

UCH-FC  
Biotecnología  
A174  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

**“DESESTABILIZACIÓN Y FUSIÓN DE MEMBRANAS MEDIANTE  
PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN G<sub>c</sub> DEL  
VIRUS ANDES (*HANTAVIRUS*)”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

**FERNANDO JAVIER VILLALÓN LETELIER**

Dra. Nicole Tischler  
Directora de Seminario de Título

Dr. Octavio Monasterio  
Patrocinante de Seminario de Título

Diciembre de 2011  
Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Fernando Javier Villalón Letelier:

### “DESESTABILIZACIÓN Y FUSIÓN DE MEMBRANAS MEDIANTE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN G<sub>c</sub> DEL VIRUS ANDES (HANTAVIRUS)”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

*Dra. Nicole Tischler*  
**Directora Seminario de Título**

Firma manuscrita en tinta negra de Nicole Tischler, sobre una línea horizontal.

*Dr. Octavio Monasterio*  
**Patrocinante Seminario de Título**



### **Comisión de Evaluación**

*Dr. Ricardo Cabrera*  
**Presidente Comisión**

Firma manuscrita en tinta azul de Ricardo Cabrera, sobre una línea horizontal.

*Dr. Alejandro Roth*  
**Evaluador**

Santiago de Chile, Diciembre de 2011



## BIOGRAFÍA

Mi historia comienza en un pequeño pueblo llamado Putú. Mi familia la componen mis padres, Carmen y Roberto, y mis hermanos Carmen y Roberto (Sí!...todos se llaman igual). Un lugar especial también lo ocupa mi wely, así como también mis tíos y primos, con los que formamos una familia pequeña, pero muy especial.

La enseñanza básica la realicé en la Escuela Rural de Putú, donde aprendí muchas cosas de la mano de excelentes profesores. Aquí comencé a descubrir mis talentos y también las cosas para las que no era bueno.

La enseñanza media la realicé en el Liceo de Constitución, donde conocí grandes personas: amigos y amigas con los que compartíamos grandes sueños. Acá también comenzó la búsqueda por encontrar una profesión. Fue una decisión difícil pero finalmente encontré una carrera, que aunque no era una carrera convencional, cumplía con todas las cosas que en ese entonces me parecían importantes.

Así llegué a Santiago a estudiar Bachillerato, donde las ganas de estudiar biotecnología se hicieron más grandes. Ahora, después de 6 años de estudio estoy llegando a la meta. En este camino he conocido a personas muy importantes con las que espero compartir las etapas que vienen.

En el futuro, espero que los sueños que aún quedan por cumplir se hagan realidad y que todos los caminos que escoja me permitan ser feliz.





*"No pierdo el ánimo, porque cada intento fallido que dejo  
atrás, es un nuevo paso adelante"*

**Thomas Alva Edison**

*A mi familia, especialmente a mis padres,  
en agradecimiento a toda la confianza que  
siempre depositaron en mí.*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, especialmente, a mis papás y hermanos por su apoyo, sus críticas y consejos que ayudaron a forjar mi personalidad y mi manera de ver el mundo. Por permitir embarcarme en la aventura de venir a Santiago a estudiar una carrera que ni siquiera era capaz de explicar muy bien en ese entonces y sobre todo porque siempre he sentido su confianza en cada proyecto que he emprendido.

También quiero agradecer a mis amigos que forman parte importante de mi vida. A mis amigos Putuganos: a la Vane, Migue, Javo, Jandy y Patty porque a pesar de que nos separamos, cuando cada uno quiso perseguir sus sueños, sé que son amigos de verdad que estarán conmigo en las buenas y en las malas. A mis amigos que conocí durante la vida universitaria; a la Suazi que fue mi familia en Santiago durante 6 años, con quien compartí muchas cosas: conversaciones profundas, alegrías, penas, carretes....en fin, todo lo que implica la palabra familia. A la Ely, mi partner, una amiga de esas que duran toda la vida y que nunca pensé que iba a conocer en la Universidad; compañera de informes, de noches de estudio, de carretes, de sueños y tantas otras cosas..... Agradecer a todos aquellos que hicieron de mi paso por la Universidad un momento para recordar...a la Lilla, la Chini, al Nacho, la Gaby, la Dess, la Faby, la Lore y a mis nuevas convivientes: la Belens y la Carmenchis por su buena onda y por hacer que la ajetreada vida universitaria fuera más alegre y llevadera.

Por último, quiero agradecer a todos los que formaron parte del laboratorio de Hantavirus de la Fundación Ciencia & Vida durante la realización de esta tesis. A Nicole, mi jefa, por su confianza y por tener las palabras precisas en momentos de desorientación. A todos los pelmazos: a la Margaret, a Rodrigo, a Gonzalo, al Nico, a la Manu y a la Toya porque más que compañeros de trabajo los considero grandes amigos; gracias por los lindos momentos, por las alegrías, los éxitos y sobre todo, por hacer del trabajo de laboratorio un ambiente grato y familiar.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
1. RESUMEN.....	x
2. ABSTRACT .....	xi
3. INTRODUCCIÓN.....	1
3.1 ANTECEDENTES GENERALES DE LOS HANTAVIRUS.....	1
3.2 ESTRUCTURA DE LOS HANTAVIRUS.....	2
3.3 ENTRADA DE LOS HANTAVIRUS A LA CÉLULA.....	3
3.4 FUSIÓN DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS: UN ROL COMPLEMENTARIO ENTRE PROTEÍNAS Y LÍPIDOS.....	5
3.5 REGIONES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN VIRALES.....	11
3.6 REGIONES FUNCIONALES DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN Gc DE LOS HANTAVIRUS .....	15
HIPÓTESIS .....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1 PÉPTIDOS SINTÉTICOS.....	18
4.2 ENSAYO DE FUGA DE ANTS/DPX DESDE LIPOSOMAS .....	19
4.2.1 Preparación de LUVs.....	19
4.2.2 Purificación de LUVs.....	21
4.2.3 Cuantificación de LUVs.....	22
4.2.4 Medición de la formación de poros.....	23
4.3 ENSAYO DE FUSIÓN DE MEMBRANAS .....	24
4.3.1 Preparación de LUVs.....	24
4.3.2 Cuantificación de LUVs.....	25
4.3.3 Medición de la fusión de membranas.....	25
5. RESULTADOS.....	27
5.1 FUGA DE ANTS/DPX PRODUCIDA POR PÉPTIDOS DERIVADOS DE Gc DE ANDV.....	27
5.2 FUSIÓN DE MEMBRANAS PRODUCIDA POR PÉPTIDOS DERIVADOS DE Gc DE ANDV.....	38
6. DISCUSIÓN .....	44
7. CONCLUSIONES.....	52
8. REFERENCIAS.....	53
MATERIAL SUPLEMENTARIO .....	57



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Péptidos que abarcan el péptido de fusión putativo de la proteína Gc de ANDV.....	18
Tabla 2. Péptidos que abarcan la región troncal putativa de la proteína Gc de ANDV.....	18
Tabla 3. Composiciones lipídicas de las LUVs utilizadas en el ensayo de fuga.....	20
Tabla 4. LUVs preparados con cada mezcla lipídica utilizada en el ensayo de fusión.....	25



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de los hantavirus.....	3
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de fusión de membranas producido por proteínas de fusión virales.....	7
<b>Figura 3.</b> Estructura de distintas proteínas de fusión virales.....	9
<b>Figura 4.</b> Determinación de la fluorescencia de ANTS en presencia y ausencia de DPX.....	28
<b>Figura 5.</b> Purificación de LUVs cargados con ANTS/DPX.....	30
<b>Figura 6:</b> Porcentaje de fuga de ANTS/DPX producido por péptidos controles en membranas con distintas composiciones lipídicas.....	32
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de fuga de ANTS/DPX producido por péptidos análogos al péptido de fusión putativo de la proteína Gc de ANDV en membranas con distintas composiciones lipídica.....	33
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de fuga de ANTS/DPX producido por péptidos análogos a la región troncal putativa de la proteína Gc de ANDV en membranas con distintas composiciones lipídicas.....	34
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de fuga de ANTS/DPX producido por Gc-StH2 dependiente de pH y fuerza iónica.....	37
<b>Figura 10.</b> Espectro de emisión de fluorescencia de LUVs marcados con 1% de PE-NBD y 0,25% de PE-Rh.....	39
<b>Figura 11.</b> Espectro de emisión de fluorescencia de LUVs utilizados en los ensayos de fusión.....	40
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de fusión de membranas producido por péptidos controles en membranas con distintas composiciones lipídicas.....	41
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de fusión de membranas producido por péptidos análogos al péptido de fusión putativo de la proteína Gc de ANDV en membranas con distintas composiciones lipídicas.....	42



<b>Figura 14.</b> Porcentaje de fusión de membranas producido por péptidos análogos a la región troncal putativa de la proteína Gc de ANDV en membranas con distintas composiciones lipídicas.....	43
<b>Figura 15.</b> Modelo de formación de poros por péptidos en membranas.....	47
<b>Figura S1.</b> Cuantificación de fosfato inorgánico.....	57
<b>Figura S2.</b> Espectro de fluorescencia de ANTS al incubar distintas concentraciones de LUVs compuestas de PC con Triton X-100.....	58
<b>Figura S3.</b> Dispersión de luz producida por LUVs compuestas de PC.....	59
<b>Figura S4.</b> Cinética de la fuga producida por péptidos derivados de la región troncal putativa de Gc de ANDV.....	60
<b>Figura S5.</b> Espectros de fluorescencia de LUVs marcados con NBD y Rh.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANDV	Virus Andes
ANTS	Ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico
ARN	Ácido ribonucleico
Col	Colesterol
DENV	Virus Dengue
DOBV	Virus Dobrava
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPX	<i>p</i> -xileno-bis-bromuro de piridinio
EBV	Virus Epstein-Barr
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FHSR	Fiebre hemorrágica con síndrome renal
HCV	Virus de la hepatitis C
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HSV	Virus herpes simplex
HTNV	Virus Hantaan
LUV	Vesículas unilamelares grandes
NMR	Resonancia magnética nuclear
PA	Ácido fosfatídico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PE-NBD	N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-1,2-dihexadecanil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
PE-Rh	Lissamine™ rodamina B 1,2-dihexadecanil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
SCPH	Síndrome cardiopulmonar por hantavirus
SEOV	Virus Seoul
SM	Esfingomiélin
SNV	Virus Sin Nombre
TBEV	<i>Tick-borne encephalitis virus</i>
U.A.	Unidades arbitrarias
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VSV	Virus de la estomatitis vesicular

## 1. RESUMEN

El virus Andes (ANDV) pertenece al género *Hantavirus* y está distribuido en Chile y Argentina. Como todos los virus envueltos, los hantavirus entran a la célula a través de la fusión de la membrana viral con una membrana celular. Este proceso es mediado por proteínas de fusión virales ancladas en la envoltura lipídica del virión, que cuentan con regiones funcionales fundamentales en la actividad fusogénica de la proteína. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se determinó que la glicoproteína Gc corresponde a la proteína de fusión y que ésta comparte características estructurales con proteínas de fusión clase II. Además, se logró identificar secuencias que corresponderían al péptido de fusión putativo y a la región troncal putativa de la proteína Gc. Se ha demostrado que péptidos análogos a estas regiones interactúan con membranas, sin embargo el efecto que producen en ellas aún no ha sido determinado. Es por esto que el objetivo de este seminario de título consistió en caracterizar el efecto que producen péptidos que abarcan el péptido de fusión putativo y la región troncal putativa de la proteína Gc de ANDV cuando se unen a membranas. Para esto, utilizando membranas modelo, se desarrolló un ensayo de fuga y un ensayo de fusión con el fin de analizar si ambas regiones desestabilizan membranas biológicas. Se encontró que los péptidos análogos al péptido de fusión putativo no produjeron ningún efecto en membranas, posiblemente debido a que la estructura que estos adquirieron en solución no es representativa de la estructura presente en la proteína silvestre. Por el contrario, el péptido análogo al extremo carboxilo-terminal de la región troncal putativa produjo poros e indujo fusión de membranas, dependiendo de la composición lipídica analizada. Estos resultados indican que el extremo carboxilo-terminal de la región troncal putativa corresponde a una región funcional de Gc de ANDV.

## 2. ABSTRACT

The Andes virus (ANDV) belongs to the *Hantavirus* genus and is distributed in Chile and Argentina. As all enveloped viruses, hantaviruses enter into the cell through fusion of the viral membrane with a cell membrane. This process is mediated by viral fusion proteins that are anchored in the lipid envelope of the virion. These proteins have different functional regions that are essential in their fusogenic activity. Previous studies in our laboratory determined that the Gc glycoprotein of hantaviruses corresponds to the fusion protein and that it shares structural features with class II fusion proteins. Further, sequences were identified that correspond to the putative fusion peptide and the putative stem region of the ANDV Gc. Peptides analogous to these regions interact with membranes, but the effect which these peptides produce in membranes upon binding has not yet been determined. Based on these data, the aim of this work was to characterize the effect produced by peptides spanning the putative fusion peptide and the putative stem region of ANDV Gc when bound to membranes. For this, using model membranes, we developed a leakage assay and a fusion assay to analyze whether both regions destabilize biological membranes. It was found that analogous peptides of the putative fusion peptide of Gc produced no effect in membranes, possibly because the structure that they acquired in solution is not representative to the structure in the wild-type protein. By contrast, the analogous peptide of the carboxy-terminus of the putative stem region induced pores and membrane fusion, depending on the lipid composition analyzed. These results indicate that the carboxy-terminus of the putative stem region is a functional region of ANDV Gc.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Antecedentes generales de los hantavirus

El género *Hantavirus* es uno de los cinco géneros que constituyen la familia *Bunyaviridae*. Esta familia consta de más de 300 virus que infectan plantas, artrópodos, animales y humanos (Jonsson y col, 2010). A diferencia de los virus de otros géneros de esta familia, los hantavirus son portados por roedores y adquiridos por el hombre a través de la inhalación de aerosoles de heces, orina o saliva de roedores infectados (Hart & Bennett, 1999).

Dentro de los hantavirus han sido identificados dos grupos patogénicos: los distribuidos en Europa y Asia y los distribuidos en América. Ambos grupos han sido definidos según la distribución geográfica de los roedores que los portan, además del tipo de enfermedad que producen en humanos. Las enfermedades más severas son la Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (FHRS) que prevalece principalmente en Eurasia y es causada más frecuentemente por los virus Hantaan (HTNV), Seoul (SEOV) y Dobrava (DOBV). Por otra parte, el Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus (SCPH) ha sido descrito como la enfermedad producida en América por hantavirus tales como Sin Nombre (SNV) y Andes (ANDV) (Hussein y col, 2011). Este último es portado por el roedor *Olygorizomys longicaudatus* que se encuentra distribuido principalmente en Argentina y Chile (Padula y col, 2000; López y col, 2002), donde las tasas de mortalidad alcanzan alrededor del 35% (Departamento de Epidemiología, MINSAL Chile, 2011). A diferencia de los otros miembros del género

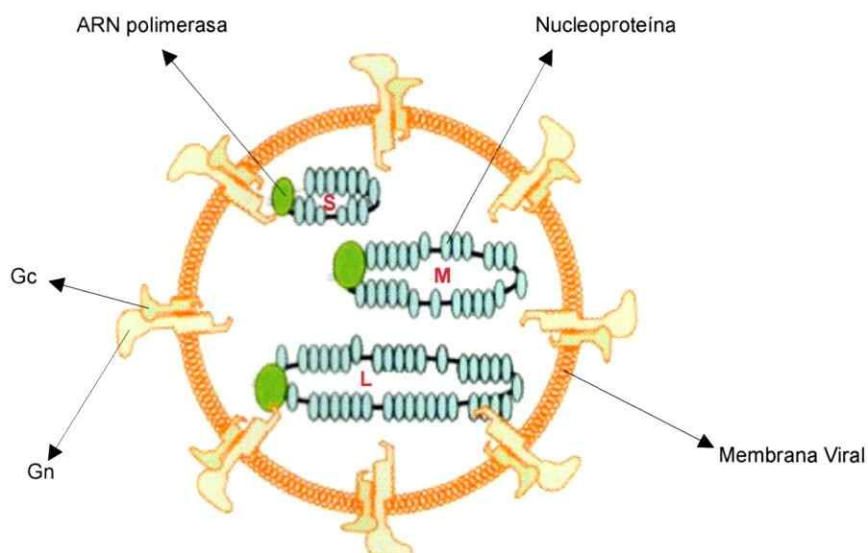
*Hantavirus*, ANDV es el único para el cual existen casos reportados de transmisión horizontal entre humanos (Padula y col, 1998; Wells y col, 1998) además de producir Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus en hámsteres sirios adultos (Hooper y col, 2001), lo que lo convierte en la principal especie para el estudio de la transmisión y patología producida por estos agentes infecciosos.

### 3.2 Estructura de los hantavirus

Los viriones de los miembros pertenecientes al género *Hantavirus* tienen forma esférica con un diámetro aproximado de 80 a 120 nm. Poseen una envoltura lipídica proveniente de la célula hospedera en la cual se ensamblaron mediante un proceso de yemación (Goldsmith y col, 1995), cuya composición será similar a la composición lipídica que tiene el compartimiento membranosos en el cual se produjo este proceso.

En el interior del virión se encuentra el genoma viral que corresponde a ARN trisegmentado de hebra simple con polaridad negativa, el cual codifica al menos cuatro proteínas estructurales. El segmento mayor o L codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN, el segmento menor o S codifica la nucleoproteína N y el segmento mediano o M codifica las glicoproteínas de envoltura Gn y Gc (Elliot, 1990). Cada uno de los segmentos virales está recubierto con múltiples copias de la proteína N formando tres ribonucleocápsides helicoidales que además están asociadas con la ARN polimerasa dependiente de ARN (Obijeski y col, 1976) (ver figura 1). Por otro lado, las glicoproteínas Gn y Gc se encuentran ancladas en la envoltura lipídica en

forma de heteromultímeros que se proyectan sobre la superficie externa del virión (Overby y col, 2008; Huiskonen y col, 2009).



**Figura 1. Estructura de los hantavirus.** Los tres segmentos de ARNv S, M y L, representados en negro, están recubiertos por la nucleoproteína e interaccionan con la ARN polimerasa dependiente de ARN formando ribonucleocápsides helicoidales, las cuales están envueltas por una bicapa lipídica. En esta bicapa se encuentran ancladas las glicoproteínas de superficie Gn y Gc (tomada de Hussein y col, 2011).

### 3.3 Entrada de los hantavirus a la célula

En humanos y roedores, los hantavirus infectan diversos tipos celulares: células endoteliales, células epiteliales, macrófagos, células dendríticas y linfocitos. (Spiropoulou, 2001; Mackow & Gavrillovskaia, 2001; Raftery y col, 2002; Markotic y col,

2007). Esta infección comienza con la unión del virus a la superficie de su célula blanco, proceso en el cual participan receptores celulares y co-receptores que pueden consistir en proteínas, carbohidratos y lípidos (Smith & Helenius, 2004).

Hasta la fecha se han descrito al menos tres distintos receptores celulares que podrían estar mediando el contacto inicial entre los hantavirus y su respectiva célula blanco. Uno de ellos son las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  que han sido señaladas como las responsables de la entrada del virus a células endoteliales y macrófagos (Gavrilovskaya y col, 1998). Además, usando virus inactivados, se ha visto que los hantavirus se unen inicialmente a DAF (Decay-accelerating factor) que es expresado en gran cantidad en la superficie apical de células epiteliales (Krautkrämer & Zeier, 2008). A la vez, existe evidencia que indica que células que poseen suprimido el receptor gC1qR/p32, son poco permisivas a la infección por hantavirus mientras que células no susceptibles presentan altos niveles de unión e infección cuando expresan este receptor de manera recombinante (Choi y col, 2008).

Una vez que el virus se encuentra unido a la superficie celular debe ingresar su material genético al interior de la célula para que comience la replicación de su genoma. En el caso de los virus que poseen una envoltura lipídica, esto se produce a través de la fusión de la membrana viral con una membrana de la célula blanco. Esta fusión puede producirse con la membrana plasmática de la célula o bien con la membrana de algún compartimiento celular interno luego de la endocitosis del virus (Smith & Helenius, 2004). El proceso fusogénico de aquellos virus que se fusionan directamente con la membrana plasmática es generalmente gatillado por la interacción del virus con su receptor a pH neutro, como es el caso del virus de la



inmunodeficiencia humana (VIH), cuya fusión se produce una vez que la glicoproteína gp120 ha interactuado con CD4 y CXCR4 o CCR5 favoreciendo la conformación activa de la proteína gp41 (Gallo y col, 2003). Por otra parte, otros virus requieren de la internalización a través de endocitosis mediada por receptores, los cuales frecuentemente requieren de exposición a medio ácido presente en el interior de organelos de la vía endocítica. Este último es el caso de los hantavirus, que entran a la célula probablemente vía endocitosis mediada por clatrina y donde la fusión es dependiente del pH ácido presente en los compartimientos internos de esta vía (Arikawa y col, 1985; Jin y col, 2002).

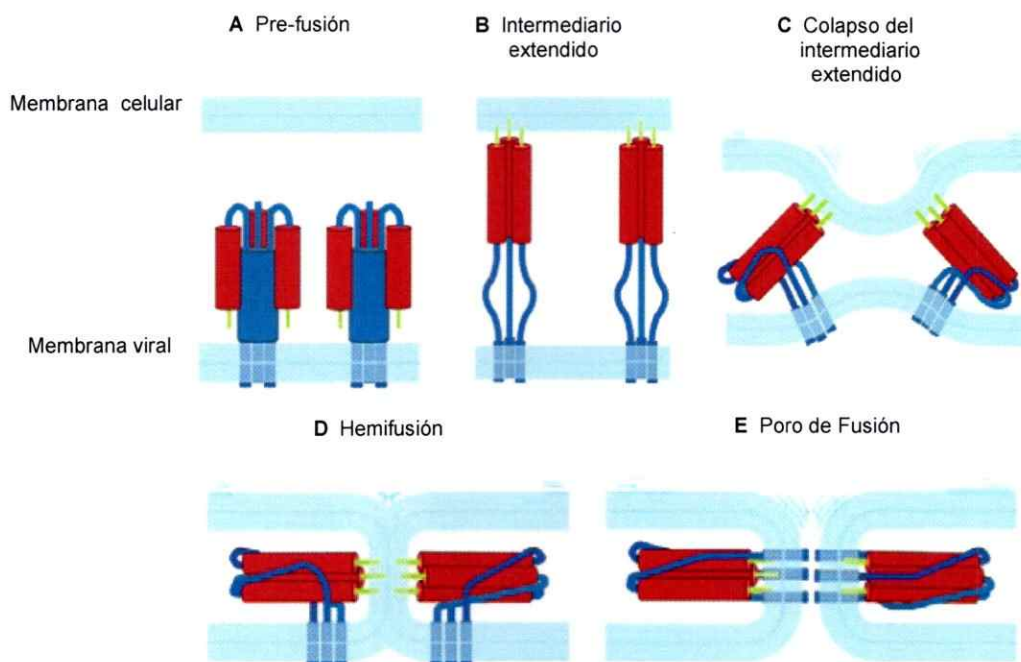
### **3.4 Fusión de membranas biológicas: un rol complementario entre proteínas y lípidos**

La fusión de dos membranas es un evento común en diversos procesos: tráfico intracelular, fertilización, formación de tejidos e infecciones virales (Chernomordik & Kozlov, 2005). En el caso de estas últimas, la fusión es gatillada por glicoproteínas virales que se encuentran ancladas en la superficie del virión a través de una región transmembrana.

A pesar de que hasta la fecha se han descrito tres distintas clases de proteínas de fusión virales, su mecanismo de acción es esencialmente similar, en el cual un factor gatilla cambios conformacionales en la proteína de fusión que resultan en la fusión de las dos bicapas lipídicas (Harrison, 2008). Este proceso es altamente

endergónico, por lo que se ha planteado que las proteínas de fusión virales disminuirían la energía de activación requerida para el inicio del proceso fusogénico utilizando la energía libre que se produce durante el reordenamiento estructural que éstas sufren durante este proceso (Chernomordik y col, 2006; Kielian & Rey, 2005; Harrison, 2008).

El mecanismo de fusión ocurre en al menos cuatro pasos, como se muestra en la figura 2. Inicialmente, se produce un cambio conformacional que permite que una región denominada péptido de fusión, se inserte en la membrana de la célula blanco estableciéndose el primer contacto entre esta membrana y la membrana viral (ver figura 2 B). Luego se produce el colapso del intermediario extendido (ver figura 2 C) durante el cual la proteína comienza a adquirir una conformación tipo horquilla, donde ambas regiones que están insertas en la membrana, es decir el péptido de fusión y la región transmembrana, se orientan hacia el mismo lugar permitiendo el acercamiento de ambas bicapas. Posteriormente, debido a la deformación que se produce en las membranas luego del colapso del intermediario extendido y a la cercanía de ambas, se produce la fusión de las caras externas de las bicapas, sin que exista una mezcla del contenido interno de ambos compartimientos membranosos, estado que lleva por nombre hemifusión (figura 2 D). Finalmente, se produce la fusión de las caras internas de las membranas alcanzando una conformación final estable, en la cual la región transmembrana se encuentra yuxtapuesta con el péptido de fusión (figura 2 E), lo que resulta en la apertura de un poro de fusión, a través del cual las ribonucleocápsides virales ingresarán al citoplasma de la célula blanco iniciándose la replicación viral (Kielian & Rey, 2006; Harrison, 2008).



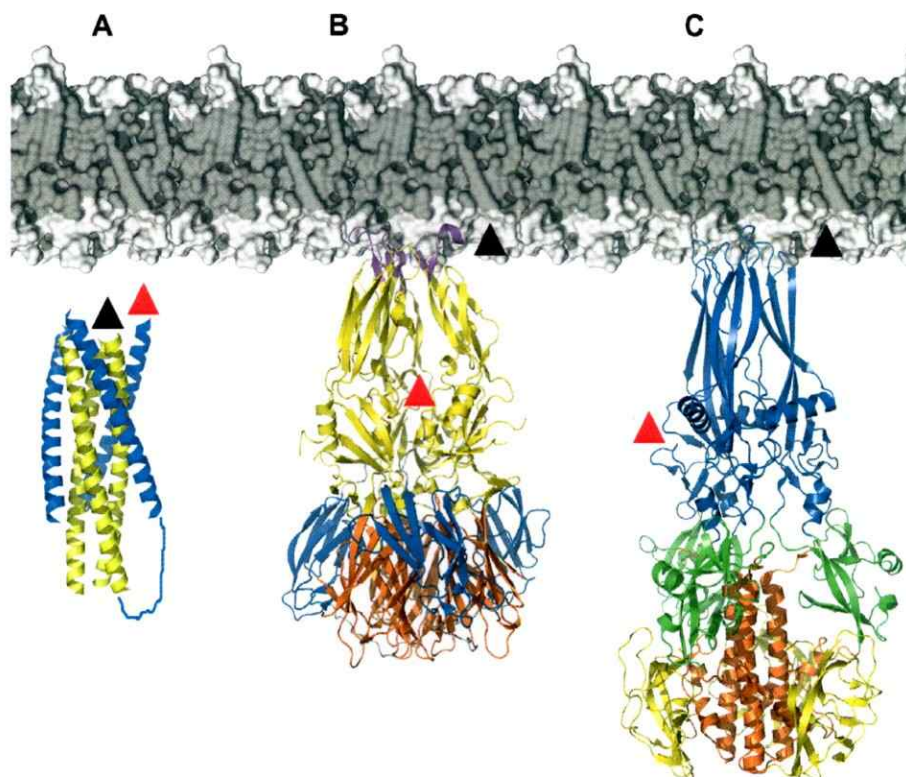
**Figura 2. Mecanismo de fusión de membranas producido por proteínas de fusión virales.**

**A** En el estado pre-fusión, el péptido de fusión (verde) se encuentra en el interior de la proteína. **B** Una vez que la proteína se activa, se produce su reorganización después de la cual el péptido de fusión se insertará en la membrana de la célula blanco. Junto con esto, se produce la trimerización de la proteína. **C** Posteriormente, un segmento carboxilo-terminal de la proteína se pliega en la parte externa del núcleo trimérico produciéndose el colapso del intermediario extendido. **D** Luego que ambas bicapas se ponen en contacto, se produce la fusión de sus caras externas formándose el intermediario de hemifusión. **E** Una vez que el péptido de fusión y la región transmembrana se encuentran insertos en la misma membrana se fusionan las caras internas de ambas bicapas lipídicas, produciéndose la abertura de un poro de fusión. (tomada de Harrison, 2008).

En general, las proteínas de fusión están formadas por un gran ectodominio amino-terminal y un corto endodominio carboxilo-terminal, ambos conectados por una

región transmembrana que ancla la proteína en la membrana viral. De acuerdo a la estructura del ectodominio, las proteínas de fusión virales han sido clasificadas en tres grupos. Las proteínas de fusión clase I están formadas principalmente por hélices  $\alpha$  y una vez que han sido activadas se organizan en un trímero formando una hélice superenrollada (figura 3 A). El péptido de fusión de estas proteínas se ubica en el extremo amino-terminal y posee una estructura helicoidal. Los miembros más caracterizados de este grupo son la hemaglutinina HA2 del virus influenza y gp41 del VIH (Weissenhorn y col, 2007). Por otra parte, las proteínas de fusión clase II están formadas por tres dominios globulares ricos en sábanas  $\beta$ , de los cuales el dominio II contiene el péptido de fusión, que a diferencia de las proteínas de fusión clase I, se encuentra localizado internamente como una horquilla de fusión (figura 3 B). A este grupo pertenecen las proteínas E de los flavivirus y E1 de los alphavirus (Harrison, 2008). Por último, las proteínas de fusión clase III poseen características estructurales de las proteínas de fusión clase I y II. Una vez que son activadas forman un núcleo trimérico de hélices  $\alpha$  y además cada dominio fusogénico expone dos péptidos de fusión que se ubican en el extremo de una sábana  $\beta$  alargada (figura 3 C). Representantes de este grupo son la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) y la proteína gH del virus herpes simplex (HSV) (Weissenhorn y col, 2007).

Junto con el rol que cumplen las proteínas de fusión en el proceso fusogénico, existe evidencia que apoya la idea que también los lípidos serían claves en este proceso modulando tres aspectos fundamentales: la concentración de proteínas en microdominios, la unión de péptidos y/o proteínas a membranas y la morfología de éstas (Teissier & Pécheur, 2007).



**Figura 3. Estructura de distintas proteínas de fusión virales.** Representación en cinta de las distintas clases de proteínas de fusión virales en sus conformaciones post-fusión respecto a su posición en la bicapa lipídica. Esta representación está basada en información cristalográfica de los ectodominios de cada una de ellas. El péptido de fusión está representado como un triángulo negro, mientras que la región transmembrana está representada con un triángulo rojo. **A** Clase I (proteína gp41 del VIH). **B** Clase II (proteína E de los flavivirus). **C** Clase III (Proteína G de VSV). (tomada de Weissenhorn y col, 2007).

En relación al primer aspecto, se ha visto que las balsas lipídicas están estrechamente relacionadas con la entrada de muchos virus a su célula blanco. Para los retrovirus como el VIH, existen opiniones disímiles respecto del rol que éstas podrían estar cumpliendo. Por un lado se ha planteado que estarían involucradas ya

que en ellas se encuentran concentrados los receptores y correceptores que permiten la activación de la glicoproteína de fusión (Yi y col, 2006), sin embargo también se ha planteado que la presencia de receptores y correceptores en balsas lipídicas no es requerida para la fusión (Percherancier y col, 2003) y que la interacción entre la proteína gp120, CD4 y CXCR4 o CCR5 podría producirse en la membrana plasmática fuera de estos microdominios lipídicos (Gaibelet y col, 2006).

Por otro lado, se ha visto que el virus Semliki Forest perteneciente al género *Alphavirus* depende estrictamente de la presencia de colesterol y esfingolípidos en la membrana para que se produzca la fusión, sin embargo esta dependencia no involucraría la presencia de balsas lipídicas. Así, se ha sugerido que el inicio del proceso fusogénico estaría más bien relacionado con una interacción entre la proteína y estos lípidos (Waarts y col, 2002).

Respecto a la morfología de la membrana, existe evidencia experimental que avala que la curvatura presente en ésta también tiene consecuencias directas en el proceso de fusión. Se ha visto que lípidos que modulan la curvatura podrían inducir cambios conformacionales en la estructura secundaria del péptido de fusión (Pécheur y col, 2000) así como también el espacio existente entre las cabezas polares de los lípidos podría facilitar o impedir la inserción de este péptido en las membranas blanco (Pécheur y col, 1999). Además, se ha visto que lípidos con forma de cono, como la fosfatidiletanolamina, generan curvatura negativa en la membrana promoviendo la hemifusión cuando están presentes en la cara externa de la bicapa lipídica, mientras que lípidos con forma de cono invertido, como los lisofosfolípidos, producen curvatura espontánea positiva en la membrana e inhiben la formación del intermediario de

hemifusión cuando están presentes en esta misma monocapa (Chernomordik & Kozlov, 2005).

### **3.5 Regiones funcionales de las proteínas de fusión virales**

Una de las funciones de las proteínas de fusión es disminuir la energía de activación necesaria para que se produzca la fusión de membranas. Una manera de conseguir esto es alterando la arquitectura de la membrana, cambiando la orientación y/o posición de los lípidos presentes en ella (Chernomordik & Kozlov, 2003). Las proteínas de fusión cuentan con distintas regiones que podrían estar involucradas en la deformación de las membranas. Una de ellas es la región transmembrana que además de anclar la glicoproteína a la membrana viral está involucrada en etapas tardías del proceso fusogénico, principalmente en la formación y ensanchamiento del poro de fusión una vez que se ha producido la fusión de las caras internas de la membrana celular y la membrana viral (Schroth-Diez y col, 2000).

Además de ésta, se ha identificado una región altamente conservada que se ubica en el extremo de la proteína de fusión una vez que ésta ha sido activada, denominada péptido de fusión. Este se ancla en la membrana de la célula blanco, estableciendo el primer contacto entre ambos compartimientos membranosos. En términos funcionales, se ha planteado que una vez que el péptido de fusión se inserta en la membrana de la célula blanco promueve curvatura negativa en la monocapa

externa, facilitando la formación del intermediario de hemifusión (Chernomordik & Kozlov, 2005).

En estudios realizados con péptidos sintéticos análogos a los péptidos de fusión de proteínas de fusión clase I, se ha visto que esta región puede desestabilizar membranas, induciendo fusión de liposomas de distintas composiciones lipídicas y en algunos casos produciendo poros en ellos (Wharton y cols, 1988; Nieva y cols, 1994). Mediante NMR se determinó que en la membrana, el péptido de fusión de la proteína HA del virus influenza estaría formado por una hélice amino-terminal, un pliegue y una corta hélice carboxilo-terminal, adquiriendo una forma de boomerang. Ambas hélices tendrían carácter anfipático, con residuos hidrofóbicos grandes hacia el interior de la membrana, mientras que en la superficie tendrían una cadena de glicinas en el brazo amino-terminal y dos residuos ácidos en el brazo carboxilo-terminal (Han y cols, 2001). Por otra parte, estudios basados en mutagénesis de residuos apolares altamente conservados han mostrado la importancia que tiene esta región en la fusión de membranas, puesto que proteínas mutantes pierden la actividad fusogénica observada en la proteína silvestre (Gething y cols, 1986, Horvart & Lamb, 1992, Hernandez & White, 1998).

Por su parte, los péptidos de fusión de proteínas de fusión clase II y III corresponden a secuencias internas del ectodominio de la proteína ricas en residuos aromáticos y apolares (Rey y cols, 1995; Allison y cols, 2001; Roche y cols, 2007). Además se ha visto que contienen residuos de prolina y glicina altamente conservados, lo que sugiere que estos péptidos de fusión internos podrían organizarse como horquillas. A partir de análisis de mutagénesis sitio-dirigida se ha visto que residuos



aromáticos e hidrofóbicos son esenciales en la actividad fusogénica de las proteínas E y E1 de los flavivirus y alphavirus respectivamente (Levy-Mintz & Kielian, 1991; Duffus y cols, 1995; Kielian y cols 1996, Allison y cols, 2001). Resultados similares fueron observados en proteínas de fusión clase III, luego de mutar residuos aromáticos de los péptidos de fusión de las proteínas gB del HSV y Epstein-Barr (EBV) y G del VSV (Hannah y cols, 2007; Backovic y cols, 2007; Sun y cols, 2008); sin embargo, también se ha visto que residuos polares y cargados, como ácido aspártico, ácido glutámico, arginina e histidina son esenciales en la actividad fusogénica de las proteínas gp64 de baculovirus y gB de EBV (Backovic y col, 2007; Kadlec y col, 2008).

Otra región que interactúa con membranas es la región pretransmembrana o región troncal (en el caso de las proteínas de fusión clase II), que comunica el ectodominio con el dominio transmembrana. A partir de diversos estudios llevados a cabo principalmente con proteínas de fusión clase I y III, a esta región también se le ha atribuido un rol en la desestabilización de membranas (Lorizate y col, 2008). Mediante mutagénesis, se ha visto que la delección de la región pretransmembrana de la proteína gp41 del VIH, así como también la sustitución por alanina de sus residuos de triptófano conservados, eliminó la entrada viral y la funcionalidad de esta proteína sin afectar su maduración, transporte y unión a CD4 (Salzwedel y col, 1999). Por su parte, sólo la delección de la región pretransmebrana de la proteína G del VSV y no la sustitución de sus residuos aromáticos conservados como triptófano y fenilalanina alteraron la actividad fusogénica de la proteína (Jeetendra y col, 2003). Junto con esto, se ha visto que esta región sería necesaria en el ensamblaje de nuevos viriones, posiblemente debido a que promueve la liberación de los virus desestabilizando la membrana en los sitios de yemación (Robison & Whitt, 2000). Estructuralmente, las regiones

pretransmembrana de las proteínas de fusión clase I y III están formadas por hélices  $\alpha$  de carácter anfipático que tienden a localizarse en la interfase membrana-agua (Lorizate y col, 2008). Sin embargo, la función de esta región en el proceso fusogénico no se ve alterado si se introducen mutaciones que afectan la conformación helicoidal, al menos en proteínas de fusión clase I (Salzwedel y col, 1999).

Respecto a la región troncal de proteínas de fusión clase II, se ha visto que su estructura es diferente en los principales representantes de esta clase. En términos de longitud, la región troncal de los flavivirus está formada por alrededor de 50 residuos, mientras que la región troncal de los alphavirus posee aproximadamente 30 residuos. Estudios de crio-microscopía electrónica realizados con la proteína E del virus dengue (DENV) indican que esta región estaría formada por dos hélices  $\alpha$  unidas por una vuelta, de las cuales una (con carácter anfipático) estaría acostada sobre la monocapa externa de la membrana viral (Zhang y col, 2003). En términos funcionales, se ha planteado que la región troncal de los flavivirus podría facilitar la trimerización del ectodominio de la proteína de fusión (Allison y col, 1999) así como también conferirle mayor estabilidad (Stiasny y col, 2005). Por su parte, mutaciones introducidas en residuos conservados de la región troncal de la proteína E1 del alphavirus Semliki Forest no alteraron su actividad fusogénica, siendo sólo necesario un largo mínimo para mantener su funcionalidad. Sin embargo, el ensamblaje y yemación de nuevos viriones sí se vio alterado por las mutaciones de residuos específicos y deleciones introducidas en la proteína, debido probablemente a la disminución en la estabilidad del heterodímero E1-E2 que presentaron los mutantes (Liao & Kielian, 2006). Junto con esto, estudios realizados con la región troncal de la proteína E1 del virus de la hepatitis

C (HCV), perteneciente al género *Hepacivirus*, muestran que esta región desestabiliza membranas (Pérez-Berná y col, 2008).

### 3.6 Regiones funcionales de la proteína de fusión Gc de los hantavirus

En el caso de los hantavirus, estudios realizados en nuestro laboratorio han evidenciado que la proteína de fusión corresponde a la glicoproteína Gc y que ésta comparte mayoritariamente características estructurales con las proteínas de fusión clase II (Tischler y col, 2005). Mediante análisis *in silico* así como también ensayos *in vitro* de unión de péptidos a liposomas, se encontró una secuencia que podría corresponder al péptido de fusión de los hantavirus (Tischler y col, 2005). Recientemente, se logró corroborar esta información a través de mutaciones sitio-dirigidas del péptido de fusión putativo, que permitió la identificación de residuos esenciales en el proceso de fusión de membranas (Cifuentes y col, 2011).

Por otra parte, a través de análisis *in silico* se logró predecir la región troncal de la proteína Gc de ANDV. Estudios *in vitro* de dicroísmo circular de péptidos análogos a esta región indican que estaría formada por dos hélices  $\alpha$ , una amino- y una carboxilo-terminal unidas por una vuelta. Junto con esto se vio que la hélice carboxilo-terminal tendría la característica de ser anfipática (datos no publicados). Además se determinó que péptidos que abarcan la región troncal completa así como también cada una de sus hélices interactúan con membranas artificiales (datos no publicados), sin embargo la funcionalidad de esta región aún no ha sido estudiada. Es

por esto que en el presente trabajo se caracterizó el efecto que producen péptidos que abarcan el péptido de fusión putativo y la región troncal putativa de la proteína Gc del virus Andes cuando se unen a membranas.

En base a todo lo anteriormente expuesto, postulamos que tanto el péptido de fusión putativo como la región troncal putativa de la proteína Gc de ANDV desestabilizan membranas, siendo el primero de ellos responsable de la desestabilización de la membrana celular dada su inserción en esta membrana luego de la activación de la proteína de fusión, mientras que la región troncal estaría involucrada en la desestabilización de la membrana viral, debido a la ubicación que esta región tiene en la superficie del virión, disminuyendo la energía requerida para gatillar el proceso de fusión entre ambas membranas.

## HIPÓTESIS

Péptidos derivados de la proteína Gc de ANDV, que abarcan el péptido de fusión putativo y que abarcan la región troncal putativa, desestabilizan membranas.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto que producen péptidos derivados de la proteína Gc de ANDV, que abarcan el péptido de fusión putativo y que abarcan la región troncal putativa, al unirse a membranas modelo (liposomas).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

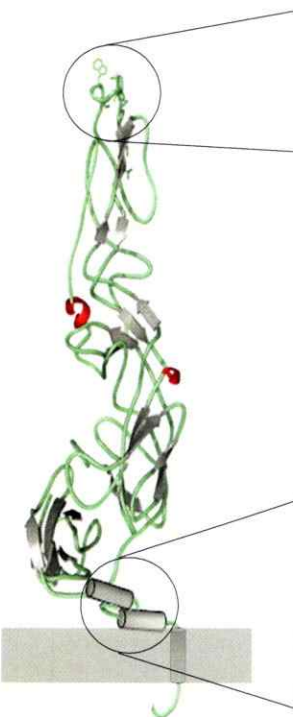
- Determinar si péptidos que abarcan el péptido de fusión putativo y que abarcan la región troncal putativa de la proteína Gc de ANDV desestabilizan membranas con distintas composiciones lipídicas, produciendo poros al unirse a éstas.
- Determinar si péptidos que abarcan el péptido de fusión putativo y que abarcan la región troncal putativa de la proteína Gc de ANDV inducen fusión de membranas con distintas composiciones lipídicas.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Péptidos sintéticos

Se compraron péptidos que representan ambas regiones putativas analizadas en este trabajo, a partir del modelo molecular de la proteína Gc de ANDV que se muestra a continuación (Tischler y col, 2005). Los péptidos que abarcan el péptido de fusión putativo de Gc se muestran en la Tabla 1 y los péptidos que abarcan la región troncal putativa de Gc se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Péptidos que abarcan el péptido de fusión putativo de la proteína Gc de ANDV (GenScript).



Péptido	Secuencia
Gc-FP_S	SKSFFEKDYQYETGWG <u>S</u> NP <u>G</u> D <u>S</u> PGVGT <u>G</u> S <u>T</u>
Gc-FPshort_S	YQYETGWG <u>S</u> NP <u>G</u> D <u>S</u> P

\* Los residuos de cisteína fueron sustituidos por serina (S) para evitar la formación de puentes disulfuro.

**Tabla 2.** Péptidos que abarcan la región troncal putativa de la proteína Gc de ANDV (New England Peptide).

Péptido	Secuencia
Gc-St	HLERVTGFNQIDSDKVYDDGAPPCTFKCWFTKSGEWLLGILNGN
GcSt-H1	HLERVTGFNQIDSDKVY
GcSt-H2	TFKCWFTKSGEWLLGILNGN

Además, como control negativo se sintetizó el péptido N1: QLV<sub>T</sub>ARQKLKDAEKAVEVDPDDV<sub>N</sub>KSTLQRRRAVSTLET<sub>K</sub>LG correspondiente a una región amino-terminal de la nucleoproteína de ANDV y por último, como control positivo, se sintetizó el péptido HIV\_FP: AVGIGALFLGFLGAAGSTM<sub>G</sub>ARS (GenScript) que representa al péptido de fusión de la proteína gp41 del VIH (Nieva y col, 1994).

Todos los péptidos utilizados contenían un grado de pureza superior al 85%, que fue analizado mediante HPLC por parte del fabricante (GenScript, New England Peptide).

## 4.2 Ensayo de fuga de ANTS/DPX desde liposomas

La formación de poros en membranas fue medida utilizando una modificación del ensayo de fuga desarrollado por Ellens y col (1985). Este ensayo está basado en el aumento de la intensidad de fluorescencia que se produce al diluirse el fluoróforo ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico (ANTS) y el apagador *p*-xileno-bis-bromuro de piridinio (DPX) al salir desde el interior de liposomas.

### 4.2.1 Preparación de LUVs

Se prepararon vesículas unilamelares grandes (*Large Unilamellar Vesicles*, LUVs) de acuerdo al protocolo de extrusión desarrollado por Hope y col (1985). Para

este ensayo se realizaron cinco mezclas lipídicas cuya composición se describe en la Tabla 3. Cada una de estas mezclas fue generada en cloroformo y en un ambiente de nitrógeno para evitar la oxidación de los lípidos. Estos últimos fueron obtenidos de Avanti Polar Lipids, Inc (EE.UU.)

**Tabla 3.** Composiciones lipídicas de las LUVs utilizadas en el ensayo de fuga.

Mezcla Lipídica	Composición
PC	Fosfatidilcolina
PC:PE:SM:col	Fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélna y colesterol en una relación molar 1:1:1:1,5
PC:col	Fosfatidilcolina y colesterol en una relación molar 3:1,5
PC:PG	Fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol en una relación molar 4:1
PC:PA	Fosfatidilcolina y ácido fosfatídico en una relación molar 4:1

Una vez que el cloroformo se evaporó completamente, la mezcla lipídica fue hidratada con amortiguador HNE de hidratación (20 mM Hepes, 50 mM NaCl y 0,1 mM EDTA; pH 7,4) que además contenía el fluoróforo ANTS (Molecular Probes, Invitrogen) a una concentración de 12,5 mM y el apagador DPX (Molecular Probes, Invitrogen) a una concentración de 45 mM. La hidratación fue llevada a cabo durante 1 hora con agitación intermitente a 45°C, después de la cual se realizaron 10 ciclos de congelado/descongelado. Por último, para obtener vesículas unilamelares grandes de tamaño homogéneo, estas fueron pasadas a través de una membrana de nitrocelulosa de 200 nm utilizando un extrusor (Mini-Extruder, Avanti Polar Lipids, Inc). Este proceso



fue llevado a cabo a 55°C, para estar sobre la temperatura de transición de fase de la mezcla de lípidos utilizados.

#### 4.2.2 Purificación de LUVs

Para eliminar la mezcla de fluoróforo y apagador que se encuentra en el exterior de las LUVs, se realizó una filtración en gel utilizando una resina de sephadex (Sephadex G-50 Fine, GE Healthcare Life Sciences), que fue eluída con amortiguador HNE de elusión (10 mM Hepes, 130 mM NaCl y 0,1 mM EDTA; pH 7,4). Previamente, y para identificar en qué fracciones de la columna se encontraban las LUVs, estas fueron marcadas con el fluoróforo 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) (Molecular Probes, Invitrogen) que interactúa con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, emitiendo fluorescencia sólo cuando se encuentra en un ambiente apolar. El proceso de marcaje fue realizado durante 1 hora a 55°C y la relación molar utilizada fue 1:30 fluoróforo:lípidos. Posteriormente se cargó en la columna 300 µL de la suspensión de vesículas y se colectaron 20 fracciones de 500 µl cada una.

Para determinar dónde se encontraban las LUVs, se agregaron 200 µl de cada fracción en una placa negra de 96 pocillos (Nunc, Nunc) y se midió en un lector de fluorescencia (Synergy4, BioTek) la intensidad de fluorescencia de DPH excitando la muestra con una longitud de onda 350 nm y detectando emisión a una longitud de onda de 430 nm. Además, se midió la fluorescencia de ANTS para descartar la presencia de este fluoróforo en la fracción donde se encontraban las LUVs, utilizando

como longitud de onda de excitación 355 nm y como longitud de onda de emisión 520 nm. Para corroborar la presencia de ANTS/DPX en el interior de las LUVs, se agregó Triton X-100 al 0,5% (v/v) (Sigma) a cada una de las fracciones, y luego de 1 minuto se midió nuevamente la fluorescencia de ANTS.

#### 4.2.3 Cuantificación de LUVs

La concentración de las LUVs fue determinada mediante un ensayo de cuantificación de fosfato inorgánico desarrollado por Bruce N. Ames (1966).

En primer lugar, se realizó una curva de calibración de fosfato a partir de una solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de concentración conocida. Para realizar la cuantificación, se prepararon las muestras agregando 70  $\mu\text{l}$  de cada mezcla lipídica y 230  $\mu\text{l}$  de agua destilada. A 300  $\mu\text{l}$  de cada dilución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y a las muestras de LUVs de concentración desconocida, se les agregó 700  $\mu\text{l}$  de una mezcla compuesta por 1 parte de ácido ascórbico al 10% (p/v) (Sigma) y 6 partes de molibdato de amonio al 0,42% (p/v) (Sigma) en 1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Posteriormente, las muestras fueron incubadas durante 20 minutos a 45°C y luego se midió la absorbancia a 820 nm en un espectrofotómetro (BioSpec-1601, Shimadzu) utilizando cubetas plásticas.

#### 4.2.4 Medición de la formación de poros.

Se incubó 1  $\mu\text{M}$  (5  $\mu\text{l}$ ) de cada mezcla lipídica con concentraciones crecientes de cada uno de los péptidos descritos en la sección 4.1 desde 10 nM hasta 10  $\mu\text{M}$  en una placa negra de 96 pocillos (Nunc, Nunc). En el caso de los péptidos Gc-FP\_S, Gc-FP short\_S, Gc-StH1, Gc-St y N1, la incubación se realizó en amortiguador HNE de elusión, mientras que para Gc-StH2 se realizó en amortiguador borato 10 mM a pH 9, por razones de solubilidad del péptido. Todo este proceso fue llevado a cabo agitando la placa constantemente y a 25°C.

Luego de dos horas de incubación, la intensidad de fluorescencia fue medida en el lector de fluorescencia (Synergy4, BioTeK) utilizando las mismas longitudes de onda de excitación y emisión que en el paso de purificación. Se usó dicho tiempo de incubación puesto que corresponde al tiempo mínimo necesario para que la fuga de ANTS/DPX alcance el equilibrio. El 0% de fuga corresponde a la intensidad de fluorescencia de las LUVs en los respectivos amortiguadores, mientras que el 100% corresponde a la intensidad de fluorescencia producida al agregar Triton X-100 al 0,5% (v/v). La fórmula utilizada para normalizar los resultados en términos de porcentaje de fuga fue la siguiente:

$$\% \text{ de Fuga} = \left( \frac{F_p - F_0}{F_{100} - F_0} \right) \cdot 100$$

donde  $F_p$  corresponde a la intensidad de fluorescencia posterior a la incubación de las LUVs con los respectivos péptidos,  $F_0$  corresponde a la intensidad de fluorescencia de

las LUVs en los distintos tampones y por último  $F_{100}$  corresponde a la intensidad de fluorescencia luego de agregar Triton X-100.

### **4.3 Ensayo de fusión de membranas**

La fusión de membranas fue determinada utilizando una modificación del ensayo desarrollado por Struck y col (1981). Este ensayo está basado en la disminución de la transferencia de energía de resonancia (FRET) entre dos fluoróforos situados en un liposoma (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il (NBD) y rodamina B (Rh)) una vez que se fusionan con liposomas que no poseen sondas fluorescentes.

#### **4.3.1 Preparación de LUVs**

Se prepararon vesículas unilamelares grandes de las mismas características a las utilizadas en el ensayo de fuga (ver sección 4.2.1). Para estos experimentos, se prepararon vesículas con dos composiciones lipídicas: LUVs compuestas de fosfatidilcolina (PC) y LUVs compuestas de fosfatidilcolina y fosfatidilglicerol en una relación molar 4:1 (PC:PG). Con cada mezcla lipídica se prepararon LUVs marcados y sin marcar tal como se describe en la Tabla 4.

**Tabla 4.** LUVs preparados con cada mezcla lipídica utilizada en el ensayo de fusión.

LUVs	Fluoróforos
Sin marcar	—
Marcados 1	1% PE-NBD y 0,25% PE-Rh
Marcados 2*	0,1% PE-NBD y 0,025% PE-Rh

\* Este marcaje fue utilizado para establecer los valores correspondientes al 100% de fusión.

La fosfatidiletanolamina (PE) acoplada a los fluoróforos NBD y Rh fue obtenida de Molecular Probes (Invitrogen).

#### 4.3.2 Cuantificación de LUVs

La cuantificación de las LUVs fue realizada de la misma manera como se mencionó anteriormente (ver sección 4.2.3). Para la preparación de las muestras, se tomaron 20  $\mu$ l de cada población lipídica y 280  $\mu$ l de agua destilada.

#### 4.3.3 Medición de la fusión de membranas

Una mezcla de LUVs marcados y sin marcar en una relación 1:9, fue incubada con cada uno de los péptidos descritos en la sección 4.1. La concentración final de la mezcla de LUVs fue 1  $\mu$ M y la incubación fue realizada durante 1 hora a 25 °C con

agitación constante. Los tampones utilizados (amortiguador HNE de elusión y amortiguador borato 10 mM pH 9) además contenían 5 mM de  $\text{CaCl}_2$ .

La disminución de la transferencia de energía de resonancia entre ambos fluoróforos fue medida en un lector de fluorescencia (Synergy4, BioTek) a través del aumento de la intensidad de fluorescencia del dador de energía (NBD) usando 460 y 540 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente ( $F_p$ ). El 0% de fusión corresponde a la intensidad de fluorescencia de la mezcla de LUVs marcados y sin marcar en los respectivos tampones ( $F_0$ ), mientras que el 100% corresponde a la intensidad de fluorescencia de la población que contiene PE-NBD y PE-Rh al 0,1% y 0,025% molar respectivamente, a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  ( $F_{100}$ ).

La fórmula utilizada para normalizar los resultados en términos de porcentaje de fusión fue la siguiente:

$$\% \text{ de Fusión} = \left( \frac{F_p - F_0}{F_{100} - F_0} \right) \cdot 100$$

## 5. RESULTADOS

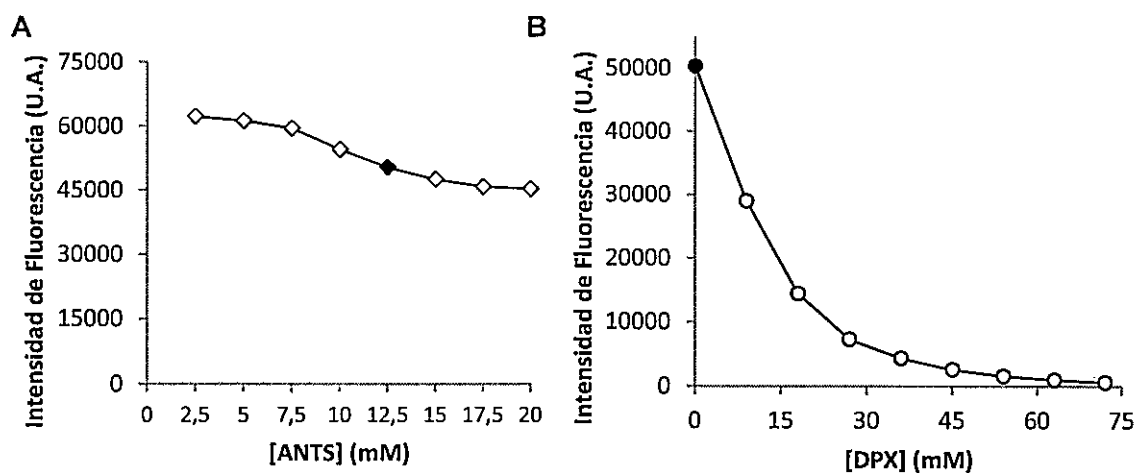
### 5.1 Fuga de ANTS/DPX producida por péptidos derivados de Gc de ANDV.

Para analizar el efecto que producen los péptidos sintéticos propuestos en este trabajo (ver sección 4.1) se determinó su capacidad de formación de poros en membranas modelo, a través de la medición de la fuga de ANTS/DPX desde LUVs.

Se probaron mezclas de lípidos con distintas características:

- LUVs compuestos de PC, puesto que este fosfolípido es el más abundante en las membranas biológicas.
- LUVs con carga neta negativa compuestas de PC:PG y PC:PA, ya que estudios previos indican que tanto el péptido de fusión de la proteína gp41 del VIH como la región troncal de la proteína E1 del HCV tienen mayor afinidad por este tipo de membranas (Nieva y cols, 1994; Pérez-Berná y col, 2008).
- LUVs con esfingolípidos (particularmente SM) y colesterol puesto que esta descrito que ambos son fundamentales en el proceso de fusión de los flavivirus y alphavirus (Waarts y col, 2002). Además se ha reportado que la región pretransmembrana (o troncal) de la proteína gp41 del VIH produce poros líticos en membranas con alto contenido de PC, SM y colesterol (Sáez-Ciri3n y col, 2002).

Para determinar las concentraciones finales de trabajo de ANTS y DPX, se midió la fluorescencia de ANTS en un amplio rango de concentraciones y además en presencia de DPX. Como se muestra en la figura 4 A, ANTS produjo una alta intensidad de fluorescencia en un amplio rango de concentraciones. La concentración escogida fue 12,5 mM, que corresponde a una concentración intermedia entre el máximo de emisión y el máximo de autoapagamiento observado. En base a esta concentración, se determinó la concentración de DPX a través de la medición del apagamiento de la fluorescencia de ANTS (figura 4 B). La concentración escogida fue 45 mM ya que es una concentración suficiente para apagar gran parte de la fluorescencia de ANTS. De esta manera se espera observar el incremento de la intensidad de fluorescencia de ANTS una vez que se produzca su dilución y la del apagador, cuando ambos salgan desde el interior de las LUVs. Ambas concentraciones utilizadas coinciden con los datos disponibles en la literatura.

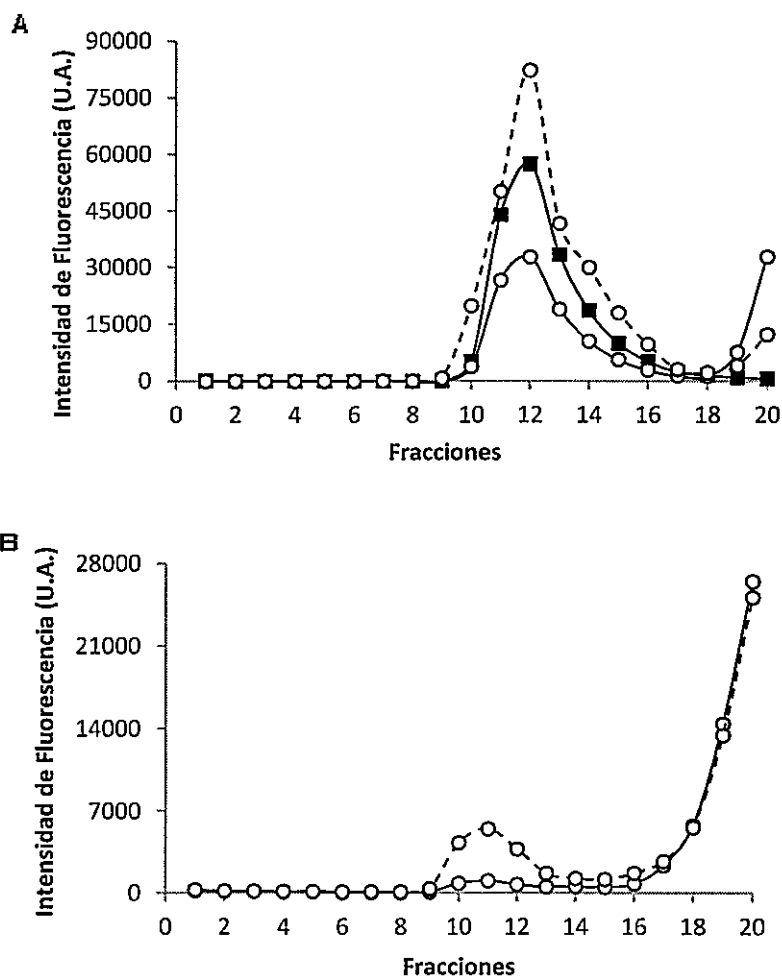


**Figura 4. Determinación de la fluorescencia de ANTS en presencia y ausencia de DPX.** En A se muestra la intensidad de fluorescencia de ANTS a distintas concentraciones. B corresponde a la fluorescencia de ANTS a una concentración de 12,5 mM en presencia de distintas concentraciones de DPX. El símbolo negro en A y B corresponde a la misma medición.



Una vez que el fluoróforo y el apagador fueron incorporados en el interior de LUVs se realizó una purificación mediante filtración en gel, para eliminar moléculas no incorporadas en su interior. Luego de la purificación, se determinó en qué fracciones se encontraban las LUVs a través de la medición de la fluorescencia de DPH. Para corroborar la presencia de ANTS y DPX en el interior de éstas, se midió la fluorescencia de ANTS antes y después de incubar las vesículas con Triton X-100. Como se observa en la figura 5 A, las LUVs aparecen a partir de la fracción número 11, mientras que el fluoróforo libre comienza a aparecer a partir de la fracción número 20. Junto con esto, en las fracciones donde se localizan las LUVs se puede observar un incremento de la intensidad de fluorescencia de ANTS, sólo después de agregar Triton X-100, confirmando la incorporación del fluoróforo y el apagador en su interior. Sin embargo, debido al solapamiento de los espectros de excitación de los fluoróforos DPH y ANTS se produce una alteración de la intensidad de fluorescencia de este último (comparar intensidades de fluorescencia de ANTS en las figuras 5 A y B), por lo cual se decidió no marcar las LUVs con DPH ya que la medición de la fluorescencia de ANTS es suficiente para determinar las fracciones en las cuales se encuentran las LUVs que poseen incorporados tanto el fluoróforo como el apagador (figura 5 B) .

Se juntaron las tres fracciones que contenían las mayores intensidades de fluorescencia de ANTS para la realización de los ensayos posteriores. A esta muestra se le determinó la concentración final de lípidos mediante un método de cuantificación de fosfato inorgánico (ver figura S1). Las concentraciones de las mezclas lipídicas van desde 75  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ .



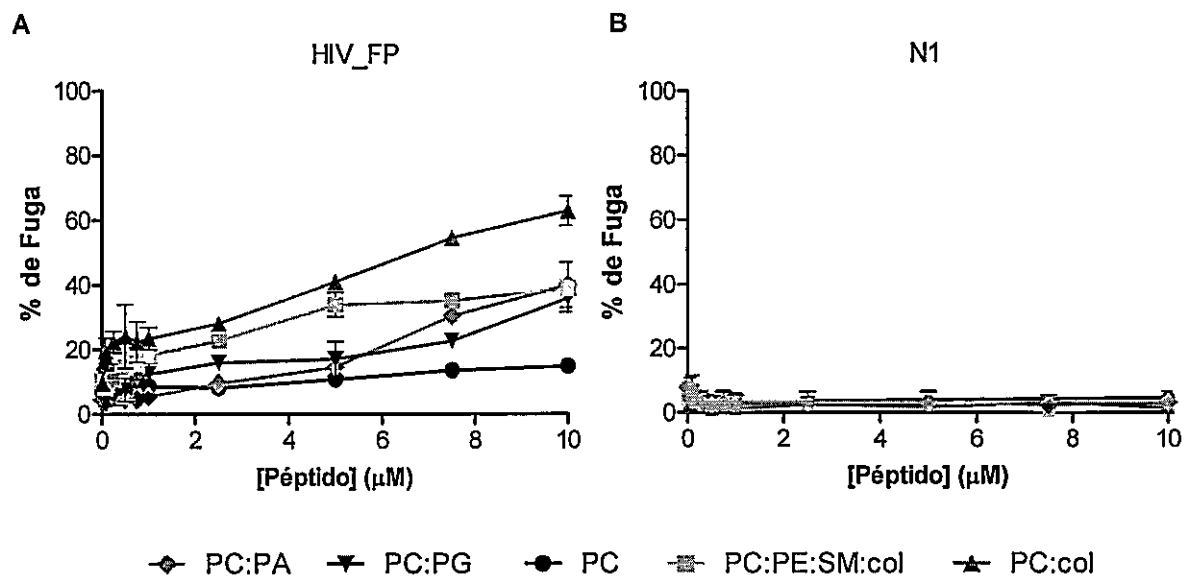
**Figura 5. Purificación de LUVs cargados con ANTS/DPX.** La mezcla de ANTS/DPX no incorporada en el interior de LUVs compuestos de PC fue removida a través de una filtración en gel usando la resina Sephadex G-50 Fine. En **A** se muestra la purificación de LUVs marcadas con DPH, mientras que **B** corresponde a la purificación de vesículas sin marcar. (■) representa la fluorescencia de DPH, que indica la presencia de las LUVs. (○) representa la fluorescencia de ANTS, antes (línea continua) y después (línea discontinua) de agregar Triton X-100 a cada fracción. La mayor intensidad de fluorescencia de ANTS en A, se debe a que al estar solapados los espectros de excitación de los fluoróforos DPH y ANTS, la intensidad de fluorescencia que se está observando corresponde a la de ambos fluoróforos.

La concentración de LUVs óptima para la realización del ensayo fue determinada de dos maneras: en primer lugar se realizó un espectro de emisión de las LUVs a distintas concentraciones, en presencia de Triton X-100. Como se muestra en la figura S2, el aumento en la intensidad de fluorescencia de ANTS puede ser observado a partir de una concentración de lípidos de 0,1  $\mu\text{M}$ . En segundo lugar, y con el fin de evitar la dispersión de luz, se midió la absorbancia a 350 nm de las mismas muestras de liposomas. A partir de esto, se escogió la concentración 1  $\mu\text{M}$  puesto que permite visualizar el aumento de ANTS/DPX una vez que se produce un poro en la membrana y además porque es la mayor concentración de lípidos que posee una absorbancia menor a 0,1, que corresponde al valor límite para que no se produzca dispersión de luz (ver figura S3).

Una vez establecido el ensayo, se determinó la cinética de la fuga de ANTS/DPX desde el interior de LUVs compuestos de PC. Como se ve en la figura S4, no fue posible observar el inicio de este proceso debido a la velocidad a la que se produce, ya que la primera medición realizada, luego de un minuto de incubación, corresponde a aproximadamente un tercio de la fuga producida por el péptido Gc-StH2. Por esto, se determinó el porcentaje de fuga que produce cada péptido una vez que la liberación del contenido interno alcanzó un nivel máximo.

En la figura 6 se muestra el porcentaje de fuga producido por los péptidos controles. En A se observa la fuga producida por el péptido de fusión de la proteína gp41 del VIH (HIV\_FP), que corresponde al control positivo. Como era de esperarse, el péptido HIV\_FP produce mayor fuga cuando las vesículas contienen lípidos cargados negativamente (PG y PA), alcanzando alrededor de un 40% comparado con el 15%

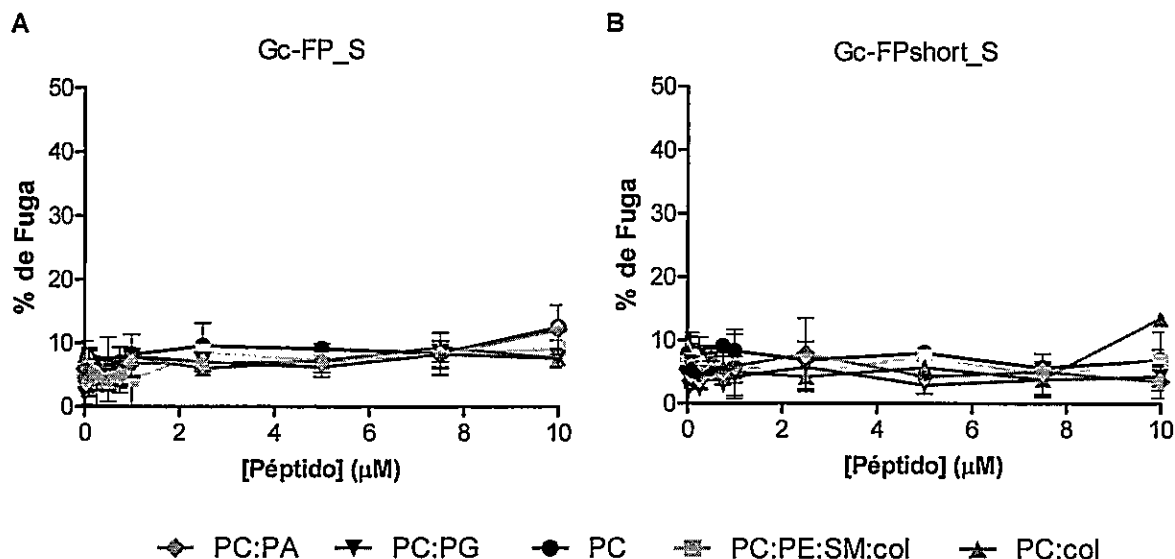
que se observa con LUVs que sólo contienen PC. Por su parte, el péptido control negativo N1 correspondiente a un segmento de la nucleoproteína de los hantavirus, no produjo fuga en ninguna de las mezclas lipídicas analizadas (figura 6 B).



**Figura 6. Porcentaje de fuga de ANTS/DPX producido por péptidos controles en membranas con distintas composiciones lipídicas.** En A se muestra el porcentaje de fuga producido por el péptido HIV\_FP utilizado como control positivo, mientras que B muestra el porcentaje de fuga producido por el péptido N1 utilizado como control negativo. (●) PC, (◆) PC:PA en una relación molar 4:1, (▼) PC:PG en una relación molar 4:1, (□) PC:PE:SM:col en una relación molar 1:1:1:1,5 y (▲) PC:col en una relación molar 3:1,5.

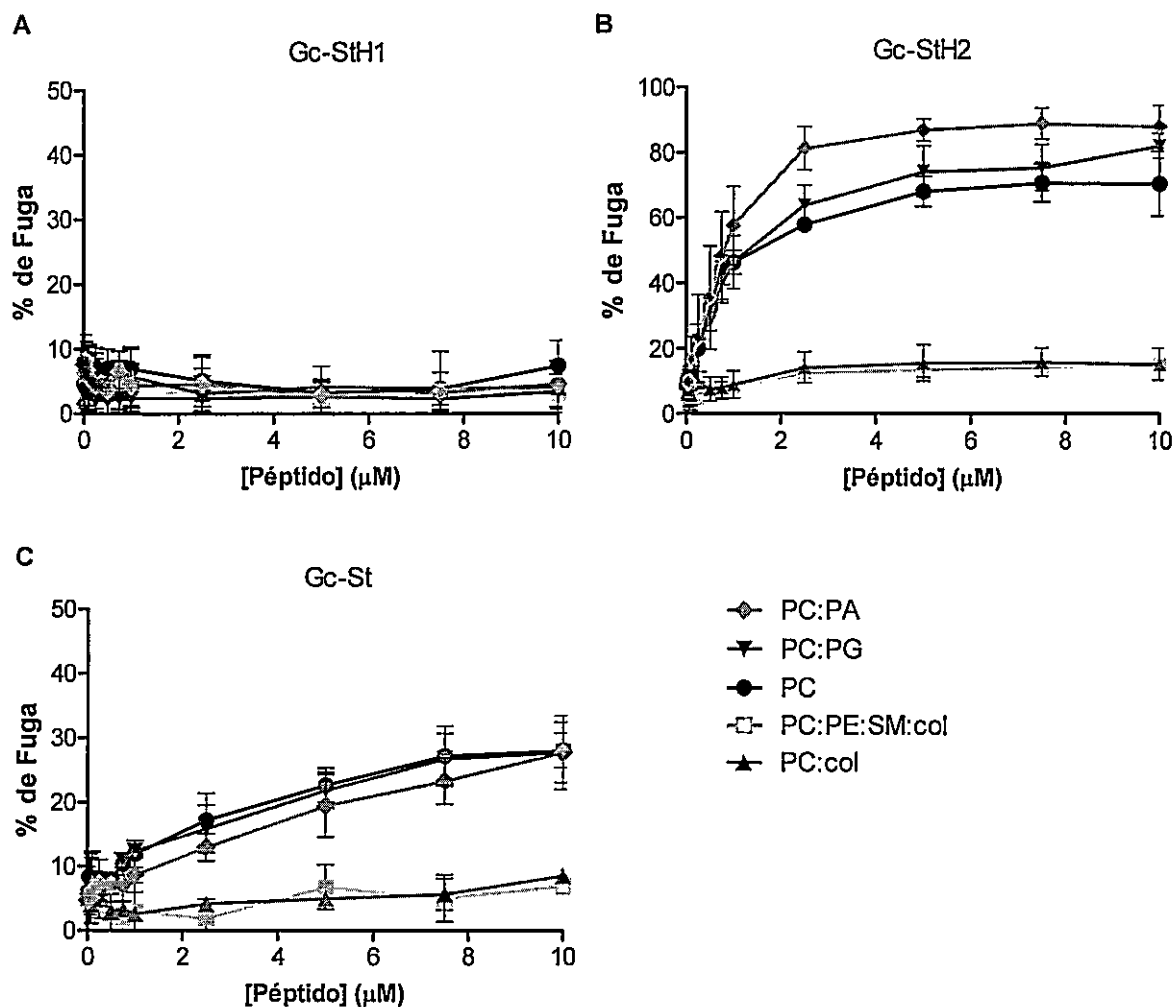
En lo que respecta a los péptidos análogos al péptido de fusión putativo de la proteína Gc de ANDV, tanto Gc-FP\_S como Gc-FP short\_S no produjeron ningún efecto en la membrana de cada una de las mezclas lipídicas analizadas; es más, aún cuando se observa un porcentaje de fuga levemente superior al alcanzado por el péptido N1, en ambos casos este no corresponde a un efecto dependiente de la dosis,

sino que más bien corresponde a un ruido basal producido por cada una de las concentraciones de péptido utilizadas (figura 7).



**Figura 7.** Porcentaje de fuga de ANTS/DPX producido por péptidos análogos al péptido de fusión putativo de la proteína Gc de ANDV en membranas con distintas composiciones lipídicas. En A se muestra el efecto producido por el péptido Gc-FP\_S, mientras que B corresponde al efecto producido por el péptido Gc-FP short\_S. (●) PC, (◆) PC:PA en una relación molar 4:1, (▼) PC:PG en una relación molar 4:1, (■) PC:PE:SM:col en una relación molar 1:1:1:1,5 y (▲) PC:col en una relación molar 3:1,5.

Por otra parte, en la figura 8 se muestra el efecto que producen los péptidos que abarcan la región troncal de la proteína Gc. En A se puede ver que el péptido correspondiente al extremo amino-terminal de esta región (Gc-StH1) no produce fuga del contenido interno de ninguno de los tipos de liposomas analizados, comportándose como el control negativo (péptido N1). En lo que respecta al péptido Gc-StH2, que representa el extremo carboxilo-terminal de la región troncal, se puede observar que



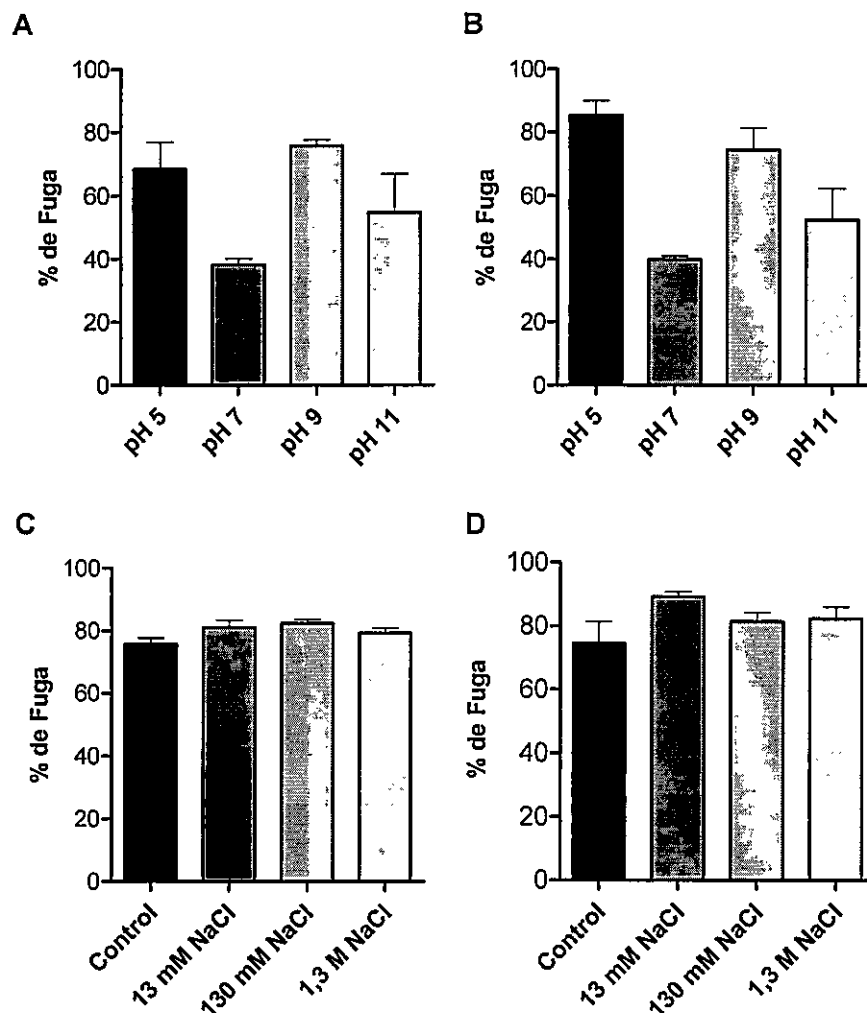
**Figura 8.** Porcentaje de fuga de ANTS/DPX producido por péptidos análogos a la región troncal putativa de la proteína Gc de ANDV en membranas con distintas composiciones lipídicas. En A se muestra el efecto producido por el péptido Gc-StH1. B corresponde al efecto producido por el péptido Gc-StH2, mientras que C corresponde al efecto producido por el péptido Gc-St. Las composiciones lipídicas utilizadas corresponden a: ( ● ) PC, ( ◆ ) PC:PA en una relación molar 4:1, ( ▼ ) PC:PG en una relación molar 4:1, ( ≍ ) PC:PE:SM:col en una relación molar 1:1:1,5 y ( ▲ ) PC:col en una relación molar 3:1,5.

produce poros en las membranas de las cinco mezclas lipídicas analizadas (ver figura 8B). A pesar que en cada una de las mezclas se observa un efecto dosis-dependiente que alcanza un nivel máximo, el comportamiento del péptido es dependiente de la composición lipídica de las LUVs. En LUVs compuestos de PC, este péptido produce un porcentaje de fuga que alcanza el 70%. Cuando las LUVs además contienen fosfolípidos aniónicos el porcentaje de fuga se incrementa, alcanzando alrededor de un 80% cuando éste fosfolípido corresponde a PA y un 75% cuando corresponde a PG. El efecto producido por Gc-StH2 sólo alcanza un 15% de fuga, cuando las LUVs contienen SM y colesterol. Del mismo modo, al observar el efecto producido por este péptido en la mezcla que contiene sólo PC y colesterol, se ve que la fuga también disminuye alcanzando un porcentaje similar al mencionado anteriormente. Estos resultados sugieren que la presencia de colesterol es crítica en el efecto que el péptido producirá en la membrana, mientras que la presencia de SM aparentemente no altera su comportamiento.

Al observar el efecto del péptido que abarca la región troncal completa (figura 8 C), se puede ver que produce fuga del contenido interno cuando los liposomas están compuestos de PC y además cuando estos poseen fosfolípidos aniónicos. A diferencia de lo observado anteriormente con el péptido Gc-StH2, el efecto producido por el péptido Gc-St no varía significativamente cuando la población lipídica tiene carga neta negativa. Sin embargo, una vez más, se puede ver que la presencia de colesterol en la membrana provoca una disminución en el porcentaje de fuga producido por este péptido.

Dado el aumento observado en la fuga producida por el péptido Gc-StH2 en membranas con carga neta negativa, se evaluó si este comportamiento se debía a interacciones electrostáticas entre el péptido y la membrana. Para esto, se realizaron dos estrategias: en primer lugar se determinó la fuga producida por Gc-StH2 a distintos pHs, en liposomas neutros (PC) y liposomas aniónicos (PC:PG). Como se observa en las figura 11 A y B, el efecto producido por el péptido varía notoriamente dependiendo del pH al cual se realice el ensayo, sin embargo su comportamiento es similar tanto en las LUVs compuestas por PC, como en las compuestas por PC y PG. En segundo lugar, se evaluó el efecto de la fuerza iónica en la fuga producida por Gc-StH2. No se observó un cambio significativo en el comportamiento del péptido al aumentar las concentraciones de NaCl en ninguna de las mezclas lipídicas analizadas como puede observarse en las figuras 11 C y D.





**Figura 9.** Porcentaje de fuga de ANTS/DPX producido por Gc-StH2 dependiente de pH y fuerza iónica. Se evaluó el efecto que del pH del medio en la fuga de ANTS/DPX producida por Gc-StH2 en LUVs neutros (A) y aniónicos (B). Además se evaluó el efecto que tienen concentraciones crecientes de NaCl en estas mismas mezclas lipídicas (C y D respectivamente). En A y B los amortiguadores usados fueron MES 10 mM a pH 5, HNE de elusión a pH 7, borato 10 mM a pH 9 y borato 10 mM a pH 11.

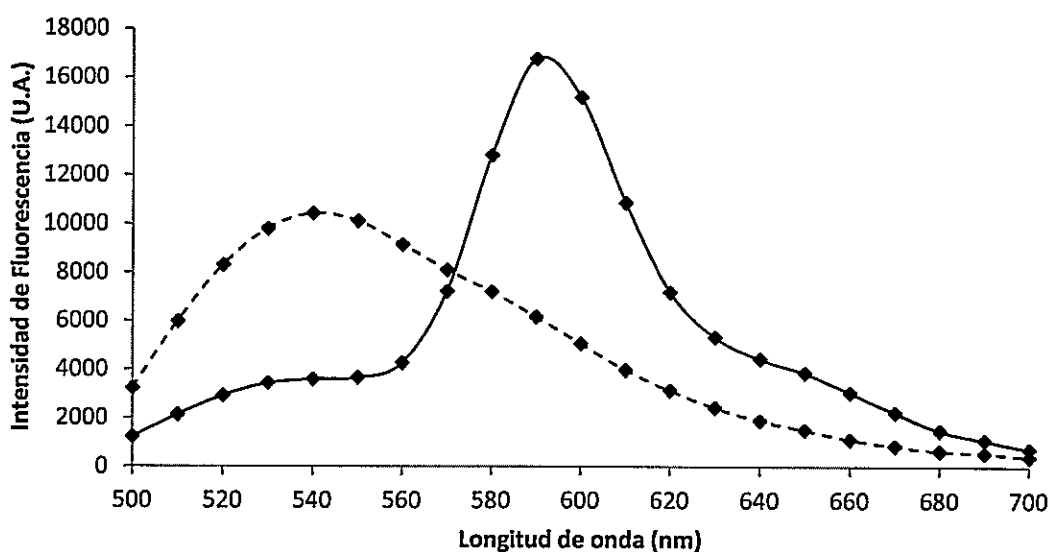
## 5.2 Fusión de membranas producida por péptidos derivados de Gc de ANDV.

Para determinar si los péptidos análogos al péptido de fusión putativo y a la región troncal putativa de Gc de ANDV inducen fusión de membranas, se midió la reducción de la transferencia de energía de resonancia entre los fluoróforos NBD (donador de energía) y Rh (aceptor de energía).

Inicialmente, se midieron los espectros de excitación y emisión de cada fluoróforo, a partir de LUVs compuestas de PC que contenían, en un caso, PE acoplada a NBD (PE-NBD) y, en otro caso, PE acoplada a Rh (PE-Rh). Como se ve en la figura S5 existe un solapamiento entre el espectro de emisión del fluoróforo NBD y el espectro de excitación de Rh, lo que confirma la posibilidad de utilizar a NBD como dador de energía y a Rh como aceptor de ésta (Struck y col, 1981).

Para corroborar dicha transferencia de energía de resonancia entre NBD y Rh, se realizó un espectro de emisión de LUVs que contenían PE-NBD y PE-Rh. Como se puede ver en la figura 10, al excitar NBD se observa un máximo de emisión a 590 nm, correspondiente al patrón de emisión de Rh. Junto con esto, si se agrega Triton X-100 y se excita NBD se observa un máximo a 540 nm, correspondiente a la emisión de NBD sin transferencia de energía. De esta manera, cuando ambos fluoróforos se encuentran próximos en la membrana se produce transferencia de energía mientras que cuando ambos se alejan, como es el caso luego de la adición de Triton X-100, el efecto disminuye por lo que se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia de NBD.

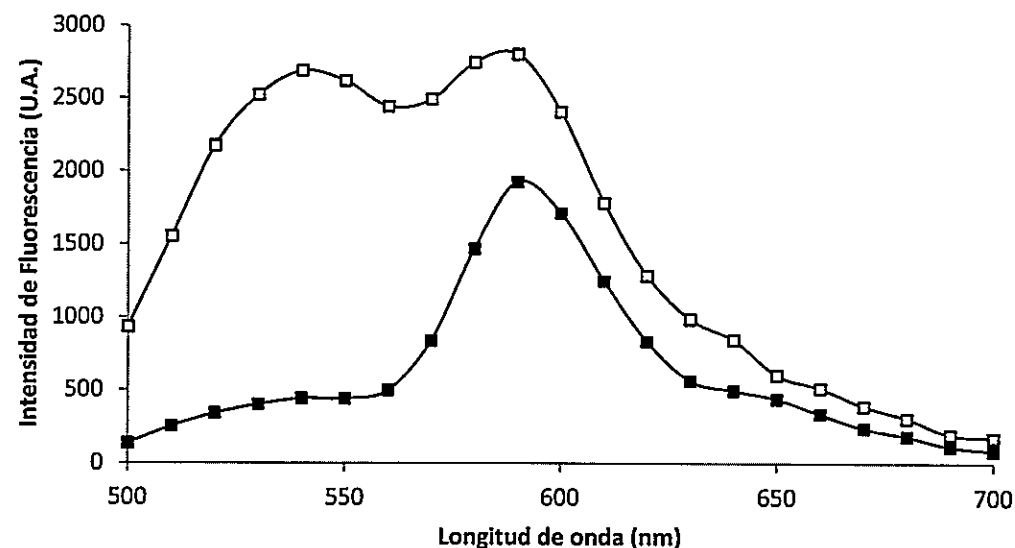
Utilizamos el aumento de la intensidad de fluorescencia de NBD como parámetro para determinar fusión de membranas debido a que como consecuencia de ésta se producirá la dilución del aceptor de energía (Rh), lo que provocará un aumento en la intensidad de fluorescencia del donador.



**Figura 10.** Espectro de emisión de fluorescencia de LUVs marcados con 1% de PE-NBD y 0,25% de PE-Rh. La longitud de onda de excitación utilizada para realizar el espectro fue 460 nm, que corresponde a la longitud de onda de excitación del fluoróforo NBD. La línea discontinua corresponde al espectro de emisión luego de agregar Triton X-100 al 0,5% (v/v).

La concentración de ambos fluoróforos en la membrana corresponde a 1% de PE-NBD y 0,25% de PE-Rh, ya que como se observa en la figura 10 esta concentración es suficiente para que se produzca la transferencia de energía entre ambos fluoróforos. La mezcla de liposomas marcados y sin marcar fue realizada a una relación molar de 1:9. Debido a que en términos de probabilidad, la máxima fusión que podría producirse corresponde a una vesícula marcada con nueve vesículas sin marcar, el 100% de fusión fue establecido a partir de una población lipídica que

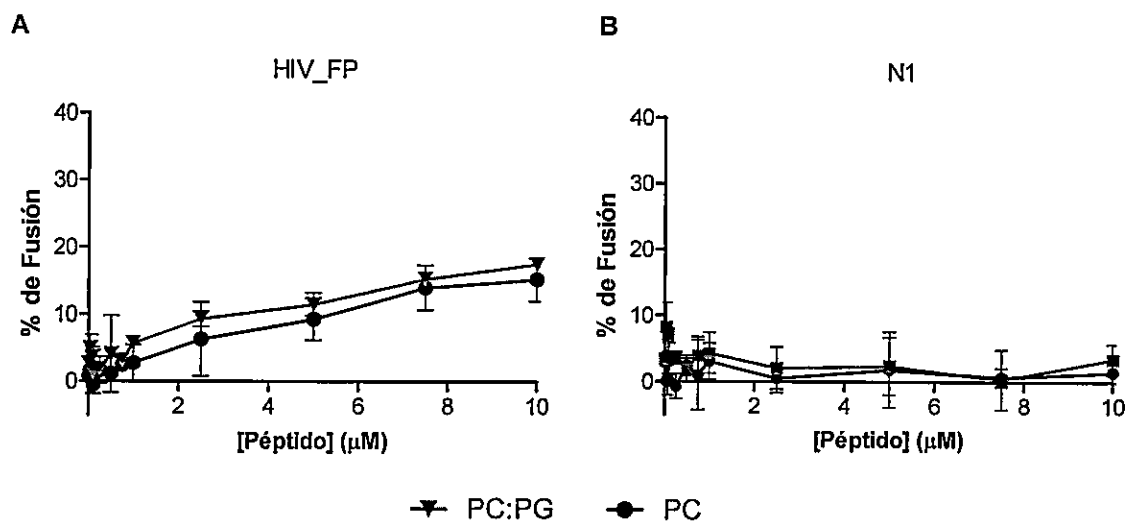
contiene ambos fluoróforos a una concentración correspondiente al 10% de la concentración de cada uno en la población de liposomas marcados. Como se observa en la figura 11, la población utilizada para establecer el 100% de fusión posee un máximo de emisión a 540 nm, que corresponde a la intensidad de fluorescencia de NBD cuando la transferencia de energía disminuye, debido a la dilución de ambos fluoróforos en la membrana.



**Figura 11. Espectro de emisión de fluorescencia de LUVs utilizados en los ensayos de fusión.** (■) corresponde al espectro de emisión de fluorescencia de la mezcla de liposomas marcados con 1% de PE-NBD y 0,25% de PE-Rh y sin marcar a una relación molar 1:9. (□) corresponde al espectro de emisión de fluorescencia de la mezcla lipídica utilizada para establecer el 100% de fusión marcada con 0,1% de PE-NBD y 0,025% de PE-Rh.

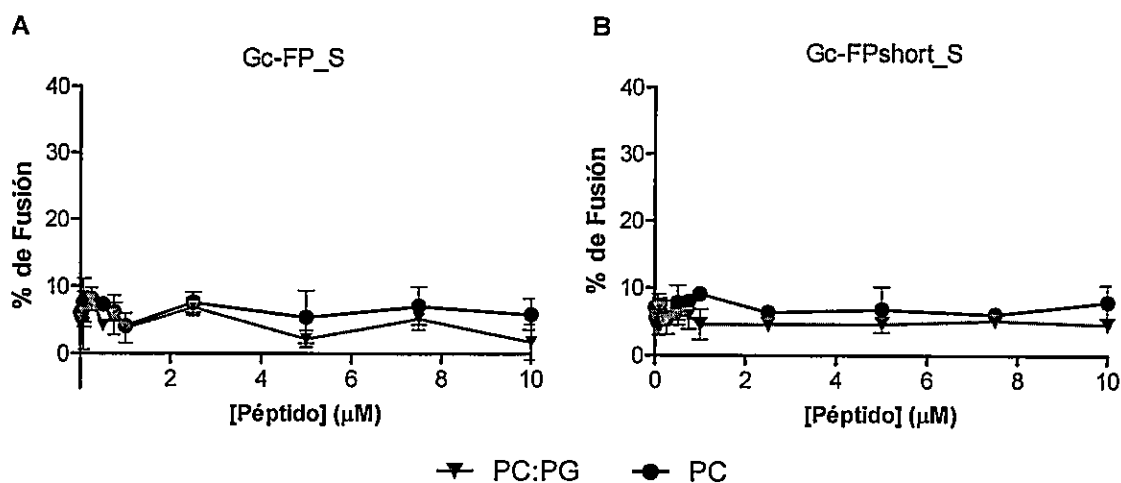
Al igual que en el ensayo de fuga, la concentración final de liposomas utilizada fue  $1 \mu\text{M}$ , ya que a esta concentración la absorbancia a 350 nm es menor a 0,1.

Una vez establecidos los parámetros del ensayo, se determinó la fusión de membranas utilizando concentraciones crecientes de los péptidos utilizados como control: HIV\_FP y N1 en dos composiciones lipídicas PC y PC:PG. Como se muestra en la figura 12, sólo el péptido HIV\_FP produjo fusión de membranas, la que alcanza cerca de un 20% en ambas mezclas a la máxima concentración de péptido utilizada; sin embargo no se observó una saturación del efecto, lo que indicaría que la fusión podría ser aún mayor al aumentar la concentración del péptido.



**Figura 12.** Porcentaje de fusión de membranas producido por péptidos controles en membranas con distintas composiciones lipídicas. En A se muestra el efecto producido por el péptido HIV\_FP utilizado como control positivo, mientras que B corresponde al efecto producido por el péptido N1 utilizado como control negativo. Las composiciones lipídicas utilizadas fueron: ( $\bullet$ ) PC y ( $\blacktriangledown$ ) PC:PG en una relación molar 4:1.

Como se muestra en la figura 13, ninguno de los péptidos análogos al péptido de fusión putativo de la proteína Gc produjo fusión de membranas en las poblaciones lipídicas analizadas.



**Figura 13.** Porcentaje de fusión de membranas producido por péptidos análogos al péptido de fusión putativo de la proteína Gc de ANDV en membranas con distintas composiciones lipídicas. En A se muestra el efecto producido por el péptido Gc-FP\_S, mientras que B corresponde al efecto producido por el péptido Gc-FP short\_S. Las composiciones lipídicas fueron: ( $\bullet$ ) PC y ( $\blacktriangledown$ ) PC:PG en una relación molar 4:1.

Por último, al observar el efecto producido por los péptidos representantes de la región troncal putativa de la proteína Gc, se puede ver que sólo el péptido Gc-StH2 produjo fusión de membranas en ambas poblaciones lipídicas evaluadas (ver figura 14 B). Es importante destacar, que aún cuando la fusión de membranas es similar en ambos casos, alcanzando un valor máximo de 16%, el máximo nivel que se observa en la mezcla que contiene lípidos aniónicos se logra con concentraciones de péptido menores respecto de las concentraciones que se requieren para lograr el mismo efecto en las LUVs compuestas solamente por PC. De esta manera, y tal como se observó en

el ensayo de fuga, el péptido Gc-StH2 produce un mayor efecto en LUVs cargados negativamente.

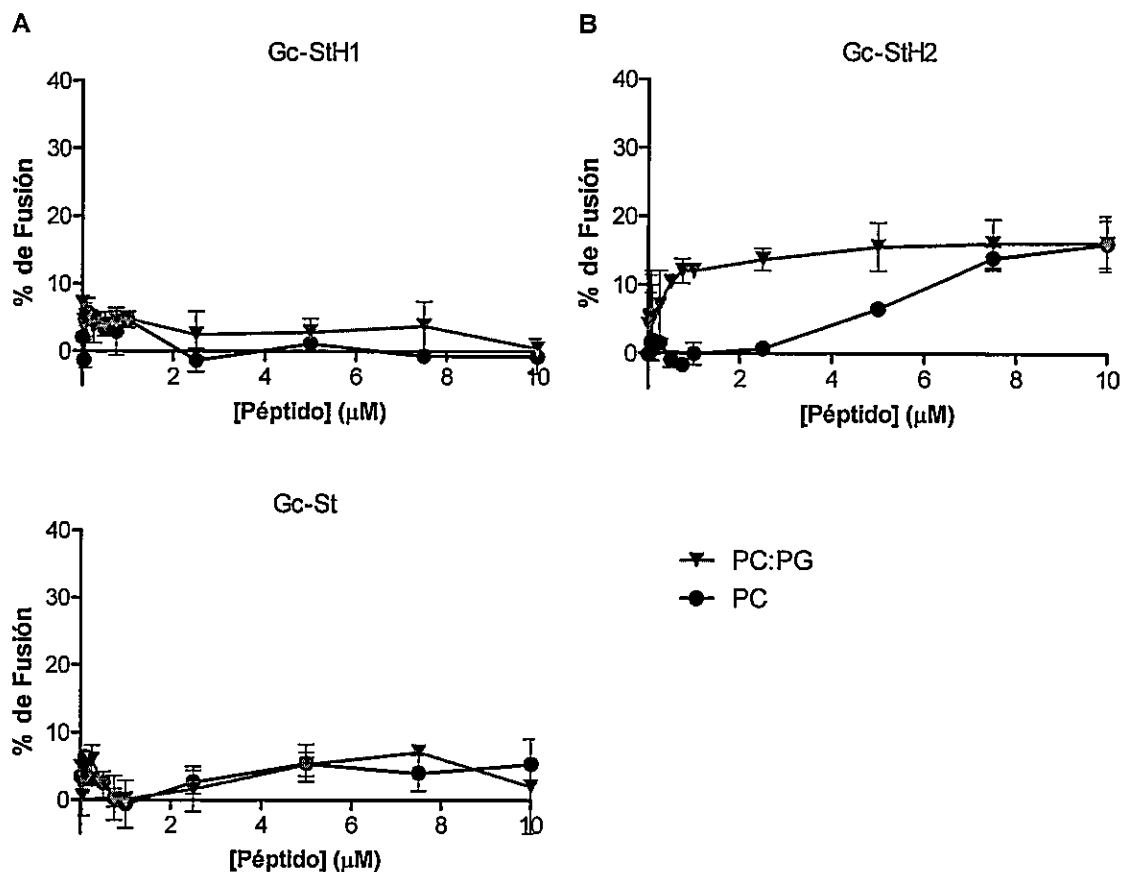


Figura 14. Porcentaje de fusión de membranas producido por péptidos análogos a la región troncal putativa de la proteína Gc de ANDV en membranas con distintas composiciones lipídicas. En A se muestra el efecto producido por el péptido Gc-StH1. B corresponde al efecto producido por el péptido Gc-StH2, mientras que C corresponde al efecto producido por el péptido Gc-St. Las composiciones lipídicas utilizadas fueron: ( $\bullet$ ) PC y ( $\blacktriangledown$ ) PC:PG en una relación molar 4:1.

## 6. DISCUSIÓN

Las proteínas de fusión disminuyen la energía de activación requerida para que se produzca la fusión de membranas, paso clave en el ciclo infectivo de virus que poseen una envoltura lipídica. Los intermediarios en el proceso de fusión poseen una energía libre más alta que la de los estados iniciales y finales, ya que este intermediario inducirá curvatura o ruptura transitoria de las monocapas, proceso que no ocurre espontáneamente (Erand, 2003; Harrison, 2008).

El estudio del mecanismo de fusión viral ha sido fundamental en el desarrollo de drogas producidas contra estos patógenos. El caso del VIH es un ejemplo de terapias efectivas utilizando péptidos que bloquean el cambio conformacional de la proteína que produce la fusión de la membrana viral con la membrana plasmática (Kilby y col, 1998). Así, la comprensión del mecanismo de fusión viral ha adquirido gran atención en los últimos años focalizándose en el estudio de las distintas regiones funcionales que poseen las proteínas de fusión virales.

En este trabajo se estudiaron dos regiones funcionales de la proteína Gc de ANDV: el péptido de fusión putativo y la región troncal putativa, en términos del efecto que estas producen en membranas artificiales, luego que se unen a ellas. En estudios realizados con virus pertenecientes a otras familias virales, se ha visto que estas regiones alteran la arquitectura de la membrana favoreciendo el desencadenamiento del proceso fusogénico (Nieva y col, 1994; Saez-Ciri6n y col, 2002; P6rez-Bern6 y col,



2008). No obstante, no existen estudios de este tipo con miembros del género *Hantavirus*, o con otras especies pertenecientes a la familia *Bunyaviridae*.

Se observó que péptidos análogos al péptido de fusión putativo de la proteína Gc no produjeron fuga del contenido interno de LUVs de distintas composiciones lipídicas (ver figura 7), ni tampoco produjeron la fusión de éstas (ver figura 13). Consideramos posible que ambos efectos no se produjeron *in vitro* debido a la conformación que estos péptidos adoptaron en solución.

De acuerdo al modelo molecular de la proteína Gc de ANDV, derivado del modelamiento por homología a partir de la estructura disponible de la proteína E de TBEV (Tischler y col, 2005), la horquilla de fusión presente en el dominio II de la proteína Gc, podría estar siendo estabilizada por residuos de cisteína que la flanquean, los cuales estarían estableciendo puentes disulfuro con cisteínas presentes en las horquillas vecinas. Así, aún cuando los péptidos sintéticos no hubieran tenido sus residuos de cisteína sustituidos por serina, es poco probable que estos adoptaran una estructura de horquilla similar a la que se propone en la proteína completa. Sin embargo, existen trabajos con el péptido de fusión de DENV, cuya proteína de fusión corresponde a una proteína de fusión clase II, en los cuales el péptido de fusión induce fusión de membranas sintéticas aún cuando posee las sustituciones de cisteínas por alaninas (Stauffer y col, 2008). Otra causa probable podría estar relacionada con las composiciones lipídicas de los liposomas analizados en este trabajo. En el futuro, podría evaluarse el efecto de los péptidos análogos al péptido de fusión putativo en mezclas lipídicas con características distintas, como por ejemplo utilizando lípidos sintéticos con cadenas hidrocarbonadas más ordenadas, ya que está descrito que la

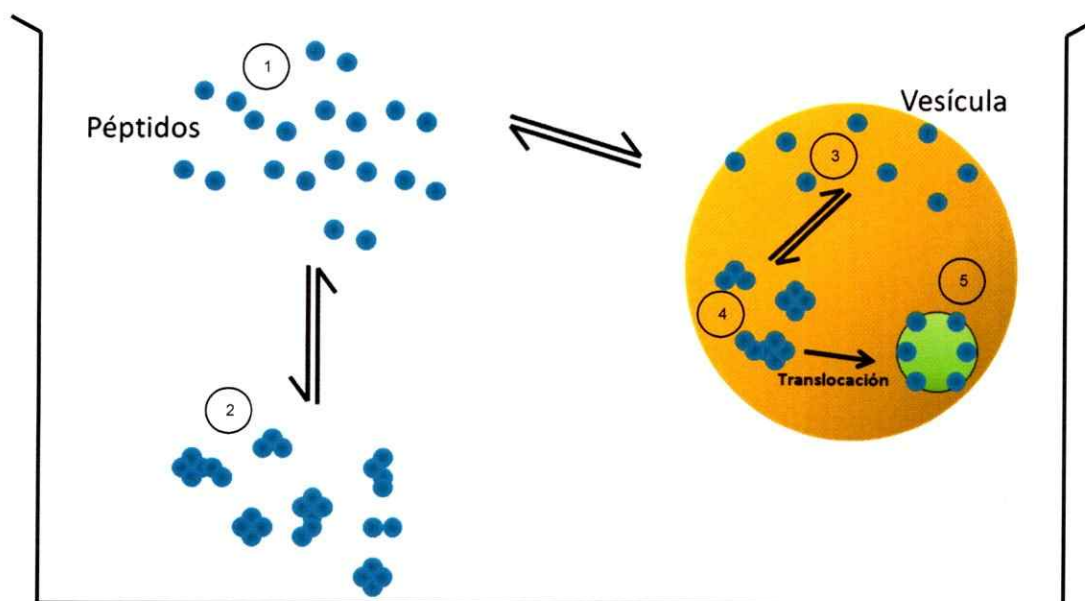
formación de poros es mayor en membranas compuestas por este tipo de lípidos (Nicol y col, 2000).

Otra posibilidad que puede explicar la ausencia de un efecto medible por péptidos análogos al péptido de fusión putativo de Gc es el bajo contenido de residuos hidrofóbicos que este posee, a diferencia del péptido de fusión de la proteína gp41 del VIH utilizado en este trabajo como control positivo. Así, es posible que la inserción del péptido de fusión putativo no sea profunda, estableciendo preferencialmente interacciones con las cabezas polares de los fosfolípidos ubicándose en la interfase de membrana (Cifuentes y col, 2011). Por tanto, es probable que este péptido afecte la fluidez interna de la membrana generando su desestabilización sólo una vez que actúa de manera coordinada con varios péptidos de fusión vecinos, en el contexto de la proteína completa cuando se produce su activación y trimerización.

En lo que respecta a la región troncal putativa, se observó que el péptido análogo a esta región produjo fuga del contenido interno de liposomas compuestos de fosfolípidos zwitteriónicos (PC) y liposomas que contenían fosfolípidos aniónicos (PG y PA) (ver figura 8 C). No obstante, el único péptido que produjo poros en todas las composiciones lipídicas analizadas, además de inducir fusión de membranas, fue el péptido Gc-StH2, como se muestra en las figuras 8 B y 14 B, respectivamente. Este comportamiento puede explicarse debido a que este péptido posee una estructura de hélice  $\alpha$  con carácter anfipático (datos no publicados).

Basados en información obtenida con el péptido de fusión de la proteína gp41 de VIH, el péptido GALA y la pardaxina se ha desarrollado un modelo que explicaría

cómo un péptido produce poros en membranas (Nir & Nieva, 2000). De acuerdo con el modelo, el péptido se une a la membrana y se agrega en su superficie. Cuando el agregado ha adquirido un tamaño crítico se produce la translocación de los péptidos, los cuales atraviesan la bicapa lipídica, creándose un poro a través del cual se produce la fuga de las moléculas que se encuentran en el interior del compartimiento membranoso (figura 15). De acuerdo a esto, la cinética de fuga estaría comandada por la agregación de los péptidos en la superficie.



**Figura 15. Modelo de formación de poros por péptidos en membranas.** (1) péptidos libres en solución. (2) agregados peptídicos en solución. (3) péptidos unidos a la superficie de la membrana en forma monomérica. (4) Agregados de péptidos unidos a la superficie de la membrana. (5) Poro formado por un agregado de péptidos unidos a la membrana. (Modificada de Nir & Nieva, 2000).

Los resultados obtenidos con el péptido Gc-StH2, sugieren que la formación del poro ocurre según lo descrito por el modelo explicado anteriormente. El hecho que la presencia de colesterol tenga como efecto una disminución de la fuga producida por este péptido podría ser explicado por su rol en la estabilización de las membranas. Así, se ha planteado que el colesterol ayuda a que los péptidos se agreguen en la superficie de la membrana de manera reversible, desfavoreciendo su translocación (Nir & Nieva, 2000). Otra explicación posible al bajo porcentaje de fuga observado en la mezcla lipídica que contiene PC, PE, SM y col, podría estar relacionada con la presencia de PE. Este fosfolípido, al poseer una cabeza polar pequeña tiene forma de cono, por lo que estaría induciendo curvatura espontánea negativa en la membrana (Chernomordik & Kozlov, 2005). Además, se sabe que para que un péptido produzca un poro en una membrana debe inducir en ella curvatura positiva. Por esto, la curvatura espontánea negativa reduciría la deformación local que podría producir el péptido al unirse a la membrana y dificultaría su inserción de manera perpendicular ya que es más favorable en este contexto que el péptido se disponga de manera paralela a la superficie de la membrana (Nir & Nieva, 2000).

Otro punto importante a discutir es la diferencia en el comportamiento observado con la región troncal de Gc de ANDV con respecto a lo que está descrito para la región pretransmembrana o troncal de la proteína gp41 del VIH. Como ya fue mencionado previamente, existe evidencia experimental que indica que la presencia de colesterol y SM promueve la agregación de esta región en la membrana lo que favorece su desestabilización (Sáez-Ciri3n y col, 2002). Debido a que el ensamblaje de los viriones del VIH ocurre en la membrana plasmática (Ono & Freed, 2001) es probable que la composición de la membrana viral de éstos posea un alto contenido de

colesterol, dado el gran porcentaje de este lípido en la membrana plasmática. De esta manera, es probable que si el rol de la región pretransmembrana es desestabilizar la membrana viral, ésta debe ser capaz de desestabilizar membranas con alto contenido de colesterol. A pesar de que existen datos contradictorios respecto al lugar en donde se produciría el ensamblaje de los viriones de miembros del género *Hantavirus*, una posibilidad es que este se produzca en el aparato de Golgi, aún cuando también se ha sugerido que los hantavirus distribuidos en América, entre ellos el virus Andes, podrían ensamblarse en la membrana plasmática (Hussein y col, 2011). Si este proceso ocurriera en el aparato de Golgi, es probable que la membrana viral de estos virus no contenga altos niveles de colesterol y SM, dada la menor relación de SM-fosfolípidos y colesterol-fosfolípidos que posee la membrana del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático en comparación a la membrana plasmática (Teissier & Pécheur, 2007). De ser así, esta podría ser una explicación de por qué la región troncal de la proteína Gc tiene un efecto menor en la formación de poros cuando las membranas contienen colesterol y SM.

El hecho que la región troncal de Gc de ANDV genere un efecto más marcado en liposomas cargados negativamente, sugiere que además de las interacciones hidrofóbicas que permiten la interacción entre el péptido y la membrana, también podrían estar involucradas interacciones electrostáticas, entre las cargas de las cabezas polares fosfolípídicas cargadas negativamente y los residuos aminoácidos de lisina cargados positivamente que se encuentran presentes en el extremo carboxilo-terminal de la región troncal. Como una aproximación para evaluar este efecto se varió el pH en el cual se realizó el ensayo de fuga, con el fin de cambiar los estados de protonación de los residuos aminoácidos del péptido y la carga neta de

los lípidos, sin embargo se observó un comportamiento similar en vesículas zwitteriónicas y vesículas aniónicas lo que descartaría el efecto de las cargas en los resultados observados (ver figura 9, A y B). En relación a lo anterior, es probable que al variar el pH no sólo se altere la carga de los residuos aminoacídicos, sino que también se favorezca la formación de conformaciones oligoméricas solubles, que impedirían su unión a membranas, ya que según el modelo de formación de poros mencionado anteriormente, es necesario que los péptidos se unan a la membrana individualmente y una vez en su superficie se agreguen hasta alcanzar un tamaño adecuado para que se produzca un canal o poro. Al aumentar la fuerza iónica agregando NaCl al medio, no se observó un cambio en la fuga producida por el péptido (ver figura 9, C y D), lo que estaría indicando que no hay interacciones electrostáticas involucradas en la unión entre los liposomas y el péptido, por lo cual es posible que sea otra propiedad de los fosfolípidos aniónicos la que estaría favoreciendo el mayor efecto observado.

En lo que respecta a la fusión de membranas, pudo observarse que el péptido Gc-StH2 indujo fusión de membranas de manera comparable a la producida por el péptido de fusión del VIH en la misma composición lipídica. Es importante mencionar que la fusión de membranas fue analizada en presencia de  $Ca^{+2}$ , puesto que está descrito que este catión es fundamental para que se produzca fusión y no fuga del contenido interno de liposomas cuando el péptido de fusión de HIV está en contacto con membranas cargadas negativamente (Nieva y col, 1994). En el futuro, sería interesante determinar si el péptido Gc-StH2 induce fusión de membranas en ausencia de este catión, así como también analizar otras composiciones lipídicas que favorezcan o impidan este proceso, con el fin de determinar si ambos procesos son sinérgicos al

momento de desestabilizar la membrana o bien antagónicos como ya ha sido descrito para el péptido de fusión de la proteína gp41 del VIH (Nir & Nieva, 2000).

Finalmente, a partir de los experimentos realizados en este trabajo no fue posible determinar un efecto con el péptido Gc-StH1 que corresponde al extremo amino-terminal de la región troncal de Gc de ANDV una vez que se une a membranas. Es posible que esta interacción no esté relacionada con la desestabilización de la membrana o bien, el efecto producido por éste no es tan drástico, en comparación al que produce el extremo carboxilo-terminal de esta región. Otra posibilidad es que el extremo amino-terminal solo actúe como un nexo entre los ectodominios globulares y la región transmembrana, dándole la flexibilidad necesaria a la proteína Gc una vez que se produce su cambio conformacional, o bien este relacionada con la trimerización de la proteína de fusión, como ya ha sido descrito para los flavivirus (Allison y col, 1999). Para obtener la respuesta a estas interrogantes, será necesario realizar mayores estudios a futuro.

A partir de estos resultados, se puede concluir que la región carboxilo-terminal de la región troncal putativa de la proteína de fusión Gc de ANDV desestabiliza membranas, por lo cual correspondería a una región funcional de esta proteína. En el futuro, estudios de mutagénesis de la proteína completa podrían ayudar a entender en qué etapas del mecanismo de fusión la región troncal es crítica en la funcionalidad de esta proteína.

## 7. Conclusiones

- Los péptidos Gc-St y Gc-StH2 producen fuga del contenido interno de liposomas.
- Sólo el péptido Gc-StH2 produce fusión de membranas modelo.
- La fuga y fusión producida por los péptidos dependen de la composición lipídica de los liposomas, observándose un mayor efecto en liposomas aniónicos.
- La interacción entre el péptido Gc-StH2 y los liposomas no es electrostática.
- Los péptidos análogos al péptido de fusión putativo de Gc de ANDV no producen ningún efecto en membranas, posiblemente debido a la estructura que estos adquieren en solución.
- Los resultados indican que la región abarcada por el péptido Gc-StH2, correspondiente al extremo carboxilo-terminal de la región troncal putativa es una región funcional de Gc de ANDV.



## 8. Referencias

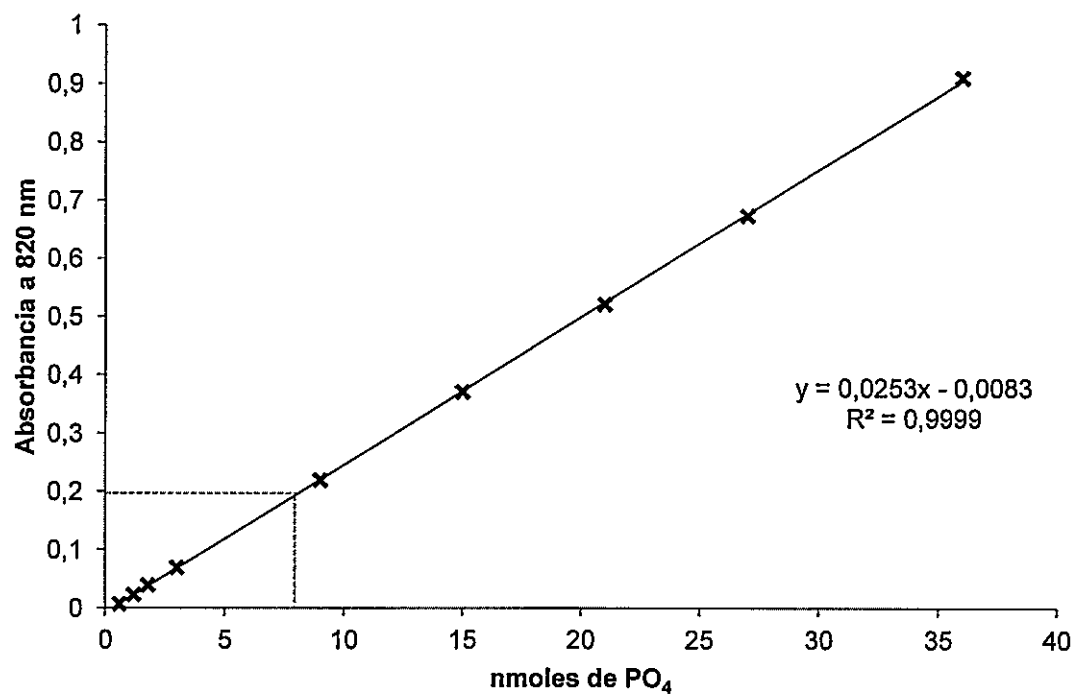
- Allison, S., Stiasny, K., Stadler, K., Mandl, C. y Heinz, F. 1999. Mapping of Functional Elements in the Stem-Anchor Region of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Protein E. *J. Virol.* **73**: 5605–5612.
- Allison, S., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C. y Heinz, F. 2001. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *J. Virol.* **75**: 4268–4275.
- Ames, B. 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods in Enzymology* **8**: 115–118
- 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.
- Backovic, M., Jardetzky, T. y Longnecker, R. 2007. Hydrophobic residues that form putative fusion loops of Epstein-Barr virus glycoprotein B are critical for fusion activity. *J. Virol.* **81**: 9596–9600.
- Backovic, M., Leser, G., Lamb, R., Longnecker, R. y Jardetzky, T. 2007. Characterization of EBV gB indicates properties of both class I and class II viral fusion proteins. *Virology* **368**: 102–113.
- Chernomodik, L. y Kozlov, M. 2003. Protein-Lipid Interplay in Fusion and Fission of Biological Membranes. *Annual Rev. Biochem.* **72**: 175–207.
- Chernomodik, L. y Kozlov, M. 2005. Membrane Hemifusion: Crossing a Chasm in Two Leaps. *Cell* **123**: 375–382,
- Chernomodik, L., Zimmerberg, J. y Kozlov, M. 2006. Membrane of the world unite! *J. Cell Biol.* **175**: 201–207.
- Choi, Y., Kwon, Y., Kim, S., Park, J., Lee, K. y Ahn, B. 2008. A hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome requires gC1qR/p32 for efficient cell binding and infection. *Virology* **381**: 178–183.
- Cifuentes-Muñoz, N., Barriga, G., Valenzuela, P., 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.
- Duffus, W., Levy-Mintz, P., Klimjack, M. y Kielian, M. 1995. Mutations in the putative fusion peptide of Semliki Forest virus affect spike protein oligomerization and virus assembly. *J. Virol.* **69**: 2471–2479.
- Ellens, H., Bentz, J., Szoka, F. 1985. Proton- and calcium-induced fusion and destabilization of liposomes. *Biochemistry* **24**: 3099–3106.
- Elliott, R. 1990. Molecular biology of the Bunyaviridae. *J. Gen. Virol.* **71**: 501–522.
- Epand, R. 2003. Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim. Biophys. Acta.* **1614**: 116–121.
- Gaibelet, G., Planchenault, T., Mazeres, S., Dumas, F., Arenzana-Seisdedos, F., Lopez, A., Lagane, B., Bachelier, F. 2006. CD4 and CCR5 constitutively interact at the plasma membrane of living cells: a confocal fluorescence resonance energy transfer-based approach. *J. Biol. Chem.* **281**: 37921–37929.
- 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., Ginsberg, 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.
- Gething, M., Doms, R., York, D. y White, J. 1986. Studies on the mechanism of membrane fusion: site-specific mutagenesis of the hemagglutinin of influenza virus. *J. Cell Biol.* **102**: 11–23.
- Goldsmith, C., Elliott, L., Peters, C. y Zaki, S. 1995. Ultrastructural characteristics of Sin Nombre virus, causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. *Arch. Virol.* **140**: 2107–2122.
- Han, X., Bushweller, J., Cafiso, D. y Tamm, L. 2001. Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 715–720.
- Hannah, B., Heldwein, E., Bender, F., Cohen, G. y Eisenberg, R. 2007. Mutational Evidence of Internal Fusion Loops in Herpes Simplex Virus Glycoprotein B. *J. Virol.* **81**: 4858–4865.

- Harrison, S. 2008. Viral membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**: 690-698.
- Hart, C. y Bennett, M. 1999. Hantavirus infections: epidemiology and pathogenesis. *Microbes and Infection* **1**: 1229-1237.
- Hernandez, L. y White, J. 1998. Mutational Analysis of the Candidate Internal Fusion Peptide of the Avian Leukosis and Sarcoma Virus Subgroup A Envelope Glycoprotein. *J Virol.* **72**: 3259-3267.
- Hooper, J., Larsen, T., Custer, D. y Schmaljohn, C. 2001. A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* **289**: 6-14.
- Hope, M., Bally, M., Webb, G. y Cullis, P. 1985. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta.* **812**: 55-65.
- Horvath, C. y Lamb, R. 1992. Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. *J Virol.* **66**: 2443-2455.
- Huiskonen, J., Överby, A., Weber, F. y Grünewald, K. 2009. Electron cryo-microscopy and single-particle averaging of Rift Valley fever virus: evidence for Gn-Gc glycoprotein heterodimers. *J Virol.* **83**: 3762-3769.
- Hussein, I., Haseeb, A., Haque, A. y Mir, M. 2011. Recent advances in hantavirus molecular biology and disease. *Adv Appl Microbiol.* **74**: 35-75.
- 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.
- 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.
- Jonsson, C., Figueiredo, L. y Vapalahti O. 2010. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**: 412-441.
- Kadlec, J., Loureiro, S., Abrescia, N., Stuart, D. y Jones, I. 2008. The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. *Nat Struct Mol Biol.* **15**: 1024-1030.
- Kielian, M., Klimjack, M., Ghosh, S. y Duffus, W. 1996. Mechanisms of mutations inhibiting fusion and infection by Semliki Forest virus. *J Cell Biol.* **134**: 863-872.
- Kielian, M. y Rey, F. 2005. Virus membrane-fusion proteins: More than one way to make a hairpin. *Nat. Rev. Microb.* **4**: 67-76.
- Kilby, J., Hopkins, S., Venetta, T., DiMassimo, B., Cloud, G., Lee, J., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M., Nowak, M., Shaw, G. y Saag, M. 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat. Med.* **4**: 1302-1307.
- Krautkrämer, E. y Zeier, M. 2008. Hantavirus Causing Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Enters from the Apical Surface and Requires Decay-Accelerating Factor (DAF/CD55). *J Virol.* **82**: 4257-4264.
- Levy-Mintz, P., Kielian, M. 1991. Mutagenesis of the putative fusion domain of the Semliki Forest virus spike protein. *J Virol.* **65**: 4292-4300.
- 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.
- López, N., Padulaa, P., Rossia, C., Lázaro, M. y Franze-fernández, M. 1996. Genetic Identification of a New Hantavirus Causing Severe Pulmonary Syndrome in Argentina. *Virology* **220**: 223-226.
- Lorzate, 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.
- Mackow, E. y Gavrilovskaya, I. 2001. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **256**: 91-115.
- Markotic, A., Hensley, L., Daddario, K., Spik, K., Anderson, K. y Schmaljohn, C. Pathogenic hantaviruses elicit different immunoreactions in THP-1 cells and primary monocytes and induce differentiation of human monocytes to dendritic-like cells. *Coll. Antropol.* **31**: 1159-1167.

- Ministerio de salud de Chile, 2011. Boletín Epidemiológico de Hantavirus [en línea]. Disponible en: [http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Hantavirus/Hantavirus\\_sem36\\_2011.pdf](http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Hantavirus/Hantavirus_sem36_2011.pdf)
- Nicol, F., Nir, S. y Szoka, F. 2000. Effect of phospholipid composition on an amphipathic peptide-mediated pore formation in bilayer vesicles. *Biophys. J.* **78**: 818 – 829.
- Nieva, J., Nir, S., Muga, A., Goni, F. y Wilschut, J. 1994. Interaction of the HIV-1 fusion peptide with phospholipid vesicles: different structural requirements for fusion and leakage. *Biochemistry* **33**: 3201-3209.
- Nir, S. y Nieva, J. 2000. Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion. *Prog. Lipid Res.* **39**: 181-206.
- Objeski, J., Bishop, D., Murphy, F. y Palmer, E. 1976. Structural proteins of La Crosse virus. *J Virol.* **19**: 985-997.
- Ono, A. y Freed, E. 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 13925-13930.
- Överby, A., Pettersson, R., Grönwald, K. y Huiskonen, J. 2008. Insights into bunyavirus architecture from electron cryotomography of Uukuniemi virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 2375-2379.
- Padula, P., Edelstein, A., Miguel, S., Lopez, N., Rossi, C. y Rabinovich, R. 1998. Hantavirus pulmonary síndrome outbreak in Argentina: Molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* **241**: 323-330.
- Padula, P., Colavecchia, S., Martínez, V., Gonzalez Della Valle, M., Edelstein, A., Miguel, S., Russi, J., Riquelme, J., Colucci, N., Almirón, M. y Rabinovich, R. 2000. Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in South America. *J Clin. Microbiol.* **38**: 3029-3035.
- Pécheur, E., Sainte-Marie, J., Bienvenüe, A. y Hoekstra, D. 1999. Peptides and membrane fusion: towards an understanding of the molecular mechanism of protein-induced fusion. *J Membr. Biol.* **167**:1-17.
- Pécheur, E., Martin, I., Bienvenüe, A., Ruyschaert, J. y Hoekstra, D. 2000. Protein-induced fusion can be modulated by target membrane lipids through a structural switch at the level of the fusion peptide. *J Biol. Chem.* **275**: 3936-3942.
- Percherancier, Y., Lagane, B., Planchenault, T., Staropoli, I., Altmeyer, R., Virelizier, J., Arenzana-Seisdedos, F., Hoessli, D. y Bachelier, F. 2003. HIV-1 entry into T-cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant, raft membrane domains. *J Biol. Chem.* **278**: 3153-3161.
- Pérez-Berná, A., Bernabeu, A., Moreno, M., Guillen, J. y Villalain, J. 2008. The pre-transmembrane region of the HCV E1 envelope glycoprotein: interaction with model membranes. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 2069-2080.
- Raftery, M., Kraus, A., Ulrich, R., Krüger, D. y Schönrich, G. 2002. Hantavirus infection of dendritic cells. *J Virol* **76**: 10724-10733.
- Rey, F., Heinz, F., Mandl, C., Kunz, C. y Harrison, S. 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* **375**: 291-298.
- Robison, C. y Whitt, M. 2000. The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis virus G protein confers efficient virus assembly. *J Virol* **74**: 2239-2246.
- Roche, S., Rey, F., Gaudin, Y. y Bressanelli, S. 2007. Structure of the Prefusion Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *Science* **315**: 843-848.
- Saez-Cirion, A., Nir, S., Lorizate, M., Agirre, A., Cruz, A., Perez-Gil, J. y Nieva, J. 2002. Sphingomyelin and cholesterol promote HIV-1 gp41 pretransmembrane sequence surface aggregation and membrane restructuring. *J. Biol. Chem.* **277**: 21776-21785.
- 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.
- Schroth-Diez, B., Ludwig, K., Baljinnyam, B., Kozerski, C., Huang, Q. y Herrmann, A. 2000. The role of the transmembrane and of the intraviral domain of glycoproteins in membrane fusion of enveloped viruses. *Biosci. Rep.* **20**: 571-595.
- Smith, A. y Helenius, A. 2004. How viruses enter animal cells. *Science* **304**: 237-242.
- Spiropoulou, C. 2001. Hantavirus maturation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **256**: 33-46.

- Stauffer, F., Melo, M., Carneiro, F., Sousa, F., Juliano, M., Juliano, L., Mohana-Borges, R., Da Poian, A. y Castanho, M. 2008. Interaction between dengue virus fusion peptide and lipid bilayers depends on peptide clustering. *Mol. Membr. Biol.* **25**: 128-138.
- Stiasny, K., Koessl, C. y Heinz, F. 2005. Differences in the postfusion conformations of full-length and truncated class II fusion protein E of tick-borne encephalitis virus. *J. Virol.* **79**: 6511-6515.
- Struck, D., Hoekstra, D. y Pagano, R. 1981. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* **20**: 4093-4099.
- Sun, X., Belouzard, S. y Whittaker, G. 2008. Molecular architecture of the bipartite fusion loops of vesicular stomatitis virus glycoprotein G, a class III viral fusion protein. *J. Biol. Chem.* **283**: 6418-6427.
- Teissier, E. y Pécheur, E. 2007. Lipids as modulators of membrane fusion mediated by viral fusion proteins. *Eur. Biophys. J.* **36**: 887-899.
- Tischler, N., Gonzalez, A., Perez-Acle, T., Roseblatt, M. y Valenzuela, P. 2005. Hantavirus Gc glycoprotein: evidence for a class II fusion protein. *J. Gen. Virol.* **86**: 2937-2947.
- Waarts, B., Bittman, R y Wilschut, J. 2002. Sphingolipid and cholesterol dependence of alphavirus membrane fusion: lack of correlation with lipid raft formation in target liposomes. *J. Biol. Chem.* **277**: 38141-38147.
- Weissenhorn, W., Hinz, A. y Gaudin, Y. 2007. Virus membrane fusion. *FEBS Letters* **581**: 2150-2155.
- Wells, R., Sosa Estani, S., Yadon, Z., Enria, D., Padula, P., Pini, N., Mills, J., Peters, C. y Segura, E. 1997. An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. *Emerg. Infect. Dis.* **3**: 171-174.
- Wharton, S., Martin, S., Ruigrok, R., Skehel, J. y Wiley, D. 1988. Membrane fusion by peptide analogues of influenza virus haemagglutinin. *J. Gen. Virol.* **69**: 1847-1857.
- Yi, L., Fang, J., Isik, N., Chlm, J. y Jin, T. 2006 HIV gp120-induced interaction between CD4 and CCR5 requires cholesterol-rich microenvironments revealed by live cell fluorescence resonance energy transfer imaging. *J. Biol. Chem.* **281**: 35446-35453.
- 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.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO



**Figura S1. Cuantificación de fosfato Inorgánico.** Se realizó una curva de calibración en la cual se interpolaron las absorbancias de cada una de las mezclas lipídicas utilizadas en los distintos ensayos, para obtener la concentración total de lípidos. (---) corresponde a la interpolación de LUVs compuestos de PC utilizados en el ensayo de fuga.

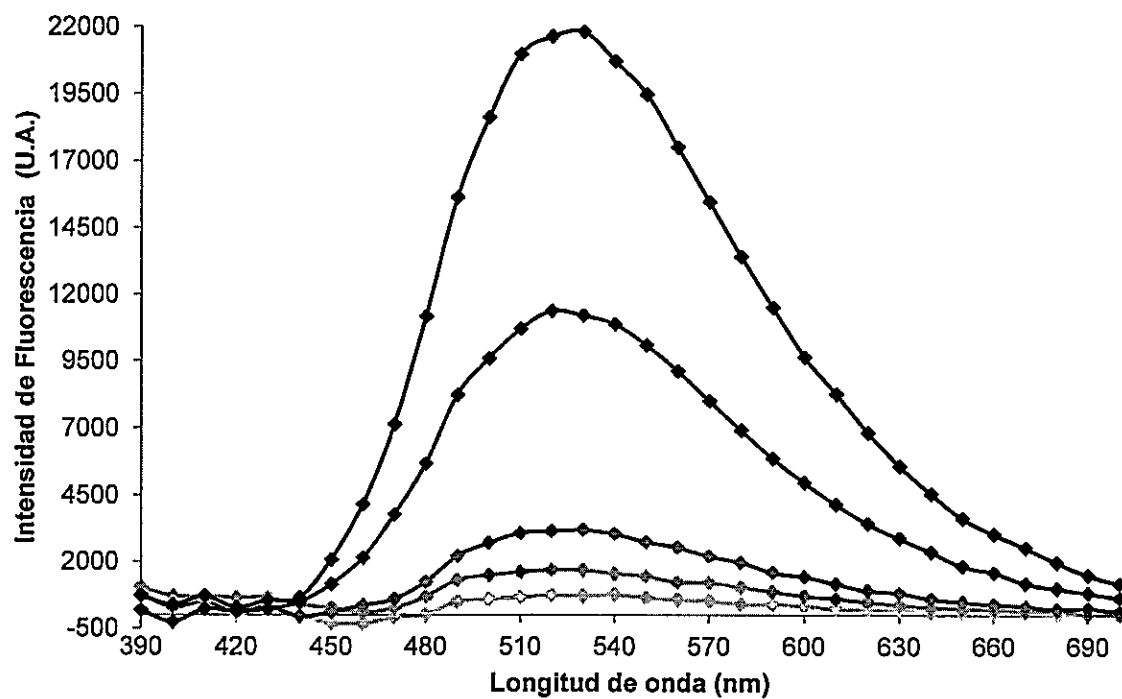


Figura S2. Espectro de fluorescencia de ANTS al incubar distintas concentraciones de LUVs compuestas de PC con Triton X-100. La longitud de onda de excitación utilizada fue 355 nm. Las concentraciones de LUVs utilizadas fueron: (♦) 0,1 μM, (♦) 0,5 μM, (♦) 1 μM, (♦) 5 μM y (♦) 10 μM.

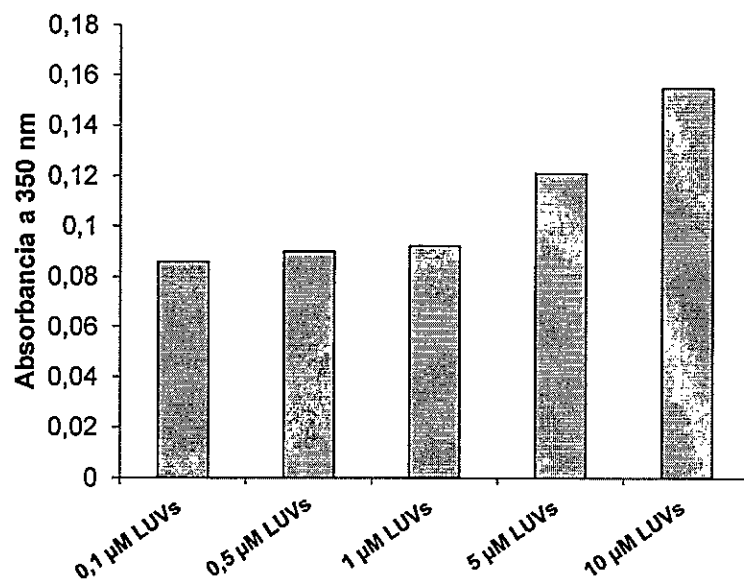


Figura S3. Dispersión de luz producida por LUVs compuestas de PC. Se midió la absorbancia a 350 nm de LUVs de 200 nm.

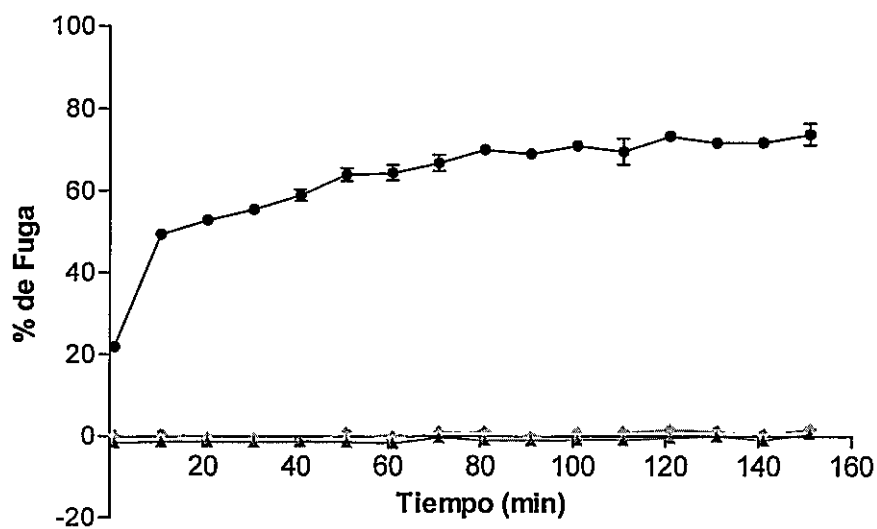


Figura S4. Cinética de la fuga producida por péptidos derivados de la región troncal putativa de Gc de ANDV. (◆) corresponde al péptido Gc-StH1, (●) corresponde al péptido Gc-StH2 y (▲) corresponde al péptido control negativo N1. En cada caso, la concentración de péptido utilizada fue 10  $\mu$ M mientras que la de las LUVs compuestas de PC fue 1  $\mu$ M.



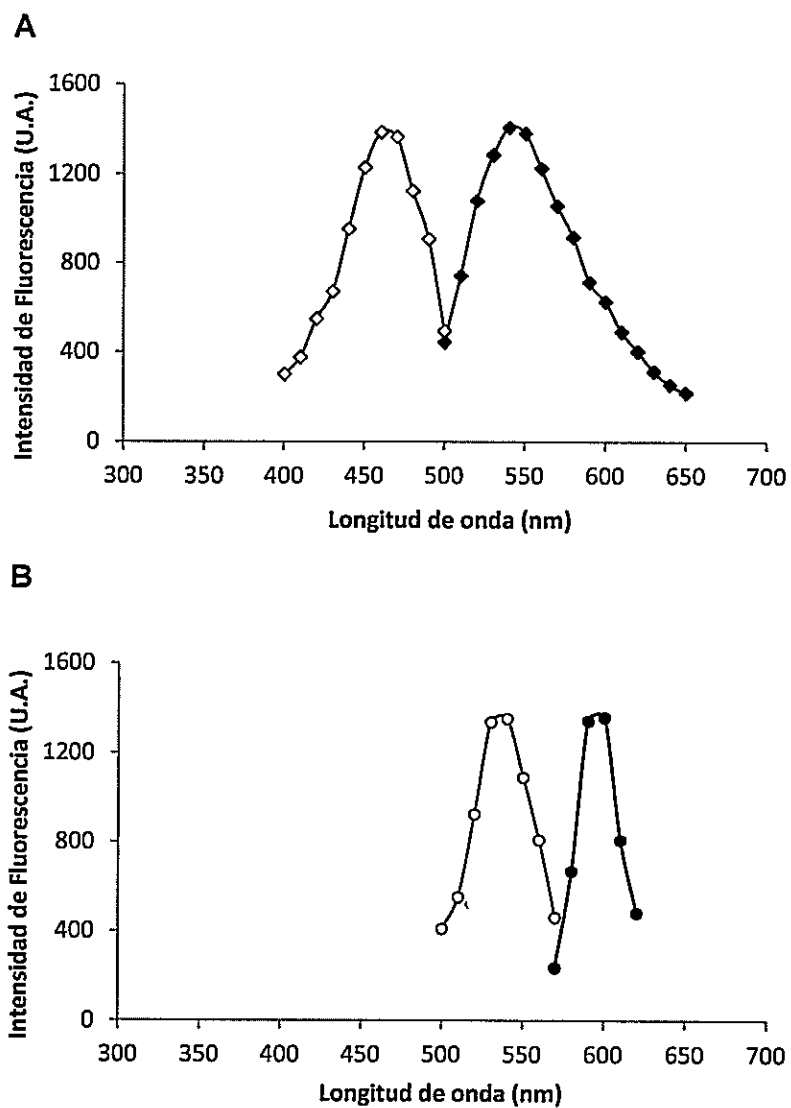


Figura S5. Espectros de fluorescencia de LUVs marcados con NBD y Rh. En A se muestran los espectros de excitación (◊) y emisión (◆) de NBD, mientras que en B se muestran los espectros de excitación (○) y emisión (●) de Rh. Las LUVs fueron marcadas con 0,6% de PE-NBD y 0,6% de PE-Rh.