en proteínas de fusión de clase II. Además, dentro de las proteínas de fusión de clase II esta región muestra gran variación. Por ejemplo, la de los flavivirus es mucho más

estructurada que la de los alphavirus y también de un largo mayor (50 residuos versus 30 residuos aproximadamente). Mayores estudios para determinar la función en el proceso de fusión de membranas de la región troncal son necesarios.

### I.3.3.- Región troncal de la proteína Gc del hantavirus Andes (ANDV-GcSt)

En estudios previos, la región troncal de ANDV-Gc fue caracterizada (Seminario de Título, Ignacio Muñoz-León, 2009). Tomando un modelo homólogo para Gc (Tischler y col, 2005), se identificó ésta como la región que comunica el dominio III con el segmento transmembrana. Basado en este análisis se encontró que corresponde a una región de 44 residuos, que además se encuentra altamente conservada a lo largo del género *Hantavirus* (figura 4A). Modelamiento molecular y dicroísmo circular de péptidos sintéticos demostró que esta región está probablemente conformada por dos helices  $\alpha$  conectadas: H1 y H2, prediciéndose H2 como una hélice anfipática (figura 4B). Además, se encontró que tanto H1 como H2 interactúan con membranas artificiales en ensayos de coflotación de péptidos con liposomas.

Con los antecedentes previamente mencionados, en este trabajo se busca: 1) determinar cuál composición lipídica permite la interacción de ANDV-GcSt con membranas modelos y 2) determinar si esta región es esencial para la actividad fusogénica de Gc.



## **HIPÓTESIS**

“La región troncal de la proteína de fusión Gc del virus Andes es esencial para el proceso de fusión de membranas virus-célula. Además, la interacción con membranas de esta región depende de la naturaleza de los lípidos”

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la region troncal de Gc de ANDV es esencial para el proceso de fusión de membranas y que lípidos se requieren para la interacción de esta región con membranas modelos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Analizar si péptidos análogos a la región troncal se unen a membranas modelos de diferente composición
2. Generar diferentes mutaciones en la región troncal de ANDV-Gc y comparar la actividad fusogénica de las proteínas Gc mutantes con la proteína Gc silvestre.

## II. MATERIALES Y METODOS

### II.1.- Interacción de péptidos análogos de ANDV-GcSt con membranas modelos

#### II.1.1.- Síntesis y marcaje de péptidos

Tres péptidos fueron sintetizados (New England Peptides, pureza >85%): GcSt H1 (413- HLERVTGFNQIDSDKVY-429) correspondiente a la región denominada hélice uno de ANDV-Gc. GcSt H2 (437-TFKCWFTKSGEWLLGILNGN- 456) correspondiente a la región denominada hélice dos de ANDV-Gc y GcSt (413- HLERVTGFNQIDSDKVYDDGAPPCTFKCWFTKSGEWLLGILNGN-456) correspondiente a región troncal completa de ANDV Gc. Para detectar los péptidos, estos se marcaron con biotina (Sulfo-NHS-Biotin, Pierce). Se utilizó una relación molar péptido/biotina de 25 veces. La reacción de marcaje transcurrió durante dos horas en hielo en amortiguador fosfato 10 mM pH 7,0 para GcSt H1 y GcSt y en fosfato disodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 10 mM pH 8,8 para GcSt H2 por razones de solubilidad del péptido. El exceso de biotina libre se eliminó mediante diálisis contra el mismo amortiguador usado en el marcaje, para lo cual se utilizó una membrana de diálisis con corte de 1.000 Da (Spectra/Por 6 Membrane). Para GcSt H2 se dializó contra amortiguador borato 10 mM pH 9,0.

## II.1.2.-Preparación de liposomas

Se prepararon vesículas grandes unilaminares (LUV's) mediante el método de extrusión (Hope y col, 1985). Liposomas con diferentes composiciones lipídicas fueron preparados. La mezcla completa de lípidos (la misma que fue utilizada previamente) consistió en: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélinea y colesterol (Avanti Lipids) en una razón de 2:2:2:3 moles. Además, fueron preparados liposomas sólo con fosfatidilcolina, con fosfatidilcolina y colesterol (razón 2:1 moles) y con fosfatidilcolina, esfingomiélinea y colesterol (razón 4:2:3 moles). Debido a la oxidación rápida que sufren los lípidos, todo el proceso se hizo bajo un ambiente de nitrógeno. Para marcar los liposomas se utilizó el fluoróforo 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) (Molecular Probes, Invitrogen) en una relación de 1: 300 = sonda: lípidos. DPH se solubilizó en cloroformo y se agregó la cantidad necesaria a la mezcla de lípidos. DPH localiza en la zona correspondiente a las cadenas hidrocarbonadas y sólo fluoresce cuando se encuentra en un ambiente apolar. Dado que los lípidos se mezclaron en una solución de cloroformo, ésta se evaporó bajo un ambiente de nitrógeno. Para asegurarse de que la evaporación fuera completa, se dejó la mezcla al vacío durante 15 minutos. Posteriormente se hidrataron los lípidos con tampón HNE (5 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,1 M EDTA, pH 7,4) y se dejaron reposar durante 30 min. Para formar vesículas multilaminares se agitaron durante un minuto. Luego se congelaron/descongelaron cinco veces. Finalmente, para formar las vesículas unilaminares de tamaño homogéneo, se pasaron a través de una membrana de nitrocelulosa de 100 nm utilizando un extrusor (Avanti Lipids). Este proceso se realizó a 55° C, temperatura

superior a la temperatura de cambio de fase de la mezcla de lípidos (Mountcastle y col, 1979).

### **II.1.3.- Coflotación de péptidos con liposomas**

Para determinar que lípidos son requeridos para que ocurra la interacción entre péptidos de la región troncal y membranas modelos, se realizaron experimentos de coflotación de los péptidos sintéticos antes descritos con liposomas de diferente composición. Para esto, se incubó 1 mM de liposomas con 0,1 mM de péptido durante 30 min a 37° C en 360 mL. La muestra se mezcló posteriormente con sacarosa de forma que tuviese una concentración final de 40 % p/v en un volumen final de 600 µl. Sobre ésta, se montó una capa de sacarosa al 25% (3200 µl) y sobre ésta, una tercera capa de sacarosa al 5% (600 µl). Se centrifugó a 237.020 g (Rotor SW 55 Ti swinging bucket, Beckman) durante 3 h a 4° C. Después de la ultracentrifugación, los componentes se localizan en una fase correspondiente a su densidad. Se espera que los liposomas al ser livianos floten hacia la parte superior del gradiente, mientras que los péptidos se localicen en la parte inferior. Si los péptidos interactúan con liposomas se espera que estos cofloten a fracciones superiores de menor densidad. Una vez finalizada la centrifugación se tomaron múltiples fracciones del gradiente desde la parte superior (menor densidad) hasta la parte inferior (mayor densidad) las cuales fueron posteriormente analizadas.

## II.1.4.- Detección de liposomas y péptidos

### II.1.4.1.- Fluorescencia de 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH)

Para determinar donde localizan los liposomas dentro del gradiente se midió la fluorescencia de DPH para cada una de las fracciones colectadas. Se usó un fluorímetro Perkin-Elmer LS50. Los parámetros de medición utilizados fueron: longitud de onda de excitación = 350 nm, abertura de excitación = 5 nm, abertura de emisión 5 nm, tiempo de integración = 2 s. Se registró la intensidad de fluorescencia a 427 nm, que corresponde al máximo de emisión de DPH.

### II.1.4.2.- *Slot blot*

Los diferentes péptidos fueron detectados mediante *Slot blot*. Las diferentes fracciones del gradiente fueron cargadas en una membrana de nitrocelulosa de 0,2  $\mu\text{m}$  (BioRad) usando un sistema de *Slot blot* (*Hybri-Slot Manifold*, Bethesda Research Laboratories) aplicando vacío. Las membranas fueron posteriormente bloqueadas con leche al 5 % en tampón PBS y luego incubadas con NeutrAvidina acoplada a peroxidasa de rábano (Pierce) (1:1000 en leche al 5 % en tampón PBS) durante dos horas a temperatura ambiente con agitación. La NeutrAvidina se une específicamente a la biotina y de ésta manera se pueden detectar los péptidos biotinilados. Se reveló mediante quimioluminiscencia usando el sustrato *SuperSignal West Pico* (Pierce) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

## **II.2. Mutagénesis de ANDV-GcSt**

### **II.2.1.- Líneas celulares de mamífero**

Células Vero E6 y 293 FT fueron utilizadas en este trabajo. La línea celular Vero E6 (ATCC, CRL 1586) es derivada del epitelio renal del mono verde de África y fue utilizada en el ensayo de fusión célula – célula con un pasaje no mayor a 12. Estas células fueron mantenidas en Medio Esencial Mínimo de Eagle (E-MEM, Gibco) suplementado con un 10% v/v de suero fetal bovino (Gibco), 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco) y 1 % v/v de penicilina-estreptomicina. Por otra parte, células 293 FT (Invitrogen) fueron utilizadas para analizar la expresión y distribución celular de las diferentes proteínas mutantes. Esta línea es derivada del epitelio fetal humano y fue mantenida en Medio Dulbecco de Eagle modificado (D-MEM, Gibco) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (Gibco) y 1 % v/v de penicilina-estreptomicina.

### **III.2.2.- Obtención de mutantes sitio dirigidas de la región troncal de ANDV-Gc**

#### **II.2.2.1.- Obtención de mutantes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La región codificante para la poliproteína GPC del virus Andes se encuentra clonada dentro del vector pGEM-T (Invitrogen) con los sitios de restricción BgIII y XhoI en sus

extremos 5' y 3', respectivamente. Las diferentes mutantes sitio dirigidas fueron obtenidas mediante PCR circular. Brevemente, se usaron partidores sobrelapantes que en el centro de su secuencia contienen los nucleótidos a mutar (ver tabla 1). El PCR ocurre de tal manera que se amplifica por completo el vector. Para esta reacción se utilizó la polimerasa altamente procesiva y fidedigna *AccuPrime Pfx* (Invitrogen) (ver tablas 3 y 6). Posteriormente, el amplicón fue incubado con 2.5 U *DpnI* (Invitrogen) a 37°C por 30 min para degradar el ADN metilado, es decir, el ADN templado no mutado. Luego, este producto fue utilizado para transformar células *E. coli* NovaBlue (Novagene) mediante el método de golpe de calor (Sambrook y col, 1989). Se extrajo ADN plasmidial de diferentes clones utilizando el kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) de acuerdo a las indicaciones del productor y la mutación deseada fue confirmada mediante análisis de secuencia (Macrogen).

#### II.2.2.2.- Clonamiento al vector de expresión pl.18

Una vez confirmada la sustitución sin encontrarse con otras mutaciones no deseadas, las diferentes mutantes de GPC fueron clonadas desde pGEM-T al vector de expresión para mamíferos pl.18 (el cual posee el inserto bajo la dirección del promotor constitutivo del citomegalovirus, donado por el Dr. Jim Robertson del National Institute for Biological Standards and Control Hertfordshire, UK) utilizando las enzimas de restricción *BglII* y *XhoI*. Brevemente, 6 µg de ADN plasmidial de pGEM-T con las diferentes mutantes de GPC fue tratado con 30 U de *BglII* y 30 U de *XhoI* (Invitrogen)

por 3 h a 37°C. Se realizó lo mismo con 6 µg de ADN plasmidial de pl.18, pero en este caso, para su desfosforilación además se incubó con 2.5 U de SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, Promega) de acuerdo a las indicaciones del productor. La enzima fue inactivada a 65° C durante 20 min. El fragmento liberado de GPC fue purificado mediante extracción desde gel de agarosa al 1 % usando el kit *QIAquick gel extraction* (Qiagen), mientras que el vector fue purificado usando una columna de purificación de producto de PCR con el kit *QIAquick PCR purification* (Qiagen), ambos de acuerdo a las indicaciones del productor. Finalmente, se ligaron 50 ng de inserto con 10 ng de vector pl.18 con 3 U de T4 DNA ligasa (Promega) durante 16 h a 4° C y este producto fue usado para transformar células de *E. coli* NovaBlue. Los ADN plasmidiales de las diferentes transformantes fueron analizados mediante digestión con BglII y XhoI. Se seleccionó un clon por mutante para realizar todos los futuros ensayos.

### **II.2.3.- Obtención de mutante que carece de la región troncal de ANDV-Gc**

Se produjo una proteína recombinante de ANDV-Gc que carece de la región troncal desde el residuo H413 al residuo N456. Para ello se amplificó tanto la región río arriba a la región codificante para ANDV-GcSt (3212 pb) como la región río abajo (125 pb), las cuales fueron posteriormente ligadas. Así, se amplificó mediante PCR el fragmento río arriba desde el extremo 5' de GPC (N-ter de Gn) hasta el último nucleótido correspondiente a P412 de Gc (ver tablas 1, 2 y 4). Este amplicón fue ligado en pGEM-T (pGEM-T/3212) de acuerdo a las indicaciones del productor. Las transformantes fueron analizadas mediante digestión con BglII y NotI y la secuencia confirmada mediante el método de Sanger. Posteriormente, este fragmento fue clonado dentro del

vector pl.18 (pl.18/3212) utilizando las enzimas BglII y NotI de acuerdo a lo descrito anteriormente. Los ADN plasmidiales de los transformantes fueron analizados mediante digestión doble con BglII y NotI.

La región río abajo a la codificante para ANDV-GcSt fue amplificada desde el primer nucleótido que codifica para W457 de Gc hasta el extremo terminal 3' (C-ter de Gc) (ver tablas 1, 2 y 5). Este producto de PCR fue insertado direccionalmente dentro de pl.18/3212 usando los sitios de restricción NotI y XhoI. Así, 6 mg aproximadamente de producto de PCR fueron digeridos con estas enzimas y posteriormente purificado mediante extracción por gel de agarosa al 2 %. El fragmento de 125 pb fue ligado dentro de pl.18/3212. 50 ng de inserto fueron ligados con 10 ng de pl.18/3212 (previamente tratado con NotI y XhoI y defosforilado con SAP de acuerdo a lo descrito anteriormente). Para analizar los diferentes transformantes, se tomó ADN plasmidial de distintos clones y se realizó un PCR con los partidores GcSt $\Delta$ H2-F y GPC $\Delta$ St 3'-R. Los partidores logran amplificar sólo si el fragmento de 125 pb fue insertado dentro de pl.18/3212, esperando un producto de alrededor de 150 pb. El constructo obtenido de esta forma carece de la región codificante para ANDV-GcSt (Gc $\Delta$ St). Al traducirse éste, se habrán reemplazado los 44 residuos de la región troncal por sólo 3 residuos de alanina (traducción del sitio NotI en marco de lectura, ver tabla 2 de partidores).

## **II.2.4.- Expresión de Gc silvestre y mutantes**

### **II.2.4.1.- Transfección de células 293 FT**

Inicialmente, se realizó un ensayo de transfección con células 293 FT para determinar si las diferentes mutantes se expresan en células de mamífero. Para esto,  $6,4 \times 10^5$  células 293 FT crecidas en una placa de 6 pocillos (Corning) fueron transfectadas con 1,35  $\mu\text{g}$  de ADN silvestre y mutante de acuerdo a lo antes establecido (Cifuentes-Muñoz y col, 2011). La transfección fue realizada utilizando el método de fosfato de calcio (Graham & van der Eb, 1973). Brevemente, se realiza una mezcla en 120 mL de  $\text{CaCl}_2$  (0.25 M) con 120 mL de tampón salino de HEPES (HeBS: 20 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, dextrosa 5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.7 mM, pH 7.5) más la cantidad correspondiente de ADN a transfectar. Esta mezcla se deja reposar durante 20 min a temperatura ambiente para luego ser agregada a la placa a transfectar. 16 h después de realizada la transfección el medio se cambia por D-MEM fresco. 48 h después, las células fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS) 1 X (137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 4.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) y posteriormente lisadas con tampón de lisis para células 293 FT: 10 mM HEPES pH 7.5, 3mM  $\text{MgCl}_2$ , 40 mM KCl, 5 % Glicerol y 0.5 % NP40 (Pierce). De ésta forma, las células cosechadas fueron incubadas con 100 mL de este tampón durante 15 min a 4° C, para luego ser centrifugadas a 10.000 g por 10 min, recolectándose el lisado, el cual fue posteriormente analizado mediante *Western blot*.

#### II.2.4.2.- Detección de Gc

Los diferentes lisados obtenidos de células transfectadas fueron cargados y resueltos en un gel denaturante de poliacrilamida Tris-Glicina al 12.5 % y transferidos subsecuentemente a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 mm de tamaño de poro bajo condiciones denaturantes. Gc fue detectada usando el anticuerpo monoclonal 5D11/G7 (Cifuentes-Muñoz y col, 2010) a una dilución de 1: 1.000 en una solución de leche al 1 %. El anticuerpo primario fue detectado usando un anticuerpo monoclonal anti-ratón IgG conjugado a peróxidasa de rábano (HRP, Sigma) a una dilución de 1 : 5.000. La detección de la reacción de la peroxidasa fue realizada usando el substrato quimiolumincente *Super Signal West Pico*. Para comparar la cantidad de proteínas totales cargadas, la proteína  $\beta$ -actina fue detectada como control (anticuerpo monoclonal anti b-actina, a una dilución de 1: 5.000, Sigma).

#### II.2.5.- Detección de Gc silvestre y mutante en la superficie celular

Para detectar si las diferentes proteínas mutantes de Gc llegan a la superficie celular se realizó un ensayo de biotinización de proteínas de membrana plasmática. Para ello, se transfectaron  $3 \times 10^6$  células 293 FT crecidas en una placa de 100 mm (Corning) con 8 mg de ADN correspondiente de acuerdo a lo antes establecido (Cifuentes-Muñoz y col, 2011). La biotinización de proteínas de la superficie celular fue realizada 48 h después de transfectar utilizando el kit *Cell Surface Protein Isolation* (Pierce) de acuerdo a las indicaciones del productor. Con

este ensayo, las proteínas con un residuo de lisina asequible y una exposición extracelular suficiente son marcadas con biotina. Esta técnica usa un agente impermeable a la célula que contiene una molécula de biotina (Sulfo-NHS-SS-Biotina), la cual se une covalentemente a las aminas primarias de proteínas de la superficie celular. Posteriormente, las proteínas que fueron biotiniladas son purificadas usando una resina que contiene estreptavidina. Producto de este ensayo se obtienen dos fracciones: la biotinilada y la no biotinilada. La primera debiese contener solamente proteínas de membrana plasmática, mientras que la segunda, proteínas intracelulares. Es importante que las células se encuentren adherentes, en buenas condiciones y que no haya muerte celular, puesto que si existen proteínas intracelulares en el medio extracelular (producto de lisis) éstas también serán marcadas, produciéndose un resultado falso positivo. Por ello, se incluyó como control interno del ensayo, la detección de b-actina. Como ésta es una proteína intracelular, sólo debe estar presente en la fracción de proteínas no biotiniladas y no en la fracción de proteínas biotiniladas. La presencia de Gc fue detectada en ambas fracciones mediante *Western blot* como previamente descrito.

## **II.2.6.- Ensayo de fusión entre células**

### **II.2.6.1.- Transfección de células Vero E6**

Para cuantificar la actividad fusogénica de las diferentes mutantes se realizó un ensayo de fusión entre células de acuerdo a lo antes establecido (Cifuentes-Muñoz y col, 2011).  $2,6 \times 10^4$  células Vero E6 sembradas el día anterior un portaobjeto con 16 pocillos (LabTek) fueron transfectadas con 0,5 mg de ADN correspondiente usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acuerdo a lo indicado por el productor. 48 h después de transfectar las células, éstas fueron lavadas con PBS 1 X e incubadas con E-MEM a pH 5.5 (37° C). A este pH la glicoproteína de fusión Gc se activa (Arikawa y col, 1985). Luego de 5 min, el medio fue removido, las células fueron vueltas a incubar con E-MEM pH 7.2. Para marcar los citoplasmas celulares, tres horas después de la bajada de pH, las células fueron incubadas con el fluoróforo diacetato de 5-clorometilfluoresceína (CMFDA, Invitrogen) a 1 mM en E-MEM (pH 7.2) durante 1 h a 37° C. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS 1 X y fijadas con paraformaldehído al 4% por 20 min a temperatura ambiente.

#### II.2.6.2.- Microscopía de Inmunofluorescencia indirecta

Células previamente fijadas fueron permeabilizadas con 0.1 % de Tritón X-100 en PBS 1 X durante 15 min. Para detectar Gc, las células fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-Gc 2H4/F6 en una dilución de 1:500 por 1:30 h. Se lavó tres veces con PBS 1 X y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa Fluor® 555 (Invitrogen) en una dilución de 1: 500 durante 1 h. Para eliminar el exceso de anticuerpo, se realizaron tres lavados con PBS 1 X.

Ambas incubaciones fueron realizadas en caseína-sacarosa al 2 % y a temperatura ambiente. Los núcleos fueron teñidos incubando con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen) a 1 ng/ml en PBS durante 5 min. Las muestras fueron montadas en 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO, Sigma) 20% y posteriormente observadas bajo un microscopio de fluorescencia (BX51, Olympus) acoplado a una cámara ProgResC3. Diferentes fotografías fueron tomadas para su cuantificación posterior. El índice de fusión de las diferentes mutantes fue calculado de acuerdo a la fórmula:  $1 - \frac{\text{[número de células]}}{\text{[número de núcleos]}}$  a partir de 3 campos contados con un promedio de 200 núcleos por campo. El ensayo fue realizado en duplicado.

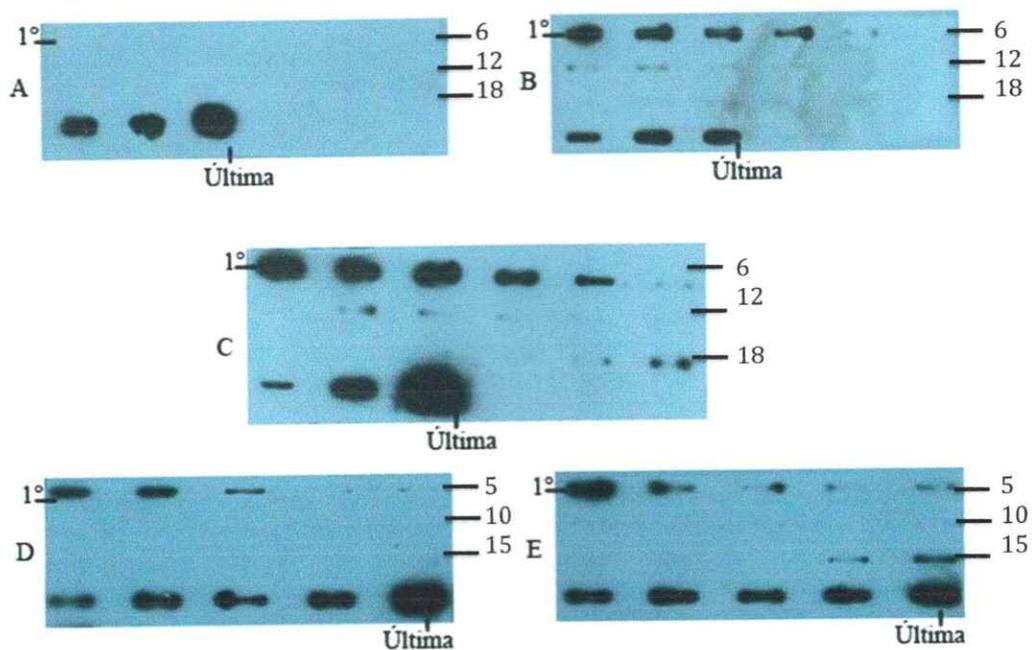
### III. RESULTADOS

#### III.1. Interacción de péptidos análogos de ANDV-GcSt con membranas modelos

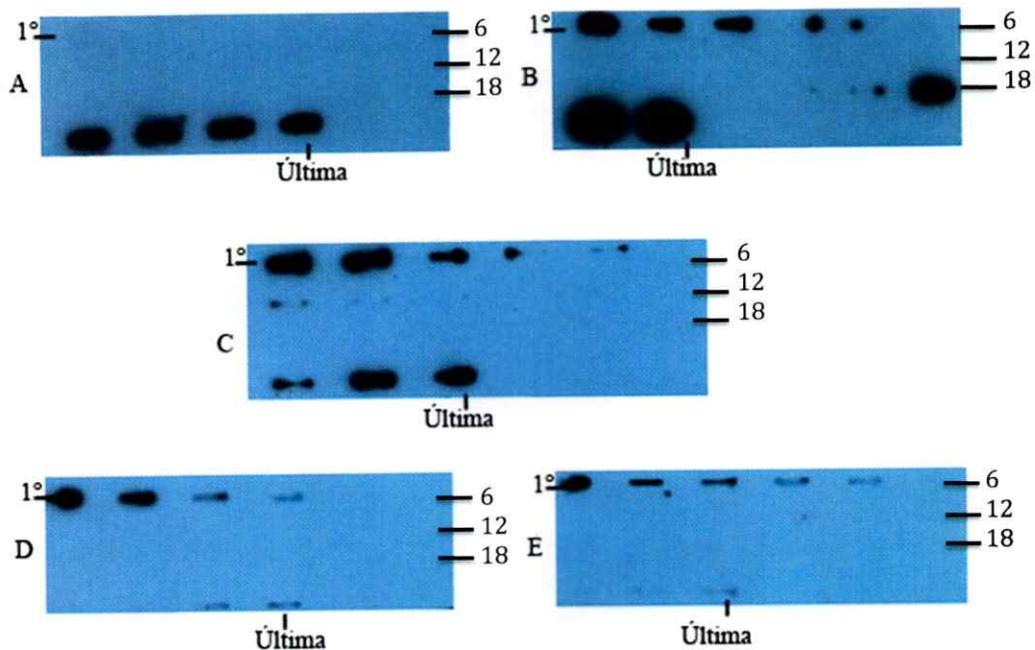
Previamente (Seminario de Título, Ignacio Muñoz-León, 2009) se analizó si péptidos de la región troncal de ANDV-GcSt interactúan con membranas modelos compuestas por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélin y colesterol mediante un ensayo de coflotación de péptidos con liposomas. En este trabajo, utilizando la misma estrategia, se buscó determinar cual de estos lípidos es requerido para que ocurra dicha interacción, en especial, si colesterol y esfingomiélin son necesarios.

Para este fin, se repitieron los ensayos de coflotación de péptidos, ahora con liposomas de diferente composición lipídica. Las diferentes fracciones obtenidas de los ensayos de coflotación fueron analizadas para detectar la presencia de liposomas (mediante fluorescencia de DPH) y de los péptidos (mediante la detección de biotina). Al igual a lo encontrado en los ensayos previamente realizados con liposomas compuestos por los cuatro lípidos diferentes (Seminario de Título, Ignacio Muñoz-León, 2009), los liposomas de diferente composición, la fluorescencia de DPH se encontró mayoritariamente en las fracciones superiores, indicando que efectivamente los liposomas flotaron a fracciones de menor densidad (ver figura anexo 1). Los tres péptidos correspondientes a la región troncal de ANDV-GcSt: GcSt H1, GcSt H2 y GcSt, en ausencia de liposomas, localizaron en las fracciones inferiores de mayor densidad (ver figuras 5A, 6A y 7A). Cuando se incubaron con liposomas que poseen los cuatro lípidos antes mencionados, los péptidos interactuaron con éstos, coflotando

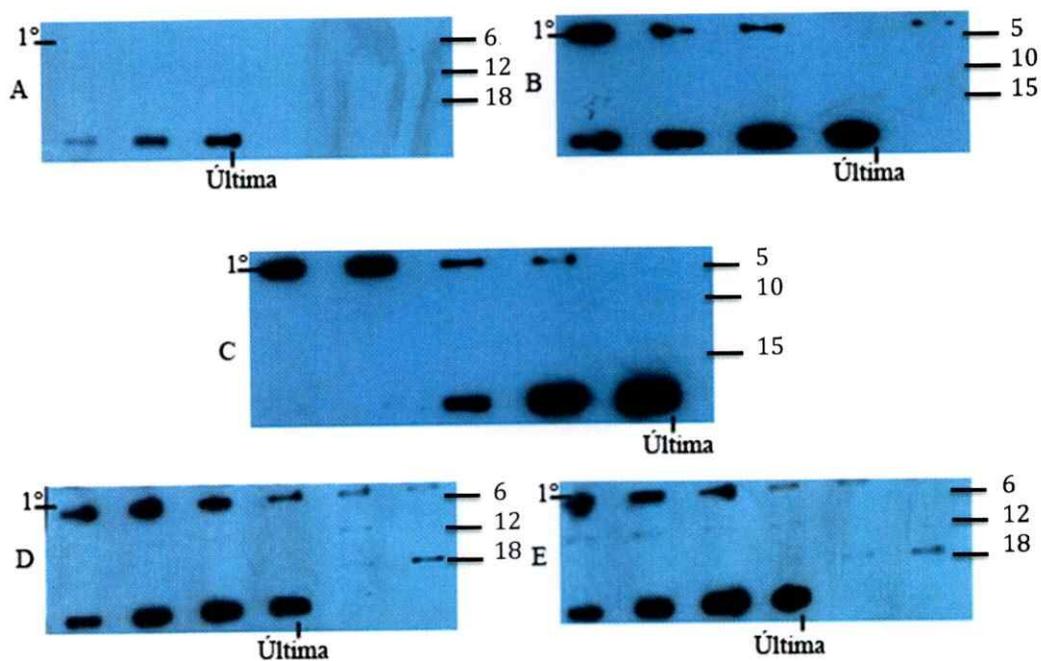
a fracciones de menor densidad (ver figuras 5B, 6B y 7B). Cuando se incubaron los péptidos con liposomas formados únicamente por fosfatidilcolina, fosfatidilcolina y colesterol o fosfatidilcolina, colesterol y esfingomielina, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con la mezcla que contiene todos los diferentes lípidos, encontrando en todos los casos los péptidos en fracciones de menor densidad, indicando que coflotaron junto con los liposomas de diferente composición (ver figuras 5C-E, 6C-E y 7C-E). Estos resultados indican que bajo las condiciones experimentales probadas, sólo fosfatidilcolina es requerida para la interacción de los péptidos análogos de la región troncal de ANDV-Gc con membranas modelos, no siendo esencial ni colesterol ni esfingomielina para que ésta ocurra.



**Figura 5. Coflotación de GcSt con liposomas.** (A) GcSt sólo. (B) GcSt más liposomas compuestos de fosfatidilcolina : fosfatiletanolamina : esfingomielina : colesterol = 2 : 2 : 2 : 3 mol. (C) GcSt más liposomas compuestos sólo por fosfatidilcolina. (D) GcSt más liposomas compuestos por fosfatidilcolina : esfingomielina : colesterol = 4 : 2 : 3. (E) GcSt más liposomas compuestos por fosfatidilcolina : colesterol = 6 : 3. La primera (menor densidad) y última fracción (mayor densidad) del gradiente se muestran marcadas en cada blot. El tiempo de exposición de revelado varía entre las diferentes películas. Los números a la derecha de cada blot indican las diferentes fracciones que corresponden a las muestras cargadas usando el sistema de *Slot blot*. Se resaltan la primera (menos densa) y última fracción (más densa).



**Figura 6. Coflotación de GcSt H1 con liposomas.** (A) GcSt H1 sólo. (B) GcSt H1 más liposomas compuestos de fosfatidilcolina : fosfatiletanolamina : esfingomielina : colesterol = 2 : 2 : 2 : 3 mol. (C) GcSt H1 más liposomas compuestos sólo por fosfatidilcolina. (D) GcSt H1 más liposomas compuestos por fosfatidilcolina : esfingomielina : colesterol = 4 : 2 : 3. (E) GcSt H1 más liposomas compuestos por fosfatidilcolina : colesterol = 6 : 3. La primera (menor densidad) y última fracción (mayor densidad) del gradiente se muestran marcadas en cada blot. El tiempo de exposición de revelado varía entre las diferentes películas. Los números a la derecha de cada blot indican las diferentes fracciones que corresponden a las muestras cargadas usando el sistema de *Slot blot*. Se resaltan la primera (menos densa) y última fracción (más densa).

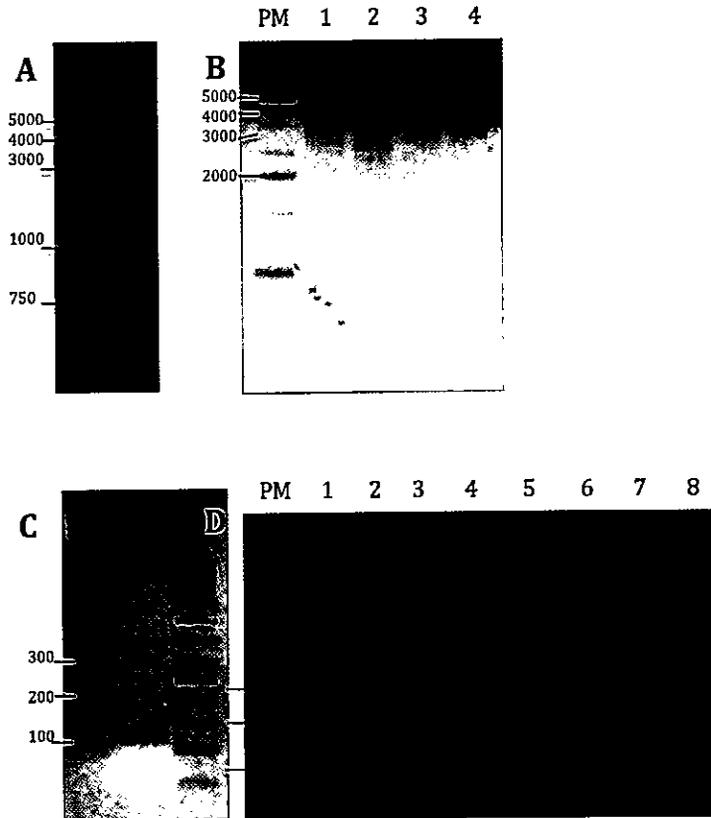


**Figura 7. Coflotación de GcSt H2 con liposomas.** (A) GcSt H2 sólo. (B) GcSt H2 más liposomas compuestos de fosfatidilcolina : fosfatiletanolamina : esfingomielina : colesterol = 2 : 2 : 2 : 3 mol. (C) GcSt H2 más liposomas compuestos sólo por fosfatidilcolina. (D) GcSt H2 más liposomas compuestos por fosfatidilcolina : esfingomielina : colesterol = 4 : 2 : 3. (E) GcSt H2 más liposomas compuestos por fosfatidilcolina : colesterol = 6 : 3. La primera (menor densidad) y última fracción (mayor densidad) del gradiente se muestran marcadas en cada blot. El tiempo de exposición de revelado varía entre las diferentes películas. Los números a la derecha de cada blot indican las diferentes fracciones que corresponden a las muestras cargadas usando el sistema de *Slot blot*. Se resaltan la primera (menos densa) y última fracción (más densa).

## **III.2. Mutágenesis de ANDV-GcSt**

### **III.2.1.- Diseño y obtención de mutantes de la región troncal de ANDV-Gc**

Para determinar si la región troncal de ANDV-Gc es esencial dentro del proceso de fusión de membranas, se diseñó una mutante que carece de la región troncal (Gc $\Delta$ St), eliminándose desde el residuo H413 al N456 de Gc (ver Materiales y Métodos). Para obtener esta mutante, las regiones codificantes río arriba (3212 pb) y río abajo (125 pb) de la región troncal de ANDV-Gc fueron amplificadas mediante PCR (figura 8A). El fragmento de 3212 pb fue ligado al vector de clonamiento pGEM-T y luego subclonado dentro del vector pl.18 (figura 8B). El producto de PCR del fragmento de 125 pb (figura 8C) fue digerido e insertado dentro de pl.18/3212. Las transformantes fueron seleccionadas mediante un PCR interno usando el ADN plasmidial de éstas (figura 8D) y la secuencia confirmada mediante la secuenciación de ésta. Se obtuvo de esta forma un constructo que codifica GPC que no posee la región troncal de Gc (Gc $\Delta$ St).



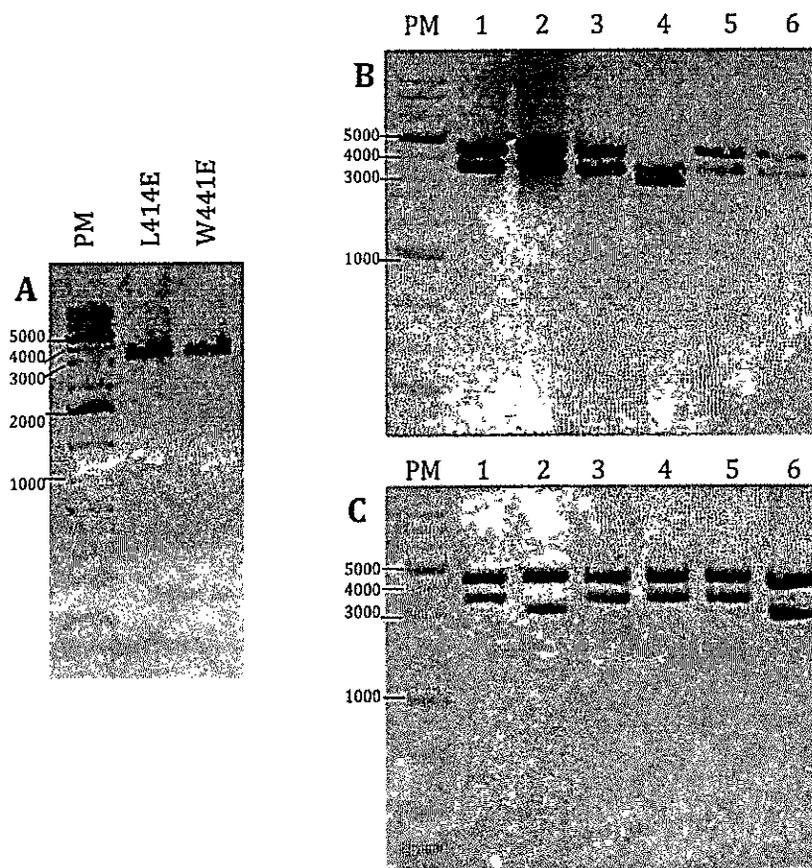
**Figura 8. Obtención del constructo que codifica para la mutante que carece de la región troncal de Gc ( $Gc\Delta St$ ).** (A) PCR para obtener el fragmento río arriba de 3212 pb. (B) Selección de transformantes con el inserto de 3212 pb en pl.18. Se realizó una doble digestión con BglII y NotI. Se observa la banda correspondiente a pl.18 (cercano a los 4 Kb) y una segunda banda de menor tamaño correspondiente al fragmento de 3212 pb en los cuatro clones analizados. (C) PCR para obtener el fragmento de 125 pb. Se observa la banda correspondiente del tamaño esperado. (D) Selección de transformantes de pl.18/3212 con el inserto de 125 pb. Se realizó un PCR sobre los ADN plasmidiales de ocho clones usando los partidores ( $GcSt\Delta H2-F$  y  $GPC\Delta St 3'-R$ ). En los clones 1, 7 y 8 se observa el amplicón del tamaño esperado (cercano a los 150 pb). En A y B las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1 %, utilizando el estándar de peso molecular: 1 Kb. Debido al menor tamaño esperado de los productos en C como en D, las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 2 % y se utilizó el estándar de peso molecular 100 pb.

Además, como una estrategia complementaria e inicial, un residuo de cada hélice putativa de GcSt fue seleccionado para estudiar su función particular dentro de la región troncal. La selección de estos residuos de Gc a mutar fue realizada en base a la conservación y características fisicoquímicas.

Dado que H2 forma probablemente una hélice anfipática (ver figura 4B), un residuo conservado fue seleccionado dentro de la predicha cara apolar de la hélice. Debido a que el triptófano es el aminoácido con mayor potencial de transferirse desde agua a interfase de membrana/agua (Wimley-White, 1996), el residuo W441, que se encuentra conservado dentro del género *Hantavirus* (ver figura 4), fue seleccionado para ser sustituido. Para analizar si la predicha anfipaticidad de H2 es requerida para la actividad fusogénica de Gc. Se introdujo una carga negativa en la cara apolar de la hélice a través de la sustitución de W441 a ácido glutámico, disruptiendo la anfipaticidad predicha.

A pesar de que H1 no es predicha cómo una hélice anfipática, pero sí interactúa con membranas en ensayos *in vitro*; de forma análoga, el residuo apolar y conservado dentro del género *Hantavirus* L414 (ver figura 4) también fue seleccionado para ser sustituido por ácido glutámico.

Basado en estos criterios, ambas mutantes sitio dirigidas fueron producidas mediante PCR (figura 9A). Las mutaciones deseadas fueron insertadas a través de partidores que contenían dentro de sus secuencias las mutaciones de las bases correspondientes (ver Materiales y Métodos). Una vez realizada las mutaciones y confirmadas mediante análisis de secuencia, se subclonó las regiones que codifican para GPC mutada desde pGEM-T al vector de expresión pl.18. Para confirmar el clonamiento, el ADN plasmidial de diferentes transformantes fue analizado por doble digestión (ver figuras 9B-C). De esta manera, se obtuvieron los constructos pl.18/Gc L414E y pl.18/Gc W441E.



**Figura 9. Obtención de los constructos que codifican para las mutantes sitio dirigidas de la región troncal de Gc.** (A) Fragmentos de ADN purificados que codifican para GPC mutantes L414E y W441E obtenidos a partir de pGEM-T/L414E y pGEM-T/W441E digeridos con BgIII y XhoI. Se observa la banda correspondiente al tamaño de GPC (cerca a los 3,4 Kb). Nota: El PCR que genera la mutación no es cargado en gel debido al bajo rendimiento. Éste es utilizado directamente para transformar células de *E. coli*. (B y C) Análisis de diferentes transformantes en pl.18 mediante doble digestión con BgIII y XhoI. En B se muestran los clones correspondientes a L414E, mientras que en C, a W441E. Los clones 1, 2, 3, 5 y 6 para L414E, mientras que los clones 1, 3, 4 y 5 para W441E muestran el patrón esperado: banda correspondiente al tamaño de pl.18 (cerca a los 4 kb) y banda correspondiente al tamaño de GPC (cerca a los 3,4 Kb). Todas las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 1 %, utilizando el estándar de peso molecular: 1 Kb.

### III.2.2.- Expresión y localización en membrana plasmática de las diferentes mutantes de ANDV-GcSt

Para analizar si las diferentes mutantes son sintetizadas y correctamente plegadas, su localización en membrana plasmática fue analizada. Como Gc es una proteína anclada a membrana plasmática, si se encuentra mal plegada, queda retenida en el retículo endoplasmático o es degradada intracelularmente, no pudiendo acumularse en la superficie de células transfectadas. Para analizar si las mutantes de Gc fueron correctamente plegadas, se caracterizó la distribución intracelular y de superficie de cada una de las proteínas mutantes usando un ensayo de biotinización de proteínas de superficie (ver Materiales y Métodos). De esta forma, en una placa de 100 mm,  $3.6 \times 10^6$  células 293 FT fueron transfectadas con 8  $\mu$ g de ADN correspondiente y 48 h después sometidas a biotinización de proteínas de superficie. Como producto de este ensayo, se obtuvo una fracción correspondiente a proteínas intracelulares (no biotiniladas) como de superficie (biotiniladas), las cuales fueron analizadas mediante *Western blot*.

Al analizar las fracciones no biotiniladas de células transfectadas con un constructo que codifica para Gc silvestre, ésta fue detectada de forma monomérica y con un tamaño esperado cercano a los 55 kDa (figura 10A). Cuando se transfectó con los constructos que codifican para GcDSt y Gc L414E, también se detectó en cantidades similares una banda con una masa correspondiente al monómero (figura 10A). En ambos casos, los tamaños moleculares son diferentes al de la proteína silvestre. Para Gc $\Delta$ St, se observó a un menor tamaño que la proteína silvestre, debido a que carece de los residuos correspondientes a la región troncal (se espera una masa molecular cercana a los 51

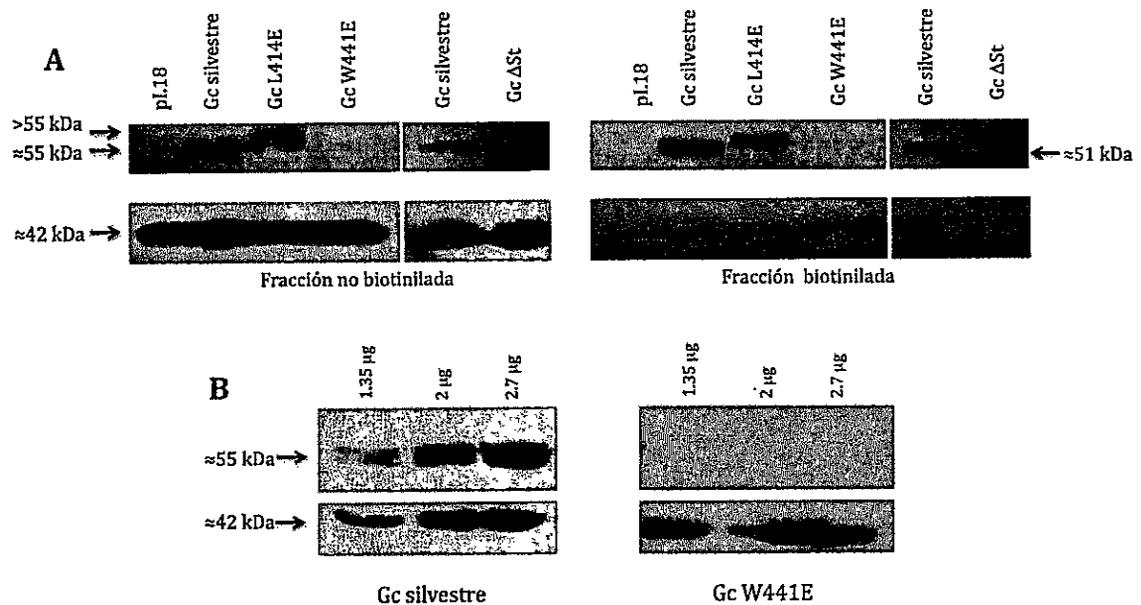
kDa). Por otro lado, en el caso de Gc L414E se observó un leve aumento en la masa molecular de forma reproducible en diferentes ensayos realizados (figura 10A). Esto no era esperado y podría deberse a alguna modificación postraduccional que sufrió la proteína al realizar esta sustitución (ver Discusión). En ninguno de los ensayos realizados fue posible detectar a la mutante Gc W441E ni en la fracción intracelular ni en la de superficie.

Como control interno del experimento, se detectó la proteína  $\beta$ -actina. Al ser ésta una proteína intracelular, sólo debiese estar presente en la fracción no biotinilada, es decir, la intracelular, si es que no ocurrió lisis y subsecuente exposición de proteínas intracelulares al agente de biotinilización. En todos los casos,  $\beta$ -actina sólo se detectó en esta fracción y no en la fracción biotinilada, corroborando el ensayo (ver figura 10A).

Estos resultados indican que las mutantes Gc $\Delta$ St y Gc L414E se acumulan en membrana plasmática, en cantidades similares a la proteína silvestre, por lo que la mutaciones no afectaron su plegamiento ni tráfico. No así para la mutante Gc W441E.

Para analizar si la mutante W441E es detectada mediante la transfección en cantidades de ADN crecientes, se transfectaron en una placa de 6 pocillos,  $6.2 \times 10^5$  células 293 FT fueron transfectadas con 1,35  $\mu$ g, 2  $\mu$ g y 2.7  $\mu$ g de ADN (cantidades que son equivalentes a  $3,6 \times 10^6$  células y 8  $\mu$ g, 12  $\mu$ g y 16  $\mu$ g de ADN respectivamente cuando se utiliza una placa de 100 mm). 48 h post transfección las células fueron lisadas y analizadas mediante *Western blot*. Como control, se realizó el mismo procedimiento con el constructo que codifica para Gc silvestre.

Para la proteína silvestre, se encontró que ésta es sintetizada bajo las tres condiciones probadas, en todos los casos con una masa molecular esperada cercana a los 55 kDa (figura 10B). Una menor expresión se observa al transfectar con 1,35  $\mu$ g de ADN (cantidad equivalente a los 8  $\mu$ g utilizados en ensayo de biotilización de proteínas de superficie), mientras con 2  $\mu$ g se observa una mayor expresión. Esta mayor expresión no se traduce como una mayor actividad fusogénica de la proteína (Cifuentes- Muñoz y col, 2011). No se observó un aumento en la expresión al incrementar la cantidad de ADN a 2.7  $\mu$ g. Por otra parte, al analizar los lisados de células transfectadas con la mutante Gc W441E, en ninguno de los casos se logró detectar la presencia de la proteína (figura 10B). Este resultado indica que la mutante W441E no se produce en forma estable en células de mamífero, por lo cual fue descartada de futuros ensayos.



**Figura 10. Síntesis y localización de Gc silvestre y mutantes.** (A) Células 293 FT transfectadas con constructos pl.18 que codifican para Gc silvestre o mutantes fueron sometidas a biotilización de proteínas de superficie 48 h post-transfección y analizadas

posteriormente mediante *Western blot* con anticuerpos anti-Gc 5D11/G7 y anti- $\beta$ -actina. Tamaños esperados: Gc = 55 kDa,  $\beta$ -actina = 42 kDa. La banda para Gc $\Delta$ St se observa a un menor peso molecular debido a la delección de los residuos correspondientes a la región troncal. (B) Células 293 FT fueron transfectadas con concentraciones crecientes de ADN que codifica para Gc silvestre o Gc W441E. 48 h post-transfección fueron lisadas y 60 mg total de proteínas analizadas mediante *Western blot* con anticuerpos anti-Gc y anti- $\beta$ -actina.

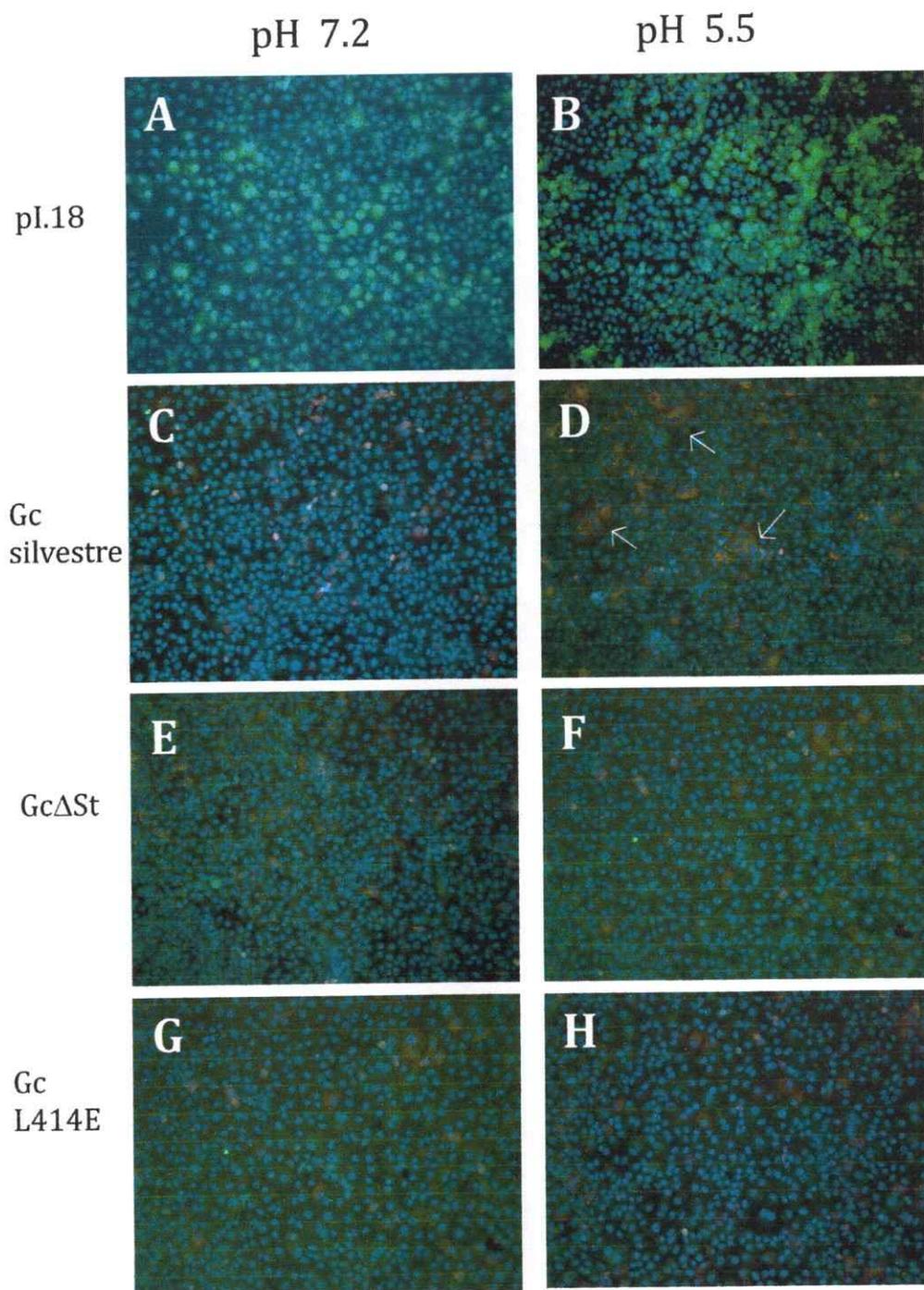
### III.2.3.- Actividad fusogénica de las diferentes mutantes de ANDV-GcSt

Cómo las mutantes Gc $\Delta$ St y Gc L414E se localizaron en membrana plasmática de células transfectadas, éstas fueron analizadas respecto a su actividad fusogénica mediante un ensayo de fusión célula - célula. Para esto, células Vero E6 fueron transfectadas con los diferentes constructos y 48 h después sometidas a una bajada de pH (5.5) lo cual activa a las proteínas Gc previamente acumuladas en la superficie celular. Las células fueron posteriormente teñidas usando 3 diferentes fluoróforos que marcan citoplasma, núcleo y Gc (ver Materiales y Métodos). Cuando se transfectó con ADN que codifica para GPC silvestre, múltiples sincicios fueron observados mediante microscopía de fluorescencia. Estos sincicios contienen entre 3-10 núcleos por citoplasma, con un promedio de 4 núcleos en su interior (ver figura 11D). La formación de estas estructuras sólo ocurrió cuando se bajó el pH de las células, no hay formación de sincicios a pH 7.2 (ver figura 10C), indicando el requerimiento de pH ácido para que se gatille la actividad fusogénica de la glicoproteína Gc.

Cuando se transfectó con los constructos que codifican para Gc $\Delta$ St y L414E manteniendo el pH del medio a 7.2, al igual que para la proteína silvestre, no hubo

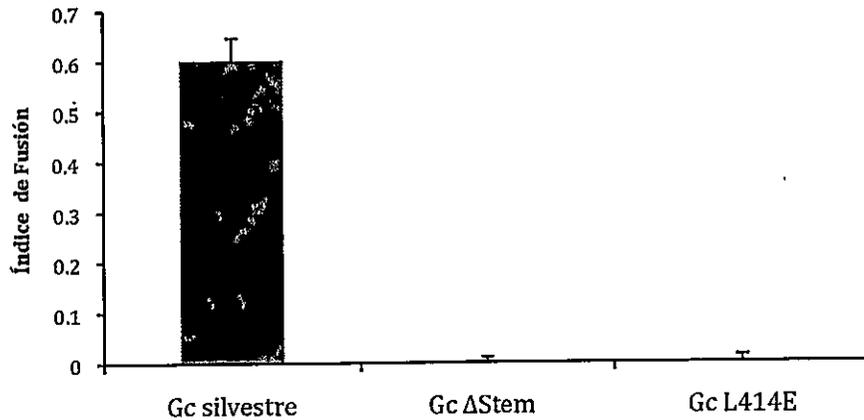
presencia de sincicios (ver figuras 11E y 11G). Cuando se bajó el pH de las células a 5.5, a diferencia de lo que ocurre con la proteína silvestre, no se encontraron sincicios en ninguno de los casos (ver figura 11F y 11H).

Para comparar la actividad fusogénica entre Gc silvestre y las proteínas mutantes se calculó un índice de fusión, el cuál es una representación numérica de la actividad fusogénica (ver Materiales y Métodos, figura 12). La proteína silvestre alcanzó un índice cercano a 0.6, lo cual indica que un 60 % de las células transfectadas están formando parte de un sincicio. Mientras que para ambas mutantes el índice de fusión es cercano a 0. Estos resultados indican que las mutaciones Gc $\Delta$ St, L414E produjeron la pérdida de la actividad fusogénica de Gc. De esta forma, podemos concluir que la región troncal de Gc es esencial dentro del proceso de fusión de membranas, puesto que la proteína mutante que carece de esta región pierde la actividad fusogénica. De forma similar, el residuo apolar L414 dentro de esta región podría jugar un rol esencial, puesto que al mutarlo a ácido glutámico también se pierde la actividad de la proteína.



**Figura 11. Actividad de fusión entre células mediada por Gc silvestre y mutantes.** Inmunofluorescencia Indirecta. Células Vero E6 que expresan Gc silvestre o mutantes fueron o no sometidas a un pH de 5.5 por 5 min y fijadas 4 h después. Se tiñó el citoplasma celular con el fluoróforo CMFDA (fluorescencia verde) y los núcleos con DAPI (fluorescencia azul). Gc detectada con el anticuerpo anti-Gc 5D11/G7 y subsecuentemente con un anticuerpo secundario anti IgG de ratón acoplado a ALEXA555 (fluorescencia roja). La formación de

sincios fue detectada mediante microscopía de fluorescencia (magnificación 200X). (A) vector pl.18 sólo, pH 7.2. (B) vector pl.18 sólo, pH 5.5. (C) pl.18/GPC silvestre, pH 7.2. (D) pl.18/GPC silvestre, pH 5.5. (E) pl.18/GcDSt, pH 7.2. (F) pl.18/GcDSt, pH 5.5. (G) pl.18/Gc L414E, pH 7.2. (H) pl.18/Gc L414E, pH 5.5. Las flechas indican a los sincios



**Figura 12. Índice de fusión.** En base al número de sincios formados por células que expresan Gc fue calculado mediante la fórmula:  $1 - [\text{número de células} / \text{número de núcleos}]$  tanto para la proteína silvestre como las mutantes.

## IV. DISCUSIÓN

El hantavirus Andes ocasiona infecciones en humanos que pueden terminar en un síndrome pulmonar con tasas de mortalidad de hasta un 40 %. Al igual que los otros miembros de la familia *Bunyaviridae*, éste es un virus envuelto, que posee en su membrana las glicoproteínas Gn y Gc. El proceso de fusión de la membrana viral con la membrana celular es una etapa fundamental durante la infección mediada por virus envueltos. Estudios previos por nuestro laboratorio han demostrado que la actividad fusogénica de los *Hantavirus* está asociada a la proteína Gc (Tischler y col, 2005), en particular, a la secuencia correspondiente entre W115 y D121, correspondiente al putativo péptido de fusión (Cifuentes y col, 2011), el cual sería el responsable del contacto inicial con la membrana blanca (revisado por Epanand, 2003)

En el presente trabajo se caracterizó una posible segunda región funcional dentro de Gc, comprendida entre los residuos H413 y N456, denominada región troncal. Previamente, se describió la estructura 2D de esta región del virus Andes encontrándose que posiblemente está formada por 2 hélices  $\alpha$ , las cuales interactúan con membranas modelo en ensayos *in vitro* (Muñoz-León, I. Seminario de Título, 2009). Como continuación de este trabajo previo, se planteó como objetivos en esta tesis, determinar que composición lipídica es requerida para la interacción de la región troncal con membranas modelo y determinar si esta región es esencial dentro del proceso de fusión de membranas mediado por Gc.

Utilizando un ensayo de coflotación de péptidos análogos de la región troncal de Gc de ANDV con liposomas, se encontró que sólo fosfatidilcolina es requerida para que los péptidos GcSt H1, GcSt H2 y GcSt correspondientes a la putativa hélice 1 de ANDV-GcSt, hélice 2 de ANDV-GcSt y región troncal completa de ANDV-Gc interactúen con membranas modelos (ver figuras 5-7). Puesto que al incubar los péptidos con liposomas formados sólo con este lípido, éstos coflotaron a fracciones de menor densidad. Resultados similares fueron obtenidos cuando se incubaron los péptidos con liposomas que además poseen colesterol y esfingomielina, lo cual indica, que al parecer, estos lípidos no son esenciales para que dicha interacción ocurra. Este ensayo no permitió determinar la constante de disociación ( $K_D$ ) de cada interacción, por lo que no se puede descartar si dicha interacción se vería favorecida en presencia de alguno de los lípidos antes mencionados.

Las balsas lipídicas son microdominios de la membrana plasmática enriquecidos en colesterol y esfingomielina (Pike, 2006). Éstas son regiones que poseen una menor fluidez dentro de la membrana y se ha descrito que están involucradas en la señalización celular y endocitosis, puesto que agrupan una gran cantidad de proteínas de membrana (revisado por Brown & London, 2000). Asimismo, muchos virus entran a la célula usando estos microdominios, ya que aquí se pueden concentrarse los receptores celulares necesarios para la interacción y endocitosis del virus (revisado por Marsh y col, 2006). Además, muchos virus requieren la presencia de colesterol para la fusión de la membrana viral con la blanco (Pietilainen y col, 2005). En el caso de los hantavirus, se describió, que existe una dependencia de colesterol en la infectividad de partículas lentivirales pseudotipificadas con las glicoproteínas de ANDV (Cifuentes-Muñoz y col, 2010) y además, que existe una mayor afinidad de péptidos análogos a la

región que comprende el putativa péptido de fusión de ANDV-Gc con membranas modelos que además de fosfatidilcolina poseen colesterol, esfingomielina y fosfatidiletanolamina (Tischler y col, 2005). Estos resultados podrían implicar que el mecanismo mediante el cual el péptido de fusión gatilla la fusión de la membrana viral con la membrana blanco requiere la presencia de colesterol en ésta última y que, este proceso se podría ver favorecido en balsas lipídicas de membrana. Para otros virus envueltos también se ha descrito una dependencia de colesterol, por ejemplo, con el péptido de fusión de la proteína E1 de SFV (Ahn y col, 2002). Sin embargo, no todos los virus que poseen proteínas de fusión clase II requieren de este lípido. (Umashankar y col, 2008). A futuro se debería analizar si la afinidad de la región troncal por estas diferentes composiciones lipídicas la diferencia de las afinidades del péptido de fusión.

Fosfatidilcolina es el fosfolípido más abundante en las membranas de células animales. Posee una carga neta igual a cero, pero tiene dos cargas locales: el grupo colina posee una carga local positiva, la cual es contrarestanda por la carga local negativa del fosfato. De esta forma, una bicapa formada únicamente por este fosfolípido, posee una distribución diferencial de cargas, donde la región más externa tendrá una carga parcial positiva (d(+), cabezas de colina), mientras que la región contigua más interna tendrá una carga parcial negativa (d(-), grupos fosfato), siendo la región interna neutra (colas hidrocarbonadas). Al analizar la distribución de cargas del modelo de la hélice anfipática GcSt H2 (ver figura 5), se observa que ésta posee una carga negativa en el centro de la cara polar (E447), dos cargas positivas en la interfase polar-apolar (K439 y K444) y carga neutra en la cara apolar de la hélice. Ésta distribución de cargas es opuesta a la que posee una membrana de fosfatidilcolina, pudiendo generarse múltiples interacciones electrostáticas. Así, la cara polar de GcSt H2, de carga

negativa, podría interactuar con las cabezas de colina, de carga positiva. Por otro lado, las lisinas de carga positiva, podrían interactuar con las cargas negativas de los grupos fosfato. Además, podrían existir interacciones hidrofóbicas de las colas hidrocarbonadas de la membrana con la cara apolar de GcSt H2.

Estas mismas características han sido descritas para regiones dentro de apolipoproteínas, las cuales transportan lípidos y moléculas liposolubles dentro del torrente sanguíneo. Múltiples estudios biofísicos se han realizado con el péptido denominado 18A, el cual se estructura como una hélice anfipática con la misma distribución espacial de cargas que GcSt H2 (Mishra y col, 1994). Se ha demostrado la eficacia de éste para unirse a membranas, su localización paralela inserta dentro de la bicapa lipídica (a 17 Å del centro de la bicapa) y múltiples interacciones que ocurren entre las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos con las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos (Gazzara y col, 1997; Hristova y col, 1999). Además, se ha visto que las lisinas localizadas en la interfase polar-apolar de la hélice estarían involucradas tanto en interacciones del tipo Coulómbicas (grupo e-amino con grupo fosfato de los fosfolípidos), cómo también, en interacciones del tipo Van der Waals, ya que extenderían su cadena lateral permitiendo que los grupos CH<sub>2</sub> de ésta interactúen con las colas hidrocarbonadas (denominado teoría del snorkel, Segrest y col, 1990). Este modelo explicaría cómo GcSt H2 podría interactuar con fosfatidilcolina no requiriendo de otros lípidos, sino basado sólo en las características electrostáticas de ambos componentes. En base a esto, GcSt H2 se podría extender de forma paralela e inserto sobre la membrana viral estabilizado por interacciones electrostáticas y de Van der Waals. Este tipo de interacción, no puede ser aplicado para GcSt H1, por lo que otros factores deben estar involucrados en la interacción de esta región con

membranas. Ensayos que apunten a determinar si existe o no una contribución electrostática en la interacción de ANDV-GcSt con membranas se proponen como continuación de este trabajo.

Por otra parte, para analizar si la región troncal es necesaria para la actividad fusogénica de Gc, diferentes mutaciones de esta región se generaron dentro de la proteína completa. Como una aproximación inicial, se produjeron dos mutantes sitio dirigidas. Así, se mutó el residuo apolar conservado L414 a ácido glutámico y el residuo aromático conservado W441 también a ácido glutámico. Gc L414E se expresó y acumuló en membrana plasmática de células transfectadas al igual que la proteína silvestre, sin embargo se observó una masa molecular ligeramente mayor a la esperada. Este cambio podría deberse a que la proteína sufrió una modificación post-traducciona al introducir esta sustitución. Se han descrito dentro de las glicoproteínas de fusión viral otras modificaciones a parte de las glicosilaciones, cómo palmitolizaciones (conjugación con una molécula de ácido palmítico). Se ha descrito para la proteína de envoltura gp160 del VIH la presencia de dos moléculas de ácido palmítico en su dominio citoplasmático, las cuales son críticas para la infectividad viral (Rouso y col, 2000). También se han descrito palmitolizaciones en el segmento transmembrana (Caballero y col, 1998), no se han descrito conjugaciones con ácido palmítico en ectodominios de proteínas de fusión. Sin embargo, se ha demostrado que esta reacción es posible que ocurra dentro del lumen del retículo endoplasmático (Vilas y Berthiaume, 2004). Si bien, al analizar el contexto de la sustitución L414E no se predice ninguna modificación post-traducciona, no se descarta una posible alquilación o modificación de las glicosilaciones, lo cual explicaría el leve aumento en la masa molecular (ver figura 10). De cualquier forma, la mutante Gc L414E logró acumularse

en membrana plasmática, lo cual confirma que si ocurrió una posible modificación y que ésta no afectó su tráfico hacia la membrana plasmática por la vía secretoria. Sin embargo, la mutante perdió la actividad fusogénica, indicando que éste sería un residuo esencial para la actividad de la proteína. Para confirmar esto, una sustitución por otro residuo apolar debería ser realizada.

En el caso de la mutante Gc W441E no fue posible detectar su expresión en células transfectadas, por lo que no se puede concluir nada sobre la función de este residuo en particular. Esto puede haberse debido a que la mutación de triptófano a ácido glutámico fue muy radical para la proteína, no pudiendo plegarse de forma correcta, siendo degradada intracelularmente. Más aún, al analizar el contexto en que se encuentra la mutación se detectó la presencia de un sitio de SUMOilación que antes no existía en la proteína. La SUMOilación corresponde a una modificación post-traduccional que conjuga una proteína con la proteína SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) (revisado por Verger y col, 2002). SUMOilación de proteínas se ha visto que (a diferencia de lo que ocurre con ubiquitinación de proteínas) no lleva directamente a una degradación, si no a cambios en la función (activación/represión). La secuencia aminoacídica consenso para SUMOilación es yKxE, donde y corresponde a un aminoácido hidrofóbico de gran tamaño y x es cualquier residuo. La conjugación con la proteína SUMO ocurre en la lisina dentro de la secuencia consenso (Verger y col, 2002). Al introducir la sustitución W441E en Gc, se generó la secuencia 438-FKCE-442, la cual podría ser sujeta a una modificación por conjugación con proteína SUMO. Como se mencionó anteriormente, la SUMOilación de proteínas *in vivo* no lleva a su degradación, pero en este caso, la SUMOilación de Gc pudo haber afectado al

plegamiento y/o tráfico de ésta, siendo destinada a degradación, no pudiendo detectarse la expresión de Gc W441E.

Por su parte, la mutante GcDSt, la cual carece de la región troncal, se acumuló en membrana plasmática de células transfectadas, al igual que la proteína silvestre, indicando que no se vio afectado el plegamiento ni tráfico de ésta. Sin embargo, perdió la actividad de fusionar células, indicando que la región troncal es esencial dentro del proceso de fusión de membranas, confirmándose la hipótesis planteada.

Estos resultados en conjunto corresponden a la primera información funcional sobre esta región en el género *Hantavirus* y es congruente con lo descrito para otras proteínas de fusión clase II (Liao & Kielian, 2006) y también para segmentos pre-TM de otras proteínas de fusión (Salzwedel y col, 1999; Jeetendra y col, 2003).

Un mecanismo mediante el cual la región troncal de la proteína de fusión podría ayudar al proceso de fusión de membranas desestabilizando la membrana viral. De esta forma, la membrana viral, al encontrarse bajo condiciones de estrés, el costo energético para fusionarse con la membrana blanco sería menor (Chernomorkik y Kozlov, 2003). Esto no es posible determinarlo con los resultados acá presentados.

Como continuación de esta tesis, se propone generar una serie de sustituciones dentro de la región troncal que cambien los residuos conservados, de manera de estudiar si estos son o no esenciales para la actividad de la proteína. Finalmente, cómo la fusión de membranas es un proceso que ocurre en múltiples etapas (ver I.2.3), queda por

dilucidar en que etapa del proceso las mutantes perdieron la actividad. Estudios en conjunto ayudarán a caracterizar la función de la región troncal en este proceso.

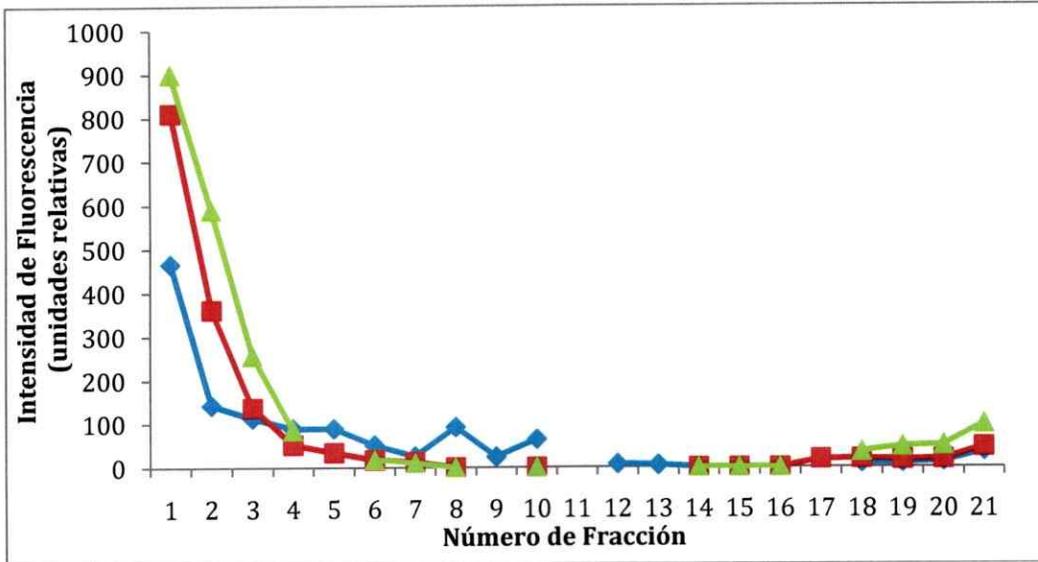
## CONCLUSIONES

- Sólo fosfatidilcolina se requiere para la interacción de la región troncal de ANDV-Gc con membranas modelos. Ni esfingomielina ni colesterol ni fosfatidiletanolamina son requeridos para que ésta ocurra.
- La región troncal de ANDV-Gc es esencial para el proceso de fusión de membranas. La mutante que carece de ésta, se acumula en la membrana plasmática de células transfectadas al igual que la proteína silvestre, pero no produce la fusión entre células. Lo mismo ocurre con la sustitución del residuo apolar conservado L414 a ácido glutámico.

## PROYECCIONES

- Determinar si existe o no una contribución electrostática en la interacción de ANDV-GcSt con membranas modelos para validar el modelo propuesto.
- Aumentar el número de sustituciones de residuos dentro de la región troncal para determinar que residuos son claves dentro del proceso de fusión de membranas.
- Analizar en que etapa del proceso de fusión de membranas las mutantes pierden la actividad. Esto permitirá determinar la función de ésta región dentro del proceso de fusión.

## ANEXO



**Figura Anexo 1. Fluorescencia de DPH en las diferentes fracciones del gradiente de flotación de liposomas de diferente composición.** Se muestran las intensidades de fluorescencia para tres gradientes diferentes realizados independientemente. Triángulos: liposomas compuestos de fosfatidilcolina y colesterol. Cuadrados: liposomas compuestos de fosfatidilcolina, colesterol y esfingomielina. Rombos: liposomas compuestos de fosfatidilcolina, colesterol, esfingomielina y fosfatidiletanolamina.

Nombre del partidor	Secuencia	Descripción
Gc L414E-F	5' gcatcagccccacac <b>gaa</b> gagagagtgcaggc 3'	Mutante Gc L414E. En negrita, codón modificado. Subrayado, bases modificadas.
Gc L414E-R	5' gcctgtcactctctc <b>ttc</b> gtgtggggctgatgc 3'	Mutante Gc L414E. En negrita, codón modificado. Subrayado, bases modificadas.
Gc W441E-F	5' gcacattcaaagtc <b>gag</b> ttcaccaagtcagg 3'	Mutante Gc W441E. En negrita, codón modificado. Subrayado, bases modificadas.
Gc W441E-R	5' cctgacttggtgaa <b>ctc</b> gcattggaatgtgc 3'	Mutante Gc W441E. En negrita, codón modificado. Subrayado, bases modificadas.
GPCDSt 5' -F	5' tagatct <b>attatgga</b> agggtgtatctggtgc 3'	Clonamiento del fragmento río arriba de la región troncal de ANDV-Gc de 3212 pb. En cursiva, sitio BglIII. En negrita, secuencia Kozak para expresión

GPCΔSt 5' -R	5' gtcgac <i>gcggccgc</i> tggggctgaagcaagtagaccc 3'	Clonamiento del fragmento río arriba de la región troncal de ANDV-Gc de 3212 pb. En cursiva, sitio NotI en marco de lectura.
GPCΔSt 3' -F	5' gtcgac <i>gcggccgc</i> tggattgttgttagtgcttgttg 3'	Clonamiento del fragmento río abajo de la región troncal de ANDV-Gc de 125 pb. En cursiva, sitio NotI en marco de lectura.
GPCΔSt 3' -R	5' t <i>ctcgag</i> ttagacagtttctgtgccc 3'	Clonamiento del fragmento río abajo de la región troncal de ANDV-Gc de 125 pb. En cursiva, sitio XhoI. En negrita, codón de término.
GcStΔH2-F	5' ctgtcatgatacagattcgctcgccgccc 3'	Selección de transformantes para obtener GcDSt.

**Tabla 1.** Partidores utilizados. La lista contiene todos los partidores utilizados en esta tesis para las diferentes reacciones de PCR.

Componente	Concentración final
DNA (GPC/pGEM-T)	1 ng/ul
Partidor -F	0,25 mM
Partidor - R	0,25 mM
Tampón 10 X	1 X
Mezcla de dNTP (Invitrogen)	0.2 mM (c/dNTP)
<i>PfuUltrall</i> (Invitrogen)	0.02 U/mL

**Tabla 2.** Mezcla de reacción de PCR para amplificación de los fragmentos río arriba y río abajo de ANDV-GcSt. Volumen total de reacción = 50 mL.

Componente	Concentración Utilizada
DNA (GPC/pGEM-T)	1 ng/ ml
Partidor -F	0,25 mM
Partidor - R	0,25 mM
Tampón 10 X (Invitrogen)	1 X
Mezcla de dNTP (Invitrogen)	0.2 mM (c/dNTP)
<i>AccuPrime</i> polimerasa (Invitrogen)	

**Tabla 3.** Mezcla de reacción de PCR para obtención de las mutantes sitio dirigidas. Volumen total de reacción = 50 mL.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (° C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>Número de ciclos</b>
Denaturación inicial	95	180	1
Denaturación	95	15	30
Alineamiento	56	30	
Extensión	72	210	
Extensión final	72	10	1

**Tabla 4.** Protocolo de PCR utilizado para amplificar el fragmento río arriba de la región codificante de ANDV-GcSt de 3212 pb.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (° C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>Número de ciclos</b>
Denaturación inicial	95	180	1
Denaturación	95	10	30
Alineamiento	56	30	
Extensión	72	30	
Extensión final	72	5	1

**Tabla 5.** Protocolo de PCR para amplificar el fragmento río abajo de la región codificante de ANDV-GcSt de 125 pb.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (° C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>Número de ciclos</b>
Denaturación inicial	95	180	1
Denaturación	95	15	18
Alineamiento	56	30	
Extensión	72	480	
Extensión final	72	5	1

**Tabla 6.** Protocolo de PCR utilizado para obtener las mutantes sitio dirigidas de la región troncal de ANDV-Gc.

## BIBLIOGRAFIA

- Allison, S., Stiasny, K., Stadler, K., Mandl, C. y Heinz, F.** 1999. Mapping of Functional Elements in the Stem-Anchor Region of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Protein E. *J.Virol.* **73**: 5605-5612.
- Arikawa, J., Takashima, I. y Hashimoto, N.** 1985. Cell fusion by haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) viruses and its application for titration of virus infectivity and neutralizing antibody. *Arch Virol.* **86**: 303-313.
- Armstrong, T., Kushnir, A y White, J.** 2000. The Transmembrane Domain of Influenza Hemagglutinin Exhibits a Stringent Length Requirement to Support the Hemifusion to Fusion Transition. *J. Cell Biol.* **151**: 425-437.
- Brown, D. y London, E.** 2000. Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts. *JBC.* **275**: 17221-17224.
- Caballero, M., Carabaña, J., Ortego, J y Fernandez-Muñoz, R.** Measles Virus Fusion Protein Is Palmitoylated on Transmembrane-Intracytoplasmic Cysteine Residues Which Participate in Cell Fusion. 1998. *J.Virol.* **81**: 8198-8204
- Cifuentes-Muñoz, N., Barriga, G., Valenzuela, P.D.T. y Tischler, N.** 2011. Aromatic and polar residues spanning the candidate fusion peptide of the Andes virus Gc protein are essential for membrane fusion and infection. *J. Gen. Virol.* **92**: 552-563
- Cifuentes-Muñoz, N., Darlix, J. y Tischler, N.** 2010. Development of a lentiviral vector system to study the role of the Andes virus glycoproteins. *Virus Res.* **153**: 29-35.
- Chernomodik, L. y Kozlov, M.** 2003. Protein-Lipid Interplay in Fusion and Fission of Biological Membranes. *Annual Rev. Biochem.* **72**: 175-207.
- Chernomodik, L., Zimmerberg, J. y Kozlov, M.** 2006. Membrane of the world unite! *J. Cell Biol.* **175**: 201-207.
- Custer, D.M., Thompson, E., Schmaljohn, C.S., Ksiazek, T.G. y Hooper, J.W.** 2003. Active and passive vaccination against hantavirus pulmonary syndrome with Andes virus M genome segment-based DNA vaccine. *J. Virol.* **18**: 9894-905.
- Epand, R.** 2003. Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim. Biophys. Acta.* **1614**: 116-121.
- Fields, B.N., Knipe, D.M., Howlet, P.M. (ed.)** 1996. *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Galdiero, S., Falanga, A., Vitiello, M., D'Isanto, M., Collins, C., Orrei, V., Browne, H., Pedone, C. y Galdiero, M.** 2007. *ChemBiochem.* Evidence for a role of the membrane-proximal region of herpes simplex virus Type 1 glycoprotein H in membrane fusion and virus inhibition. **8**: 885-895.

**Gallo, S., Finnegan, C., Viard, M., Raviv, Y., Dimitrov, A., Rawat, S., Puri, A., Durell, S. y Blumenthal, R.** 2003. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim. Biophys. Acta.* **1614**: 36–50.

**Gavrilovskaya, I., Shepley, M., Shaw, R., Ginsber, M. y Mackow, E.** 1998.  $\beta$ 3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 7074-7079.

**Gazzara, J., Phillips, M., Lund-Katz, S., Palgunachari, M., Segrest, J., Anantharamaiah, G. y Snow, J.** 1997. Interaction of class A amphipathic helical peptides with phospholipid u nilamellar vesicles. *J. Lipid Res.* **38**: 2124-2146.

**Giannecchini, S., Bonci, F., Pistello, M., Matteucci, D., Sichi, O., Rovero, P. y Bendinelli, M.** 2004. The membrane-proximal tryptophan-rich region in the transmembrane glycoprotein ectodomain of feline immunodeficiency virus is important for cell entry. *Virology.* **320**: 156–166.

**Guillén, J., Pérez-Berná, A., Moreno, M. y Villalaín, J.** 2005. Identification of the Membrane-Active Regions of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Membrane Glycoprotein Using a 16/18-Mer Peptide Scan. *J. Virol.* **79**: 1743–1752.

**Hepojoki, J., Strandin, T, Vaheri, A. y Lankinen, H.** 2010. Interactions and Oligomerization of Hantavirus Glycoproteins. *J Virol.* **84**: 227–242.

**Hope, M., Bally, M., Webb, G. y Cullis, P.** 1985. Production of large unilemellar vesicles by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta.* **812**: 55-65.

**Hooper, J.W., Kamrud, K.I., Elgh, F., Custer, D. y Schmaljohn, C.S.** 1999. DNA vaccination with hantavirus M segment elicits neutralizing antibodies and protects against Seoul virus infection. *Virology.* **255**: 269 –278.

**Hooper, J.W., Custer, D.M., Thompson, E. y Schmaljohn, C.S.** 2001. DNA vaccination with the Hantaan virus M gene protects Hamsters against three of four HFRS hantaviruses and elicits a high-titer neutralizing antibody response in Rhesus monkeys. *J Virol.* **75**: 8469 – 8477.

**Hristova, K., Wimley, W., Mishra, V., Anantharamiah, G., Segrest, J. y White, S.** 1999. An Amphipathic  $\alpha$ -Helix at a Membrane Interface: A Structural Study using a Novel X-ray Diffraction Method. *J. Mol. Biol.* **290**: 99-117.

**Huiskonen, J., Hepojoki, J., Laurinmäki, P., Vaheri, A., Lankinen, H., Butcher, S. y Grūnewald, K.** 2010. Electron Cryo-Tomography of Tula Hantavirus Suggests a Unique 3Assembly Paradigm for Enveloped Viruses. *J Virol.* **84**: 4889-4897.

**Jin, M. Park, L. Lee, S., Shin, J, Song, K.J., Ahn, T.I., Hwang, S.Y., Ahn, B.Y. y Ahn, L.** 2002. Hantaan virus enters cells by a clathrin-dependent receptor mediated endocytosis. *Virology.* **294**: 60-69.

**Jeetendra, E., Ghosh, K., Odell, D., Li, J., Ghosh, H. y Whitt, M.** 2003. The Membrane-Proximal Region of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G Ectodomain Is Critical for Fusion and Virus Infectivity. *J. Virol.* **77**: 12807–12818

**Jeetendra, E., Robinson, C., Albritton, L. y Whitt, M.** 2000. The Membrane-Proximal Domain of Vesicular Stomatitis Virus G Protein Functions as a Membrane Fusion Potentiator and Can Induce Hemifusion. *J. Virol.* **76**: 12300-12311.

- Kelkar, D. y Chattopadhyay, A.** 2006. Membrane interfacial localization of aromatic amino acids and membrane protein function. *J. Biosci.* **31**: 297–302.
- Kielian, M.** 2006. Class II virus membrane proteins. *Virology.* **344**: 38–47
- Kielian, M. y Rey, F.** 2005. Virus membrane-fusion proteins: More than one way to make a hairpin. *Nat. Rev. Microb.* **4**: 67–76.
- Levis, S., Morzunov, S.P., Rowe, J.E., Enria, D., Pini, N., Calderon, G., Sabattini, M. y St Jeor, S.C.** 1998. Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. *J Infect Dis.* **177**: 529–38.
- Liao, M. y Kielian, M.** 2005. Domain III from class II fusion protein functions as a dominant-negative inhibitor of virus membrane fusion. *J. Cell Biol.* **171**: 111–120.
- Liao, M. y Kielian, M.** 2006. Functions of the Stem Region of the Semliki Forest Virus Fusion Protein during Virus Fusion and Assembly. *J. Virol.* **80**: 11362–11369.
- Lorizate, M., Huarte, N., Saéz-Ciri6n, A y Nieva, J.** 2008. Interfacial pre-transmembrane domains in viral protein promoting membrane fusion and fission. *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**: 1624–1639.
- Marsh, M. y Helenius, A.** 2006. Virus entry: open sesame. *Cell* **124**: 729–740.
- Mertz, G.J., Miedzinski, L., Goade, D., Pavia, A.T., Hjelle, B., Hansbarger, C.O., Levy, H., Koster, F.T., Baum, K., Lindemulder, A., Wang, W., Riser, L., Fernandez, H., Whitley, R.J.** 2004. Collaborative Antiviral Study Group. Placebo-controlled and double-blind trial of intravenous ribavirin for the treatment of hantavirus cardiopulmonary syndrome in North America. *Clin. Infect. Dis.* **39**: 1307–1313.
- Mishra, V., Palgunachari, M., Segrest, J. y Anantharamaiah, G.** 1994. Interactions of Synthetic Peptide Analogs of the Class A Amphipathic Helix with Lipids: Evidence for the Snorkel Hypothesis. *J. Biol. Chem.* **269**: 7185–7191.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. y Harrison, S.** 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature.* **427**: 313– 318.
- Moreno, M., Giudici, M. y Villalaín, J.** 2006. The membranotropic regions of the endo and ectodomains of HIV gp41 envelope glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1758**: 111– 123.
- Muñoz-Le6n, I.** Noviembre 2009. Seminario de t6tulo: Caracterizaci6n estructural y funcional de la regi6n troncal del *Hantavirus Andes*. Directora de Tesis: Nicole Tischler. Co-director: Octavio Monasterio. Universidad de Chile.
- Muranyi, W., Bahr, U., Zeier, M. y and Van der Woude, F.** 2005. Hantavirus Infection. *J Am Soc Nephrol.* **16**: 3669–3679.
- Odell, D., Wanas, E., Yan, J. y Ghosh, H.** 1997. Influence of Membrane Anchoring and Cytoplasmic Domains on the Fusogenic Activity of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *J. Virol.* **71**: 7996–8000.

- Padula PJ, Edelstein A, Miguel SDL, López NM, Rossi CM, Rabinovich RD. 1998.** Hantavirus pulmonary syndrome (HPS) outbreak in Argentina: molecular evidences for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology*. **241**:323-30.
- Peisajovich, S. y Shai, Y. 2003.** Viral fusion proteins: multiple regions contribute to membrane fusion. *Biochim Biophys Acta*. **1614**: 122-129.
- Pensiero, M.N., Sharefkin, J.B., Dieffenbach, C.W. y Hay, J. 1992.** Hantaan virus infection of human endothelial cells. *J. Virol*. **66**: 5929-5936.
- Pérez-Berná A.J., Bernabeu, A., Moreno, M.R., Guillén, J. y Villalain, J. 2008.** The pre-transmembrane region of the HCV E1 envelope glycoprotein: interaction with model membranes. *Biochim Biophys Acta*. **10**: 2069-80.
- Pietliainen, V., Marjomako, V., Heino, J. y Hyypla, T. 2005.** Viral entry, lipid rafts and caveosomes. *Ann Med*. **37**: 349-403.
- Pike, L. 2006.** Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J. Lipid Res*. **47**: 1597-1598
- Plassmeyer, M., Soldan, S., Stachelek, K., Martín-García, J. y González-Scarano, F. 2005.** California serogroup Gc (G1) glycoprotein is the principal determinant of pH-dependent cell fusion and entry. *Virology*. **338**: 121-132.
- Ribeiro, D., Borst, J. W., Goldbach, R. y Kormelink, R. 2009.** *Virology*. Tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein interacts with both viral glycoproteins Gn and Gc in planta. **383**: 121-130.
- Robinson, C. y Whitt, M. 2002.** The Membrane-Proximal Stem Region of Vesicular Stomatitis Virus G Protein Confers Efficient Virus Assembly. *J. Virol*. **76**: 2239-2246.
- Rousso, I., Mixon, M., Chen, B. y Kim, P. 2000.** Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *PNAS*. **97**: 13523-13525.
- Sáez-Cirión, A., Arrondo, J., Gómara, M., Lorizate, M., Iloro, I., Melykan, G. y Nieva, J. 2003.** Structural and Functional Roles of HIV-1 gp41 Pretransmembrane Sequence Segmentation. *Biophys. J*. **85**: 3769-3780.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989** *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Salzwedel, K. West, J. y Hunter, E. 1999.** A Conserved Tryptophan-Rich Motif in the Membrane-Proximal Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Ectodomain Is Important for Env-Mediated Fusion and Virus Infectivity. *J. Virol*. **73**: 2469-2480.
- Schilibi, D., Montelaro, R. y Vogel, H. 2001.** The Membrane-Proximal Tryptophan-Rich Region of the HIV Glycoprotein, gp41, Forms a Well-Defined Helix in Dodecylphosphocholine Micelles. *Biochem*. **40**: 9570-9578
- Segrest, J., De Loof, H., Dohlman, JG., Brouillette, CG. y Anantharamaiah, GM. 1990.** Amphipathic helix motif: classes and properties. *Proteins*. **8**:103-17.

**Suárez, T., Gallaher, W., Aguirre, A., Gofí, F. y Nieva, J. 2000. Membrane Interface-Interacting Sequences within the Ectodomain of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein: Putative Role during Viral Fusion. *J. Virol.* 74: 8038-8047.**

**Suárez, T., Nir, S., Gofí, F., Saéz-Ciri6n, A. y Nieva, J. 2000. The pre-transmembrane region of the human immunodeficiency virus type-1 glycoprotein: a novel fusogenic sequence. *FEBS Letters.* 477: 145-149.**

**Tamm, L. 2003. Hypothesis: spring-loaded boomerang mechanism of influenza hemagglutinin-mediated membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 1614: 14– 23**

**Tischler, N., Gonzalez, A., Perez-Acle, T., Roseblatt, M. y Valenzuela, P.D.T. 2005. Hantavirus Gc glycoprotein: evidence for a class II fusion protein. *J. Gen. Virol.* 86: 2937–2947**

**Vilas, G y Berthiaume, L. 2004. A role for palmitoylation in the quality control, assembly and secretion of apolipoprotein B. *Biochem. J.* 377: 121–130**

**Verger, A., Perdomo, J. y Crossley, M. 2003. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO rep.* 4: 137-142.**

**Weissenhorn, W., Hinz, A. y Gaudin, Y. 2007. Virus membrane fusion. *FEBS Letters.* 581: 2150-2155.**

**Wimley, W., Creamer, T. y White, S. 1996. Solvation energies of amino acid side chains and backbone in a family of host-guest pentapeptides. *Biochem.* 35: 5109-24.**

**Wimley, W. & White, S. 1996. Experimentally determined hidrofobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat. Struct. Biol.* 3: 842-847.**

**Zaitseva, E., Mittal, A., Griffin, D. y Chernomordik, L. 2005. Class II fusion protein of alphaviruses drives membrane fusion through the same pathway as class I proteins. *J. Cell Bio.* 169: 167-177.**

**Zhang, W., Chipman, P., Rossmann, M. y Kuhn, R. 2003. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat. Struct. Biol.* 10: 907-912.**

**Zwick, M., Labrijn, A., Wang, M., Spenlehauer, C., Ollman, E., Binley, J., Moore, J., Hermann, G., Burton, D. y Parren, W. 2001. Broadly Neutralizing Antibodies Targeted to the Membrane-Proximal External Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Glycoprotein gp41. *J. Virol.* 75: 10892-10905.**