

UCH-FC
Biotecnología
M.357
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

**“CARACTERIZACIÓN DEL DOMINIO TRANSMEMBRANA DE LA PROTEÍNA G_c
DEL VIRUS ANDES (*HANTAVIRUS*) Y SU ROL DURANTE EL PROCESO DE
FUSIÓN DE MEMBRANAS”**

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

CHANTAL LORETTO MÁRQUEZ BADILLA

Dra. Nicole Tischler
Directora de Seminario de Título

Dr. Ricardo Cabrera
Patrocinante de Seminario de Título

Mayo de 2014
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por la candidata:

CHANTAL LORETTO MÁRQUEZ BADILLA

“CARACTERIZACIÓN DEL DOMINIO TRANSMEMBRANA DE LA PROTEÍNA G_c DEL VIRUS ANDES (*HANTAVIRUS*) Y SU ROL DURANTE EL PROCESO DE FUSIÓN DE MEMBRANAS”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dra. Nicole Tischler
Directora Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de la Dra. Nicole Tischler, sobre una línea horizontal.

Dr. Ricardo Cabrera Paucar
Prof. Patrocinante del Seminario

Firma manuscrita en azul del Dr. Ricardo Cabrera Paucar, sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul del Dr. Marcelo Baeza Cancino, sobre una línea horizontal.

Dr. Andrés Marcoleta Caldera
Evaluador

Santiago de Chile, Mayo de 2014.



Esta tesis fue financiada con proyecto FONDECYT 1100756.



BIOGRAFÍA

Nací hace un poco más de 25 años. Mi familia cercana es fuera de lo común: por el lado de mi mamá, Maritza, tengo 3 hermanos y por el lado de mi papá, Richard, tengo 3 hermanas. No puedo dejar de mencionar a mi abuela Ita que me cuidó cuando era muy pequeña y a mi abuela Pita, junto con mi tía Ana y Paloma, con quienes viví desde los 15 años hasta hace poco.

Mi enseñanza básica la pasé en la escuela Inglaterra, aunque mi verdadera educación la recibí en el Liceo San José, donde conocí personas que hasta el día de hoy forman parte de mi vida y donde descubrí que quería dedicar mi vida a la investigación. Con esa convicción entré a Bachillerato en "la Chile", sin duda una de las mejores etapas de mi vida. Durante esos dos años conocí a personas increíbles, viajé, bailé y carretié. Pero además, aprendí a estudiar de verdad, a pensar de manera distinta, a ampliar mi mente. Allí, viendo cómo se mueven los cloroplastos dentro de las células vegetales y descubriendo que las células son algo mucho más complejo de lo que yo pensaba, confirmé que quería dedicar mi vida a la ciencia básica y por eso entré a Ing. en Biotecnología Molecular. Hoy, tras 6 años de estudios universitarios y uno más de tesis, estoy culminando una etapa de aprendizaje infinito, pero comenzando una época de cambios que espero me lleven a cumplir todos mis sueños.





AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi familia y en especial a mis papás, quienes siempre me impulsaron a estudiar, me han apoyado en cada decisión que he tomado en mi vida y me han permitido ser libre.

Quiero agradecer a mi profe de enseñanza media Carmen Gloria y a mi profe de Bachillerato Cristian Reyes, que con su personalidad y su forma de enseñanza me incentivaron a mejorar día a día,

Quiero agradecer a todos mis amigos por los momentos que me han dado, en particular a los que durante esta tesis siempre me preguntaban cómo iba con mis células de colores.

Además, quiero dar gracias infinitas a Claudio por estar siempre allí, apoyándome cada vez que la frustración amenazaba con vencerme.

Por último, quiero darle las gracias a todos los integrantes del laboratorio de Virología Molecular de la Fundación Ciencia & Vida, que me han ayudado cada vez que los he necesitado durante mi estadía en el laboratorio. Gracias por la paciencia, por los consejos, por la confianza, por las conversaciones, por el sushi y por las micheladas.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
1. RESUMEN	XII
2. ABSTRACT	XIV
3. INTRODUCCIÓN	1
3.1 ANTECEDENTES SOBRE LOS HANTAVIRUS	1
3.2 ORGANIZACIÓN GENÓMICA Y ESTRUCTURA DE LOS HANTAVIRUS	2
3.3 ENTRADA DE LOS HANTAVIRUS A LA CÉLULA.....	4
3.4 MECANISMO DE FUSIÓN DE MEMBRANAS INDUCIDO POR PROTEÍNAS DE FUSIÓN VIRALES	6
3.5 PROTEÍNAS DE FUSIÓN VIRALES	9
3.6 DOMINIO TM Y SU ROL EN LA FORMACIÓN DEL PORO DE FUSIÓN.....	12
3.6.1 Dominio TM de gp41 de HIV y SIV.....	12
3.6.2 Dominio TM de HA del virus influenza.....	13
3.6.3 Dominios TM de otras proteínas de fusión virales.....	16
3.6.4 Dominio TM de Gc de ANDV.....	18
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVOS	20
5.1 OBJETIVO GENERAL	20
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 CLONAMIENTO DE MUTANTES DE DELECCIÓN DEL LARGO DEL DOMINIO TM DE Gc DE ANDV.....	22
6.2 DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DE SUSTITUCIÓN DE RESIDUOS DEL DOMINIO TM DE Gc DE ANDV	23
6.2.1 Análisis bioinformático del dominio TM de Gc de hantavirus.....	23

6.2.2	Construcción de mutante de sustitución Gc-S470A.....	24
6.2.3	Construcción de mutante de sustitución Gc-S475A.....	24
6.3	EXPRESIÓN DE GC SILVESTRE Y MUTANTES DE ANDV EN CÉLULAS EUKARIONTES ...	25
6.4	LOCALIZACIÓN DE GC SILVESTRE Y MUTANTES EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA.....	26
6.5	ENSAYO DE FORMACIÓN DE SINCICIOS MEDIADO POR GC SILVESTRE Y MUTANTES....	26
6.6	DETECCIÓN DEL INTERMEDIARIO DE HEMIFUSIÓN MEDIADO POR GC SILVESTRE Y MUTANTES	28
7.	RESULTADOS	30
7.1	MUTANTES DEL DOMINIO TM DE GC DE ANDV.....	30
7.1.1	Mutantes de delección del largo del dominio TM.....	30
7.1.2	Mutantes de sustitución Gc-S470A y Gc-S475A del dominio TM	32
7.2	SÍNTESIS DE GC SILVESTRE Y MUTANTES EN CÉLULAS EUKARIONTES	34
7.3	ACUMULACIÓN DE GC SILVESTRE Y MUTANTES EN MEMBRANA PLASMÁTICA	36
7.4	CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FUSOGÉNICA DE GC SILVESTRE Y MUTANTES ...	38
7.5	CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO INTERMEDIARIO DE HEMIFUSIÓN DE MEMBRANAS MEDIADO POR GC SILVESTRE Y MUTANTES	42
8.	DISCUSIÓN.....	49
8.1	REQUISITO DEL LARGO DEL DOMINIO TM DE GC DE ANDV PARA PROMOVER LA FUSIÓN DE MEMBRANAS	50
8.1.1	La mutante Gc- Δ 1TM promueve la fusión de membranas.....	50
8.1.2	Las mutantes Gc- Δ 2TM y Gc- Δ 3TM median la hemifusión	52
8.2	REQUISITO DE SECUENCIA DEL DOMINIO TM DE GC DE ANDV	54
9.	CONCLUSIONES	57
10.	ANEXOS.....	58
10.1	FRAGMENTO DE ADN SINTETIZADO PARA GENERAR MUTANTE GC-S475A	58
10.2	ACUMULACIÓN DE GC EN LA MEMBRANA CITOPASMÁTICA DE CÉLULAS EUKARIONTES	59
11.	REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad fusogénica de distintas proteínas de fusión mutadas en sus residuos glicina conservados del dominio TM	16
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de una partícula viral de hantavirus.....	3
Figura 2. Mecanismo de fusión de membranas inducido por proteínas de fusión virales	18
Figura 3. Estructuras representativas de las distintas clases de proteínas de fusión.....	10
Figura 4. Actividad de fusión entre células mediada por Gc silvestre y mutantes.....	19
Figura 5. Diseño de mutantes del dominio TM de la proteína Gc de ANDV.....	31
Figura 6. Secuencia nucleotídica de clones positivos pl.18/GPC con mutaciones en Gc-TM.....	32
Figura 7. Alineamiento de los dominios TM de Gc de distintos hantavirus.....	34
Figura 8. Síntesis de Gc silvestre y mutantes en células eucariontes.....	36
Figura 9. Acumulación de Gc en la membrana citoplasmática de células eucariontes.....	37
Figura 10. Actividad fusogénica de Gc silvestre y mutantes.....	39
Figura 11. Cuantificación de la actividad de fusión de Gc silvestre y mutantes.....	41
Figura 12. Transferencia lipídica entre células mediada por Gc silvestre ó mutantes a pH 5,5.....	44
Figura 13. Cuantificación de transferencia lipídica entre células mediada por Gc silvestre ó mutantes a pH 5,5	46
Figura 14. Cuantificación de transferencia lipídica entre células mediada por Gc silvestre ó mutantes a pH 5,5 y 7,0	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANDV	Virus Andes
ARN	Ácido ribonucleico
CTX-488	Subunidad β de la toxina del cólera conjugada a Alexa-488
DAF	<i>Decay-accelerating factor</i>
DMEM	Medio esencial mínimo con sales Earles Dulbecco
DOBV	Virus Dobrava
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Endo	Endodominio
FHSR	Fiebre hemorrágica con síndrome renal
Gc	Glicoproteína Gc de hantavirus
gi	Número de acceso en <i>GenBank</i>
Gn	Glicoproteína Gn de hantavirus
GPC	Precursor de las glicoproteínas de hantavirus
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HA	Proteína hemaglutinina del virus influenza
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HPS	Síndrome pulmonar asociado a hantavirus
HRP	Peroxidasa de rábano
HSV	Virus herpes simplex
hsARN (-)	ARN de hebra simple con polaridad negativa
nm	Nanómetros
HTNV	Virus Hantaan
PBS	Amortiguador fosfato salino
PUUV	Virus Puumala
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN
RVFV	<i>Rift Valley fever virus</i>
SBF	Suero bovino fetal
SIV	Virus de la inmunodeficiencia de simios
SFV	<i>Semliki Forest virus</i>
RNP	Ribonucleoproteína
SEOV	Virus Seoul
SNV	Virus Sin Nombre
TBE	Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas
TM	Transmembrana
VSV	Virus de la estomatitis vesicular

1. RESUMEN

El virus Andes (ANDV) pertenece al género *Hantavirus* y se encuentra distribuido en Chile y Argentina. Los hantavirus son virus envueltos que poseen dos glicoproteínas ancladas en la envoltura lipídica, Gn y Gc. Estas son responsables de promover la entrada del virus a la célula; primero permitiendo la unión de la partícula viral a la célula blanco y luego fusionando la membrana viral con la membrana celular donde se forma un poro por donde se libera el material genético del virus al citosol. Este proceso de fusión de membranas es llevado a cabo por la proteína de fusión viral y el mecanismo de fusión propuesto puede resumirse en: (i) acercamiento de ambas membranas dado por cambios conformacionales de la proteína de fusión, (ii) fusión de las monocapas externas de ambas membranas generando un intermediario de hemifusión y (iii) fusión de las monocapas internas formándose el poro de fusión. En nuestro laboratorio se determinó que la glicoproteína de envoltura Gc de los hantavirus corresponde a la proteína de fusión y que comparte características estructurales con proteínas de fusión clase II. Diversos estudios con otras proteínas de fusión han encontrado que el dominio transmembrana (TM), que ancla la proteína a la membrana viral, cumple un rol importante en el proceso de fusión, específicamente en la transición desde el paso de hemifusión a la formación y expansión del poro. Además, han evidenciado que el dominio TM de cada proteína posee propiedades específicas que le permiten cumplir un rol esencial en esta etapa del proceso fusogénico. Por esto, en este seminario de título se planteó caracterizar los requerimientos de la secuencia aminoacídica del dominio TM de la proteína Gc de ANDV que promueven la hemifusión y la fusión de membranas. Para ello, se construyeron tres mutantes de delección del largo del dominio TM, Gc- Δ 1TM, Gc- Δ 2TM y Gc- Δ 3TM, y dos mutantes de sustitución de residuos

aislados, Gc-S470A y Gc-S475A. Se encontró que todas las mutantes fueron sintetizadas y se acumularon en la membrana plasmática de células eucariontes transfectadas. Sin embargo, utilizando un ensayo de formación de sincicios, se encontró que sólo las mutantes Gc- Δ 1TM y Gc-S475A presentaron actividad fusogénica. Para analizar si las mutantes quedaron detenidas en un estado intermediario, se desarrolló un ensayo de traspaso de lípidos. Este permitió detectar que todas las mutantes no fusogénicas quedaron detenidas en el estado intermediario de hemifusión. Estos resultados indican que el dominio TM de Gc de ANDV cumple un rol crucial en el proceso de fusión, específicamente en la formación y expansión del poro desde el intermediario de hemifusión. Además, se demostró que el dominio TM de Gc de ANDV posee propiedades intrínsecas, tanto en el largo donde se requieren 21 residuos de 22 y en la secuencia siendo el residuo S470 crítico para promover la transición hemifusión-fusión del proceso fusogénico.

2. ABSTRACT

The Andes virus (ANDV) belongs to the *Hantavirus* genus and is distributed in Chile and Argentina. These viruses are enveloped by a lipid membrane in which they anchor two glycoproteins, Gn and Gc. These envelope proteins are responsible for promoting the entry of the virus into the cell; by binding of the viral particle to the target cell and by fusing the viral membrane with a cellular membrane, thereby forming a fusion pore through which the viral genome is released into the cytosol. This fusion process is driven by viral fusion proteins and the proposed fusion mechanism can be summarized as follows: (i) approaching of the opposed membranes through conformational changes in the fusion protein, bringing the target and viral membrane into closer proximity; (ii) merging of the proximal leaflets of the two bilayers, generating an intermediate termed hemifusion and (iii) fusion of the inner leaflets, leading to a fusion pore. In previous work, our laboratory determined that Gc of hantaviruses corresponds to the viral fusion protein that it shares structural features with class II fusion proteins. Studies with other fusion proteins showed that the transmembrane domain (TM), which anchors fusion proteins to the viral membrane, has specific properties that vary among them. Further, it has been found that this domain plays an important role in the fusion process, specifically in the transition from the hemifusion state to the pore formation and expansion. Based on this data, the aim of this thesis was to characterize which features of the amino acid sequence of the ANDV Gc TM domain are required to support the hemifusion and fusion of cell membranes. To this end, different Gc-TM mutants were constructed; three deletion mutants, Gc- Δ 1TM, Gc- Δ 2TM and Gc- Δ 3TM, and two residue substitution mutants, Gc-S470A and Gc-S475A. The obtained results show that all the mutants were synthesized and accumulated at the plasma membrane of

transfected eukaryotic cells. However, using a syncytium formation assay, it was found that only the Gc- Δ 1TM and Gc-S475A mutants were fusion active. To analyze if the fusion inactive mutants were arrested in an intermediate state of the fusion mechanism, a lipid transfer assay was developed. This assay showed that all non-fusogenic mutants were retained in the hemifusion intermediate. These results indicate that the TM domain of ANDV Gc plays a crucial role in the fusion process, specifically in the transition from the hemifusion state to the fusion pore formation and expansion. Furthermore, the results provide evidence that the ANDV Gc TM domain has intrinsic properties; 21 of 22 residues were required in length and the specific residue S470 was critical to support the transition from the hemifusion of membranes to the fusion pore formation.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Antecedentes sobre los hantavirus

La familia *Bunyaviridae* está compuesta por más de 300 virus que infectan plantas, artrópodos, animales y humanos (Jonsson y col., 2010). Estos se clasifican en cinco géneros, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus*, *Tospovirus* y *Hantavirus*, donde los virus pertenecientes a este último son los únicos que no son transmitidos al humano por insectos, sino por roedores, su reservorio natural (Hussein y col., 2011). Desde estos pueden ser transmitidos a los seres humanos a través de la inhalación de aerosoles de heces, orina y/o saliva de ratones infectados (Hardestam y col., 2008).

De los miembros que componen el género *Hantavirus*, existen por lo menos 21 especies que causan enfermedades en humanos. En roedores, el virus puede establecer una infección persistente y asintomática (Jonsson y col., 2010). Las enfermedades causadas en humanos varían según la ubicación geográfica de los roedores que los portan. En Europa y Asia la infección por hantavirus causa principalmente la enfermedad denominada Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (FHSR), la que tiene tasas de mortalidad de entre <1% a 12% y se estima que hay hasta 200.000 casos anuales (Bi y col., 2008). Entre los agentes causantes destacan los virus Hantaan (HTNV), Dobrava (DOBV) y Puumala (PUUV).

Por otro lado, los hantavirus ubicados en América causan el Síndrome Pulmonar asociado a Hantavirus (HPS), enfermedad mucho menos frecuente, pero con una tasa de mortalidad más alta que alcanza el 40% y que se caracteriza por un rápido inicio de edema pulmonar seguido de insuficiencia respiratoria y shock cardiogénico (Macneil y col., 2011). Los virus más representativos de esta zona son el virus Sin Nombre (SNV),

que se ubica principalmente en EEUU y en México, y el virus Andes (ANDV), que se distribuye en Chile y Argentina (Hart & Bennett, 1999).

El virus Andes es portado por el roedor *Oligoryzomys longicaudatus* y es el único miembro del género *Hantavirus* del cual se han reportado casos de transmisión entre humanos (Padula y col., 1998; Martínez y col., 2005). Además, la infección en hámsters sirios por este hantavirus produce una enfermedad fatal cuyas características, como los síntomas clínicos o la histopatología en los pulmones, son muy parecidas a la enfermedad que se produce en los humanos (Hooper y col., 2001).

Dado que hasta la fecha no existen vacunas para tratar la enfermedad causada por los hantavirus (Schmaljohn, 2009), estas características del virus Andes lo hacen un modelo de estudio interesante para investigar la transmisión, la infección y un posible tratamiento.

3.2 Organización genómica y estructura de los hantavirus

A pesar de que los miembros pertenecientes al género *Hantavirus* presentan diferencias en su ubicación geográfica y en las enfermedades que pueden producir al infectar humanos, estos poseen una organización genómica y estructura viral común (Fig. 1).

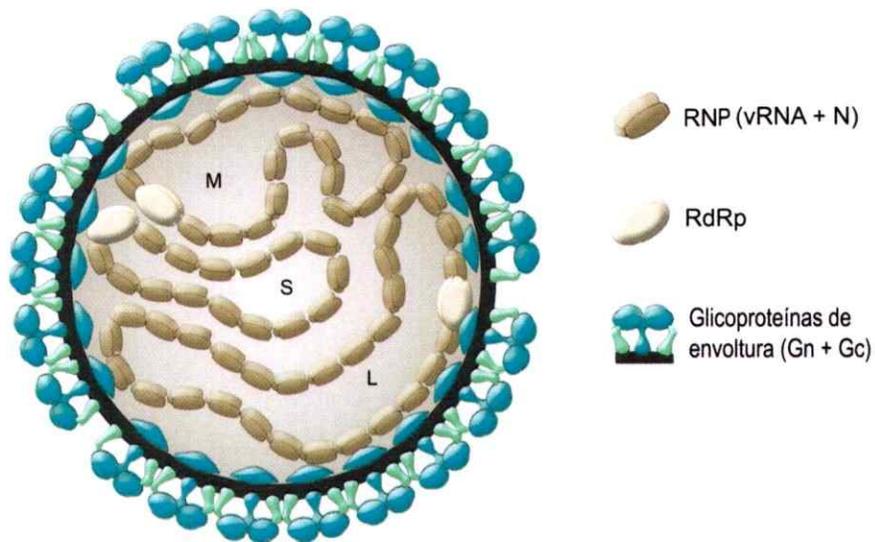


Figura 1. Representación esquemática de una partícula viral de hantavirus. En la figura se indican los tres segmentos del genoma viral encapsidado con la proteína N y asociado a la RdRp. La parte externa está formada por una bicapa lipídica en la cual se encuentran ancladas las glicoproteínas Gn y Gc. Figura adaptada de (Cifuentes-Muñoz y col., 2014).

Las partículas virales de los hantavirus tienen una forma generalmente esférica, con un diámetro que varía entre los 120 y los 160 nm (Huiskonen y col., 2010). También, se ha reportado la presencia en menor grado de partículas elongadas.

El genoma viral consta de tres segmentos de ARN de hebra simple con polaridad negativa. El segmento más pequeño o S codifica la nucleoproteína (N) que encapsida el ARN viral. El segmento medio o M codifica un precursor GPC que al ser procesado mediante digestión proteolítica en el retículo endoplasmático genera las glicoproteínas de envoltura viral Gn y Gc. El segmento más grande o L codifica la ARN polimerasa

dependiente de ARN (RdRp) responsable de la replicación y transcripción viral (Hussein y col., 2011).

Cada segmento del ARN viral se encuentra recubierto por múltiples moléculas de la proteína N, formando tres estructuras superenrolladas de distintos tamaños y de apariencia circular denominadas ribonucleoproteínas (RNP), a las cuales se cree que se encuentra asociada la RdRp (Obijeski y col., 1976a; Obijeski y col., 1976b).

Estas estructuras están cubiertas por una bicapa lipídica que es adquirida al momento de la gemación, en la cual se encuentran ancladas las glicoproteínas virales Gn y Gc, ordenadas localmente en forma de tetrámeros de heterodímeros simétricos que aparecen como proyecciones o espículas (*spikes*) en la superficie del virión (Huiskonen y col., 2010).

3.3 Entrada de los hantavirus a la célula

El ciclo infeccioso de los hantavirus comienza cuando la partícula viral reconoce y se adhiere a la superficie de la célula blanco. Estas son principalmente células endoteliales, aunque también se ha reportado que los hantavirus pueden infectar células epiteliales, macrófagos y células dendríticas (Yanagihara & Silverman 1990; Pensiero y col., 1992; Raftery y col., 2002; Jonsson y col., 2010).

El reconocimiento de la partícula viral hacia estas células determinadas está dado por la presencia de factores de unión específicos ubicados en la superficie celular. Para el caso de los hantavirus, se han descrito diversas proteínas celulares que podrían actuar como receptores y que determinan el tropismo del virus. Una de ellas son las integrinas β_3 , proteínas que se encuentran abundantemente en la superficie de células

endoteliales y que están involucradas en la adhesión entre células, entre otras funciones (Loftus y col., 1994; Gavrilovskaya y col., 1998; Gavrilovskaya y col., 1999). Otro factor que se ha identificado es DAF/CD55 (*decay-accelerating factor*) el cual es un factor regulador del sistema del complemento y que se encuentra ubicado exclusivamente en la cara apical de células epiteliales polarizadas (Krautkrämer & Zeier, 2008). Además de estas dos moléculas, se ha demostrado que la unión e infección de los hantavirus depende *in vitro* de la expresión de gC1qR/p32, una proteína que está presente en diversos tipos celulares y que se ha visto que interacciona con variadas proteínas virales (Choi y col., 2008).

La unión de la partícula viral a la superficie de la célula hospedera provoca la activación de diversas vías de señalización celulares que gatillan la internalización del virión a través de la vía endocítica (Mercer y col., 2010). Existen varios mecanismos de endocitosis y se ha evidenciado que distintos miembros del género *Hantavirus* ocupan mecanismos diferentes. Por ejemplo, se ha propuesto que la entrada a la célula del virus Hantaan utiliza la vía de endocitosis dependiente de clatrina (Jin y col., 2002), mientras que se cree que el virus Andes no usa este tipo de vesículas recubiertas (Ramanathan & Jonsson, 2008).

Una vez internalizado, el virus sigue la ruta endocítica hasta que la disminución del pH dada por la maduración de las vesículas endocíticas desencadena entre otros posibles factores, la activación de la proteína de fusión viral. El pH al cual ocurre esta activación varía entre los distintos virus, pero se ha determinado que HNTV requiere un pH de 6.3 mientras que ANDV necesita un pH de 5.8 (Ogino y col., 2004; Cifuentes-Muñoz y col., 2011).

Finalmente, la proteína de fusión activada induce la fusión de la membrana viral con la membrana del endosoma formándose un poro por el cual se libera el material genético del virus hacia el citoplasma celular (Mercer y col., 2010).

3.4 Mecanismo de fusión de membranas inducido por proteínas de fusión virales

La fusión entre la membrana viral y la membrana del endosoma es el proceso por el cual las dos bicapas lipídicas se unen para formar una sola. En este contexto, es de crucial importancia mantener la integridad de ambas membranas, por lo que es necesario que el virus haga frente de alguna manera controlada las fuerzas repulsivas que impiden que este proceso ocurra espontáneamente (Plempner, 2011).

Esto se logra gracias a las proteínas de fusión virales, las que inducen la fusión de dos membranas usando la energía libre que se libera producto de una serie de cambios conformacionales producidos por la interacción con otras proteínas o por la exposición a pH ácido, entre otros (LeDuc & Shin, 2000; Kielian & Rey, 2006).

Pese a que las proteínas de fusión virales muestran una variedad de estructuras moleculares distintas, múltiples estudios sugieren que todas ellas producen la fusión entre dos membranas mediante un mecanismo común (Harrison, 2008).

El mecanismo de fusión propuesto se muestra en la Fig. 2, y se cree que comienza cuando la proteína de fusión sufre distintos cambios conformacionales que exponen un dominio llamado péptido de fusión. Este se inserta en la membrana blanco estableciendo el primer contacto entre ambas membranas (Fig. 2.B). Posteriormente, se cree que este intermediario extendido trimeriza y colapsa acercando ambas membranas (Fig. 2.D). En esta etapa, el péptido de fusión que está inserto en la

membrana blanco comienza a aproximarse a la región transmembrana (TM) que está anclada en la membrana viral, adoptando una conformación tipo horquilla. Es altamente probable que estos cambios conformacionales de la proteína de fusión deformen ambas membranas, produciendo la fusión de las capas externas de estas (Fig. 2.E). Este intermediario denominado hemifusión se caracteriza por presentar mezcla de los lípidos de las caras externas de las membranas sin que exista mezcla de los contenidos internos de ambos compartimientos.

Posteriormente se cree que se produce la fusión de las caras internas de las membranas, formándose un poro de fusión el cual finalmente se expande para dar paso a las ribonucleocápsides del virus que se liberarán al citosol celular (Fig. 2.F). La disposición post-fusión que adquiere la proteína de fusión coloca el dominio TM y el péptido de fusión en la misma membrana de forma yuxtapuesta, conformación que es energéticamente más estable que la conformación pre-fusión para la mayoría de las proteínas de fusión virales caracterizadas (Kielian & Rey, 2006; Harrison, 2008; White y col., 2008).

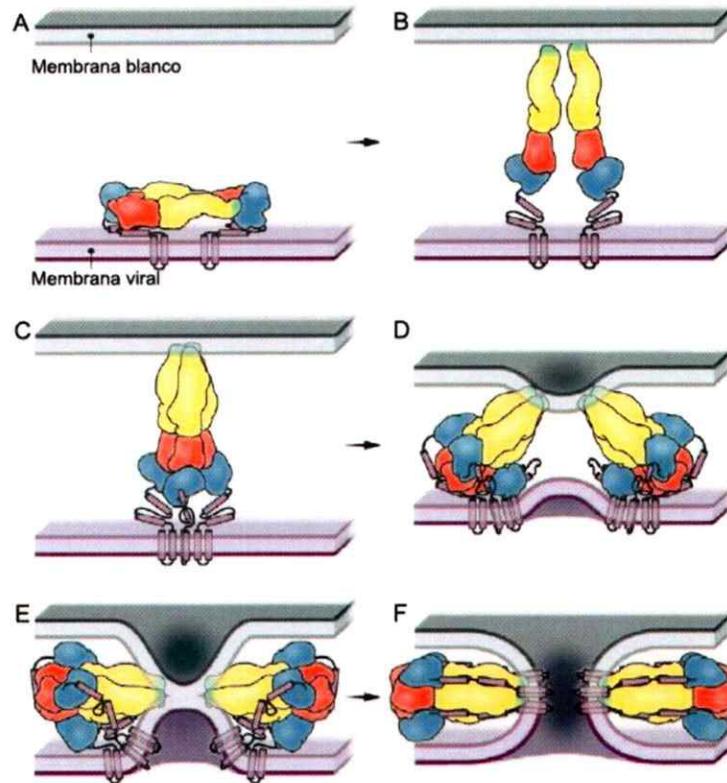


Figura 2. Mecanismo de fusión de membranas inducido por proteínas de fusión virales.

En A se muestra la conformación pre-fusión de la proteína de fusión, en donde el péptido de fusión (de color verde) se encuentra escondido. En B y C se muestra el intermediario extendido en forma de monómeros y trímeros, el que se adquiere cuando el péptido de fusión se expone y se ancla en la membrana blanco. En D se indica el colapso del intermediario extendido y el comienzo del acercamiento entre ambas membranas. En E, tras la aproximación de la membrana viral con la membrana blanco dado por el acercamiento del péptido de fusión y el dominio TM, se indica la fusión de las caras externas de las membranas (de tono claro), manteniendo las caras internas (tono oscuro) intactas lo cual evita la mezcla de los contenidos internos. Este intermediario se denomina estado de hemifusión, el cual posteriormente colapsa, permitiendo la fusión de las caras internas de las membranas mediante la cual se forma un poro de fusión, mostrado en F. Figura adaptada de (Pierson & Kielian, 2013).

3.5 Proteínas de fusión virales

Las proteínas de fusión virales se han clasificado en tres distintas clases de acuerdo a sus estructuras (Fig. 3). Las proteínas de fusión clase I están compuestas principalmente de α -hélices y se encuentran en forma de trímeros en su conformación pre y post-fusión. El péptido de fusión se encuentra ubicado en el extremo N-terminal o cercano a esta región. Las proteínas de fusión más caracterizadas clasificadas dentro de esta categoría son la proteína hemaglutinina (HA) del virus influenza y la proteína gp41 del virus HIV (White y col., 2008).

Las proteínas de fusión clase II poseen tres dominios globulares, los cuales están esencialmente constituidos de sábanas β . En este caso, el péptido de fusión no se encuentra en la región N-terminal, sino que corresponde a una horquilla que se ubica en el dominio II de la proteína. Las proteínas de fusión E de los flavivirus y E1 de los alphavirus se catalogan dentro de esta categoría (Kielian & Rey, 2006).

Por otro lado, las proteínas de fusión clase III combinan los dos elementos estructurales (hélices α y sábanas β) y poseen dos horquillas de fusión, cada una localizada en el extremo de una sábana β . Dentro de este grupo se encuentran la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) y la glicoproteína gH del virus herpes simple (HSV) (Weissenhorn y col., 2007).

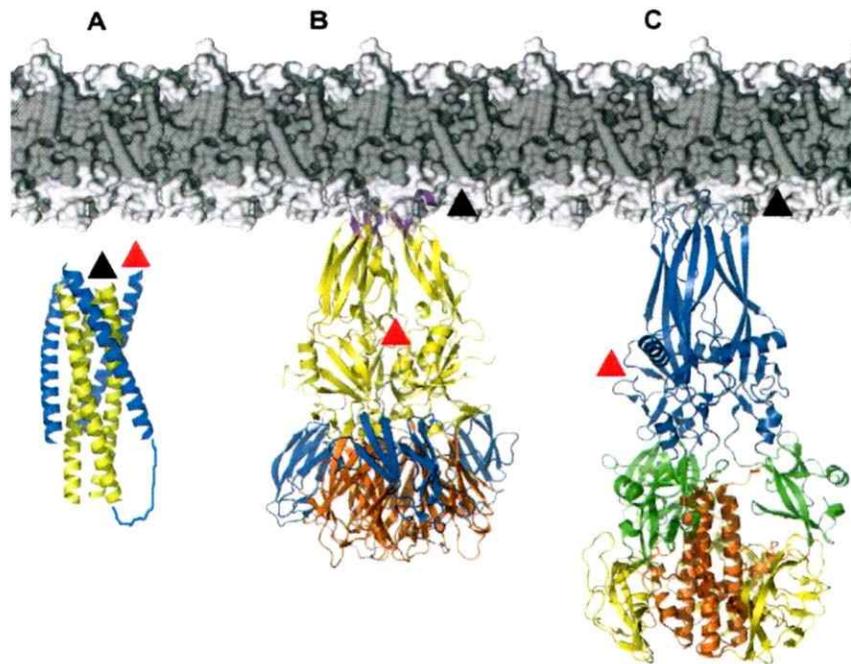


Figura 3. Estructuras representativas de las distintas clases de proteínas de fusión. Se muestran las conformaciones post-fusión de la proteína gp41 de HIV-1 correspondiente a clase I (en A), de la proteína E de un Flavivirus correspondiente a clase II (B) y de la proteína G de VSV correspondiente a clase III (C). Con flechas rojas se indica la posición de la región pre-TM y con flechas negras la del péptido de fusión. Figura tomada de (Weissenhorn y col., 2007).

Estudios *in vitro* e *in silico* realizados en nuestro laboratorio identificaron a la glicoproteína de envoltura Gc de los hantavirus como la proteína de fusión, la cual comparte características con las proteínas de fusión clase II (Tischler y col., 2005). Paralelamente, para el virus la Crosse, otro Bunyavirus (genero *Orthobunyavirus*) también se asoció la actividad fusogénica con esta glicoproteína de envoltura y se relacionó a proteínas de fusión clase II (Plassmeyer y col., 2005). Estas evidencias fueron recientemente corroboradas para el virus RVFV (*Rift Valley fever virus*), otro

Bunyavirus (genero *Phlebovirus*), al obtenerse la estructura cristalográfica de la proteína Gc la cual reveló una arquitectura concordante con las proteínas de fusión clase II (Dessau & Modis, 2013).

A pesar de las distintas estructuras que presentan las proteínas de fusión, todas poseen diferentes dominios funcionales en posiciones equivalentes que son esenciales en distintas etapas del proceso de fusión. Uno de ellos es el péptido de fusión, dominio que generalmente es rico en glicinas y residuos hidrofóbicos (Earp y col., 2005). Este es expuesto cuando la proteína de fusión viral es activada y se inserta en la membrana blanco, en algunos casos gracias a las interacciones hidrofóbicas que genera con las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos que forman la membrana (Chernomordik & Kozlov, 2008; Modis, 2013). Estudios han demostrado que al mutar residuos altamente conservados de este dominio se altera la actividad fusogénica (Horvath & Lamb, 1992; Qiao y col, 1999; Plassmeyer y col., 2007; Cifuentes-Muñoz y col., 2011). Otra región importante es la región pre-TM o troncal que conecta el ectodominio con el dominio TM. Se ha visto que esta desestabiliza membranas y que deleciones o sustituciones de residuos conservados pueden afectar la actividad fusogénica de la proteína (Salzwedel y col., 1999; Jeetendra y col., 2002; Lorizate y col., 2008). Además de las dos regiones ya mencionadas, se ha asociado una tercera región con un rol importante en el proceso de fusión, el dominio TM. Esta región ancla el ectodominio de la proteína de fusión a la membrana viral y suele ser una hélice α única, ubicada en la zona C-terminal de la proteína, aunque existen proteínas de fusión que están compuestas por dos de estas hélices (Fritz y col., 2011; Nikolaus & Herrmann 2012).

3.6 Dominio TM y su rol en la formación del poro de fusión

Diversos estudios han demostrado que el dominio transmembrana de las proteínas de fusión virales cumple un rol clave en el proceso de fusión de membranas, posiblemente en la formación y expansión del poro desde el intermediario de hemifusión. Sin embargo, cada proteína de fusión viral posee aparentemente características particulares en este dominio que le permiten cumplir este rol (ver abajo).

3.6.1 Dominio TM de gp41 de HIV y SIV

Los primeros indicios de esta relación fueron los mostrados con mutantes de distintas proteínas de fusión virales de clase I. El primer acercamiento fue realizado por Helseth y col. en el año 1990 en los estudios realizados con el complejo glicoproteico de envoltura del virus HIV-1. Para ello se basaron en un ensayo de fusión célula-célula que conlleva a la formación de células multinucleadas denominadas sincicios a través del co-cultivo de células que expresan las proteínas gp120/gp41 silvestre con células humanas que expresan CD4+. Cuando generaron mutaciones puntuales en ciertos residuos cargados positivamente o introdujeron 3 residuos extra en el dominio TM de gp41, no se observaron sincicios, indicando la importancia de este dominio en el proceso de fusión de membranas (Helseth y col., 1990).

El requerimiento de un anclaje específico de la gp41 TM de HIV para la actividad fusogénica fue también evidenciada en experimentos que muestran la deficiencia en la formación de sincicios de quimeras en donde se reemplazó el TM de esta por el mismo dominio de la proteína G de VSV o por el de la glicoproteína A (Weiss & White 1993; Owens y col., 1994; Miyauchi y col., 2005) y también cuando se reemplazó por un



ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estos glicolípidos están embebidos solamente en la cara externa de la bicapa lipídica y se añaden post-traduccionalmente a diversas proteínas celulares que se ubicarán en esa zona de la membrana plasmática (Paulick & Bertozzi, 2008).

Experimentos con mutantes de delección parcial o completa del dominio TM de gp41 de HIV mostraron que se requieren por lo menos 18 de 25 residuos para mantener la actividad fusogénica de la proteína (Dubay y col., 1992; Weiss & White 1993; Owens y col., 1994; Yue y col., 2009), indicando que hay un requerimiento del largo del dominio TM para promover la fusión completa.

Conclusiones similares se han obtenido con mutantes de delección del segmento TM de la proteína gp41 del virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), en donde se necesitan como mínimo 23 de los 26 residuos totales para que la proteína induzca la fusión de las caras externas e internas de dos membranas (West y col., 2001; Lin y col., 2003).

Todos estos resultados muestran que el segmento TM de estas proteínas de fusión está involucrado directamente en la fusión entre dos membranas y que hay requerimientos del largo y de la secuencia de este que permiten esta actividad fusogénica.

3.6.2 Dominio TM de HA del virus influenza

Kemble y col. en 1994 sugirieron que este dominio de la proteína HA del virus influenza cumpliría un rol crucial durante el proceso de la formación del poro de fusión. Para investigar esto evaluaron la actividad fusogénica de HA acoplado a GPI y encontraron que esta promovió la transferencia de lípidos entre las caras externas de dos



membranas, pero no medió la mezcla de los contenidos internos, demostrando por primera vez que el proceso de fusión de membranas llevado a cabo por la proteína viral HA procede vía un intermediario de hemifusión (Kemble y col., 1994). A estos resultados se suman las investigaciones por mediciones eléctricas que demostraron que GPI-HA no induce la formación de un poro de fusión, revelando que la formación de estos ocurre luego del intermediario de hemifusión y que el dominio TM es un elemento crítico en la formación y expansión de este (Melikyan y col., 1995; Melikyan y col., 1997). No obstante, investigaciones posteriores con esta mutante mostraron que es factible la formación de un pequeño poro de fusión bajo condiciones específicas de pH, composición lipídica de la membrana y temperatura (Markosyan y col., 2000).

El estado intermediario de hemifusión nunca se ha reportado en investigaciones con mutantes de la proteína gp41, pese a las deficiencias que se han observado en su actividad fusogénica (Lin y col., 2003; Miyauchi y col., 2005; Shang & Hunter 2010).

Resultados obtenidos con quimeras de HA en donde se sustituyó el segmento TM por el correspondiente de la proteína G de VSV, de la glicoproteína C de HSV-1 (Roth y col., 1986), por el del receptor de poli-inmunoglobulina (pIgR), o por el de la proteína E del virus Rous sarcoma (Melikyan y col., 1999) mostraron actividad fusogénica similar a la de la proteína silvestre, al igual que los resultados obtenidos con las quimeras en donde se intercambió el segmento TM por el de la proteína F del virus Sendai, por el de CD4 o por péptidos derivados de las proteínas citoplasmáticas NF1 y Rab8, cuyas secuencias y largos son distintos de los del endógeno (Kozerski y col., 2000; Schroth-Diez y col., 2000). Estas evidencias, al contrario de lo observado con la glicoproteína de fusión gp41, indican que para que ocurra la fusión completa de dos membranas promovida por la proteína de fusión viral HA, no se requiere un largo específico del

dominio TM, aunque si debe por lo menos atravesar más de una sola cara de la bicapa lipídica.

Posteriormente, Armstrong y col. determinaron que al igual que para el caso de gp41, se requiere un largo mínimo del segmento TM de HA para mantener su actividad fusogénica completa, siendo este de 17 de un total de 27 residuos. Largos del TM inferiores a este mantienen a HA en el estado de hemifusión. Además, establecieron que se necesitan por lo menos 15 aminoácidos para que la proteína se acumule en la membrana plasmática (Armstrong y col., 2000).

Aparte de estos estudios sobre el largo requerido del segmento TM de HA, existen estudios que muestran que existen residuos específicos en este dominio que soportan la actividad fusogénica.

Para el caso de HA, la sustitución de dos residuos glicina y/o serina altamente conservados entre las distintas cepas generaron distintos efectos en la actividad fusogénica (Tabla 1). Se encontró que la sustitución G520L detuvo HA (H2N2) en estado de hemifusión, no así la sustitución G530W que mantuvo su actividad fusogénica (Melikyan y col., 1999; Melikyan y col., 2000a). No obstante, al introducir mutaciones similares a HA proveniente de otra cepa (H3N2) en los residuos análogos a las dos glicinas se mantuvo la actividad de fusión (Armstrong y col., 2000). Esta evidencia a favor del requisito de residuos específicos en la TM de HA se contradice con reportes de la funcionalidad de las HAs quiméricas en donde se puede sustituir por cualquier TM (ver arriba).

Tabla 1: Actividad fusogénica de distintas proteínas de fusión mutadas en sus residuos glicina conservados del dominio TM.

Proteína	Mutación	Actividad fusogénica	Referencia
HA Influenza (H2N2)	G520S, G520L, G530W	G520S y G530W: fusión completa G520L: detenido en hemifusión	(Melikyan y col., 1999; Melikyan y col., 2000a)
HA Influenza (H3N2)	S194A, S194L, G204A, G204L, S194I/H204L	Fusión completa	(Armstrong y col., 2000)
gp41 HIV	Motivo de glicinas	Fusión completa, aunque no hay infectividad	(Miyachi y col., 2005; Shang y col., 2008; Shang & Hunter 2010)
p15E Mo-MuLV	G616A/V/P	Fusión completa	(Taylor & Sanders, 1999)
E1 SFV	Motivo de glicinas	Fusión completa	(Sjöberg & Garoff, 2003; Liao & Kiellán, 2005)
G VSV	G6,10A ; G6,10L; G6A; G10A	G6A,G10A: fusión completa reducida G6,10A;G6,10L: detenido en hemifusión	(Cleverley & Lenard, 1998)

* Proteínas de fusión separadas por clases. Clase I en el primer recuadro, clase II en el segundo y clase III en el tercero.

3.6.3 Dominios TM de otras proteínas de fusión virales

Análisis de secuencias de segmentos TM de otras proteínas de fusión virales también han encontrado residuos conservados y sustituciones de estos muestran distintos efectos dependiendo de la proteína estudiada (Tabla 1).

Al contrario de toda la información existente con respecto al segmento TM de la proteína de fusión HA y gp41 y su relación con la formación del poro de fusión, hay muy pocos trabajos con otras proteínas de fusión virales.

Para el caso de otras proteínas de fusión clase I se ha encontrado que la delección de 4 de 25 residuos del TM de la proteína p15E del virus de la leucemia murina de Moloney, o al reemplazar este segmento de la proteína de fusión del virus Newcastle por el respectivo dominio del virus Sendai, del sarampión y VSV, eliminan por completo la transferencia lipídica y de contenidos citoplasmáticos (Melikyan y col., 2000b; Gravel y col., 2011).

En el caso de las proteínas de fusión clase III, solo hay información respecto a la actividad fusogénica de VSV. Datos con mutantes puntuales de glicinas conservadas revelaron que al hacer sustitución de estas por separado se ve reducida la actividad de fusión, mientras que la doble sustitución queda detenida en hemifusión (Tabla 1) (Cleverley & Lenard, 1998). Por otro lado, trabajos en donde se sustituyó el TM por GPI o por el TM de otras proteínas fueron inactivadas o redujeron su actividad de fusión sin detenerse en el estado de hemifusión (Odell y col., 1997).

Las proteínas de fusión virales de clase II han sido hasta aquí las menos estudiadas. Se ha visto que al eliminar los dos dominios TM de la proteína E del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBE) o reemplazar el que está en la zona C-terminal por péptidos no relacionados se reduce casi por completo la fusión de virus mutantes con liposomas, mientras que si una o ambas se reemplazan por otros TM la actividad se mantiene igual a la de la proteína silvestre o disminuye levemente, respectivamente (Fritz y col., 2011). Además, como se muestra en la Tabla 1, se determinó que la glicina conservada del TM de E1 del virus Semliki Forest (SFV) no es requerida para mantener su actividad fusogénica (Sjöberg & Garoff, 2003; Liao & Kielian, 2005).

Además del dominio TM, se ha asociado formación y expansión del poro de fusión con la cola citoplasmática o endodominio de las proteínas de fusión virales. Sin embargo, al igual que con el segmento TM, se han mostrado casos en donde la eliminación o modificación de este disminuye la actividad fusogénica y otros donde no hay efectos en la fusogenicidad (Roth y col., 1986; Chakrabarti y col., 1989; Gabuzda y col., 1992; Spies & Compans, 1994; Schroth-diez y col., 1998; Melikyan y col., 1999; Melikyan y col., 2000; Harman y col., 2002; Shi y col., 2007;).

3.6.4 Dominio TM de Gc de ANDV

Considerando todos estos antecedentes y la escasa información que existe sobre el segmento TM de las proteínas de fusión clase II, en nuestro laboratorio se evaluó el rol del endodominio y del segmento TM de la proteína de fusión Gc de ANDV, los cuales están formados por 9 y 22 aminoácidos respectivamente.

Para ello, se realizaron mutantes de delección en donde se eliminó el endodominio (Gc- Δ endo), el endodominio más 4 residuos de TM (Gc- Δ 4TM) y este más 7 residuos (Gc- Δ 7TM). Además, se generó una mutante en donde se intercambió el dominio TM por GPI. Se evaluó si estas son sintetizadas correctamente en células transfectadas, si se acumulan en la membrana plasmática y si son fusogénicas por medio de un ensayo de formación de sincicios. Se encontró que todas las mutantes, excepto GPI-Gc, se sintetizan correctamente. De estas, solo la mutante Gc- Δ 7TM no se acumula en la membrana plasmática y pese a que la mutante Gc- Δ 4TM si lo hace, carece de actividad de fusión (Fig. 4). Sin embargo, Gc- Δ endo disminuye en un 40% aproximadamente la formación de sincicios, revelando que para el caso de Gc de

ANDV, el endodominio no es crucial, pero si influye en la actividad fusogénica de la proteína (Tesis Ana Victoria Sarno, 2011; datos no publicados).

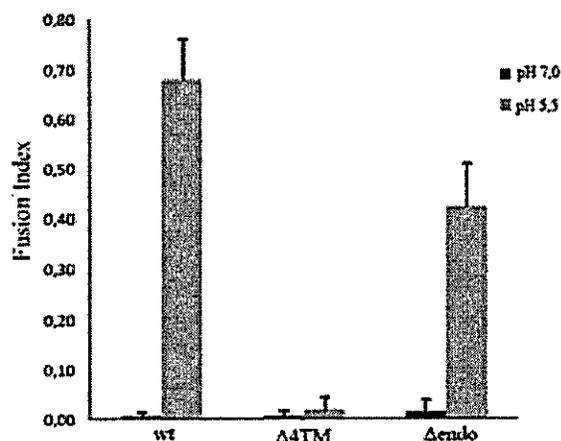


Figura 4. Actividad de fusión entre células mediada por Gc silvestre y mutantes. (Tesis Ana Victoria Sarno, 2011; datos no publicados).

Basándose en estos resultados obtenidos previamente en el laboratorio, en el presente trabajo se caracterizó la actividad fusogénica de nuevas mutantes de deleción del segmento TM comprendidas entre las mutantes Gc-Δendo y Gc-Δ4TM y de mutantes puntuales de dos residuos serina conservados entre los diversos hantavirus, además de determinar si alguna de estas mutantes queda detenida en un intermediario de hemifusión.

4. HIPÓTESIS

El dominio TM de la proteína Gc de ANDV posee propiedades intrínsecas que son requeridas en el proceso de fusión de membranas, específicamente en el paso de hemifusión a la formación del poro.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar los requerimientos de la secuencia aminoacídica del dominio TM de la proteína Gc de ANDV que promueven la hemifusión y la fusión de membranas.

5.2 Objetivos específicos

- Clonar en vector de expresión eucarionte mutantes de delección del largo del dominio TM de Gc.
- Construir mutantes de sustitución de residuos aislados del dominio TM de Gc.
- Analizar expresión, localización y actividad fusogénica de las mutantes expresadas en células eucariontes.

- Desarrollar un ensayo que permita detectar el intermediario de hemifusión.

- Caracterizar las mutantes no-fusogénicas con el ensayo de hemifusión.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Clonamiento de mutantes de delección del largo del dominio TM de Gc de ANDV

Para expresar mutantes de delección del segmento TM de Gc de ANDV en células eucariontes bajo el promotor de citomegalovirus, se inició el clonamiento en el vector de expresión eucarionte pl.18 (provisto por Dr. Jim Robertson, *National Institute for Biological Standards and Control*, UK) a partir de los constructos de delección Gc- Δ 1TM, Gc- Δ 2TM y Gc- Δ 3TM previamente preparados en el laboratorio y clonados en el vector de clonamiento pGEM-T. La secuencia de GPC de ANDV usada proviene del aislado Chi-7913, NCBI gi: 30313865 (Tischler y col., 2003).

Las mutantes Gc- Δ 1TM, Gc- Δ 2TM y Gc- Δ 3TM corresponden a la delección del endodominio de Gc de 9 residuos, además de 1, 2 ó 3 residuos del segmento TM de Gc, respectivamente.

Para ello, los plásmidos pGEMT/Gc- Δ 1TM clon 13, pGEMT/Gc- Δ 2TM clon 7 y pGEMT/Gc- Δ 3TM clon 14 fueron utilizados, correspondiendo a clones positivos confirmados por secuenciación (Macrogen Inc., Korea). Estos fueron digeridos con las enzimas *Xho*I y *Bgl*II (Invitrogen) a 37°C y fueron cargados en un gel de agarosa al 1% (*SeaKem GTG Agarose*, BMA) desde donde se extrajo la banda correspondiente a GPC correspondiente a 3.600 nt por medio de un kit de extracción desde gel (*QIAquick Gel Extraction kit*, Qiagen). El fragmento obtenido de cada mutante fue ligado al vector de expresión eucarionte pl.18 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción y desfosforilado con la enzima SAP siguiendo el protocolo estándar (Promega).

La ligación se transformó en bacterias *E. coli* HB101 competentes con el método de shock térmico las cuales se sembraron en placas de LB con ampicilina. Se inocularon varias colonias de cada mutante en medio LB/ampicilina líquido para extraer ADN plasmidial con la metodología de lisis alcalina. El ADN obtenido se digirió usando las enzimas *Bgl*II y *Xho*I y se cargó en un gel de agarosa al 1% desde donde se corroboró la ligación al plásmido de destino mediante análisis del tamaño de las bandas obtenidas.

De los clones positivos que se obtuvieron se inoculó una alícuota de bacterias en nuevo medio LB/ampicilina y se extrajo ADN plasmidial por medio de un kit de extracción miniprep (*QIAprep Spin Miniprep Kit*, Qiagen) para confirmar la ligación mediante secuenciación (MacroGen Inc.). Finalmente, para cada mutante de delección obtenida correctamente se obtuvo ADN plasmidial con la calidad necesaria para la transfección en células eucariontes usando un kit de extracción Maxiprep (*NucleoBond Xtra Midi/Maxi*, Macherey-Nagel).

6.2 Diseño y construcción de mutantes de sustitución de residuos del dominio TM de Gc de ANDV

6.2.1 Análisis bioinformático del dominio TM de Gc de hantavirus

Se predijeron *in silico* los dominios TM de los hantavirus *Hantaan* (número de acceso a la base de datos de NCBI (gi): 138339), *Puumala* (gi: 138342), *Dobrava-Belgrade* (gi: 38505526), *Seoul* (gi: 38505532), *Sin nombre* (gi: 442409) y *Andes* (gi: 30313865) usando el programa TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html).

Con las secuencias obtenidas se preparó un alineamiento múltiple usando para ello el programa ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) y además se generó una

representación gráfica de conservación de residuos mediante WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>).

6.2.2 Construcción de mutante de sustitución Gc-S470A

Para generar la mutación puntual en el segmento TM donde se intercambió el residuo serina 470 por alanina (Gc-S470A), se diseñaron los partidores SER-FW. 5'- GTT GTG ATA CTC ATC CTC GCT ATA ATA - 3' y SER_RV: 5'- GAA CAC TGA ACA TTA TTA TAG CGA GG - 3'. Estos fueron usados para amplificar el plásmido pGEMT-GPC clon 4 usando la enzima polimerasa *Pfx AccuPrime* (Invitrogen)

Posteriormente, el producto de PCR obtenido se trató con la enzima DpnI (Invitrogen) a 37°C para degradar el ADN molde (metilado) y se usó para transformar bacterias *E. coli* HB101, obtener colonias y extraer ADN plasmidial por kit como se indicó anteriormente para las mutantes de delección. Se enviaron a secuenciar varios clones para corroborar la mutación y se siguió trabajando con los clones positivos para la mutación puntual tal como se explicó anteriormente para las mutantes de delección hasta obtener el segmento GPC con la sustitución S470A en el vector pl.18, confirmado por secuenciación (Macrogen Inc.).

6.2.3 Construcción de mutante de sustitución Gc-S475A

Para obtener la mutante puntual en donde se sustituyó el residuo serina 475 por alanina (Gc-S475A) se envió a sintetizar un segmento de ADN de 879 pb (secuencia adjuntada en sección Anexos 10.1) correspondiente a la zona C-terminal de la secuencia de GPC con la mutación en el codón que codifica este residuo (AGT → GCT), el cual fue generado sintéticamente y clonado con las enzimas de restricción *AvrII* y *XhoI* en el vector pl.18/GPC clon 4 (DNA 2.0 Inc.).

6.3 Expresión de Gc silvestre y mutantes de ANDV en células eucariontes

Se sembraron $6,0 \times 10^5$ células HEK-293FT (línea celular correspondiente a aislados de células de riñón de embrión humano, Invitrogen) en placas de 6 pocillos (Nunc) con medio DMEM suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF, Gibco) y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) en condiciones de cultivo estándar (37°C, 5% CO₂, 95% humedad relativa). Estas fueron transfectadas con cantidades crecientes (1x, 1,5x y 2x; donde 1x corresponde a 1,4 µg) de los plásmidos que expresan Gc silvestre y mutantes usando la metodología de fosfato de calcio (Graham & van der Eb, 1973) y 16 h después se cambió el medio. Además, como control negativo, se transfectó el mismo número de células con 1x del plásmido pl.18 vacío (no codifica ningún gen bajo el promotor de citomegalovirus).

48 h post-transfección las células se desprendieron y se lisaron con buffer de lisis (10 mM HEPES pH 7,5, 3 mM MgCl₂, 40 mM KCl; 0,5% NP40 y 5% glicerol) con inhibidor de proteasa (Roche). Luego se centrifugó a 10.000 g por 20 min a 4°C y se recolectaron los sobrenadantes desde donde se detectó la presencia de Gc y β-actina mediante *western blot* como se indica a continuación.

Se cuantificó la cantidad de proteína presente en los lisados celulares por colorimetría usando el kit comercial *BCA Protein Assay* (Pierce, Thermo Scientific) y se cargaron iguales cantidades de proteína con buffer de carga calentadas por 10 min a 95°C. Se separaron las proteínas por electroforesis en un gel de tris-glicina poliacrilamida al 12,5% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0,2 µg (BioRad). La membrana se bloqueó con leche al 5% en buffer fosfato salino (PBS) y se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-Gc 2H4/F6 (Godoy y col., 2009) a una dilución 1:2.500 en leche al 1% en PBS. Se lavó la membrana 3 veces con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de

rábano (HRP, Sigma) a una dilución 1:5.000 el cual se detectó usando el sustrato quimioluminiscente *SuperSignal West Pico* (Pierce). Además, de la misma manera se detectó la presencia de β -actina como control de carga usando el anticuerpo anti β -actina (Sigma) a una dilución 1:5.000.

6.4 Localización de Gc silvestre y mutantes en la membrana plasmática

$3,5 \times 10^6$ células HEK-293FT fueron sembradas en placas de 10 cm (Corning) en medio DMEM suplementado en condiciones de cultivo estándar y 24 h después fueron transfectadas con las cantidades determinadas previamente de los plásmidos que codifican las proteínas Gc silvestre y los mutantes y pl.18 vacío usando el protocolo de cloruro de calcio (escaladas a este número de células). 48 h post-transfección se separaron las proteínas de membrana de las proteínas citoplasmáticas usando el kit *Cell Surface Protein Isolation Kit* (Pierce) el cual se basa en la biotilación de las proteínas de superficie y su purificación del resto de las proteínas usando la resina neutravidina que posee alta afinidad a la biotina, permitiendo la obtención de la fracción de superficie y la fracción intracelular por separado.

Se detectó la presencia de la presencia de Gc y β -actina en ambas fracciones mediante *western blot* como se indicó anteriormente.

6.5 Ensayo de formación de sincicios mediado por Gc silvestre y mutantes

La actividad de fusión de las mutantes de Gc fue medida con el ensayo de fusión célula-célula establecido previamente por Cifuentes-Muñoz y col. (2011). Este ensayo está basado en la formación de una célula multinucleada denominada sincicio. Esta se forma mediante la fusión de las membranas plasmáticas entre células vecinas

promovida por la proteína de fusión viral Gc anclada en la superficie celular y activada por exposición a bajo pH.

Para ello, se sembraron $2,0 \times 10^4$ células Vero E6 (línea celular derivada de aislados de células epiteliales de hígado de mono verde africano, ATCC CRL1586) en portaobjetos de 16 pocillos (*lab-tek chamber slide*, NUNC, Thermo Scientific) con medio DMEM suplementado en condiciones estándar de cultivo estándar. Al día siguiente se transfectaron con los plásmidos que codifican las proteínas Gc silvestre y mutantes en las proporciones determinadas previamente (en este tipo celular y con este número de células, el término "1x" equivale a 0,5 μ g) usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del producto. 48 h post-transfección se gatilló la activación de la proteína de fusión incubando las células con medio a pH 5,5 por 5 min a 37°C. 3 hrs. después de la exposición a bajo pH, se incubó con 1 μ M de CMFDA (Molecular Probes) en DMEM por 1 h a 37°C y se fijó con PFA al 4%.

Las células fijadas se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-Gc 5D11/G7 a una dilución 1:500 en SBF al 2% por 1,5 h a temperatura ambiente. Se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 555 (Molecular Probes) a una dilución 1:500. Finalmente se marcaron los núcleos con DAPI (Molecular Probes) y se montó con DABCO y un cubreobjetos.

Los sincicios se cuantificaron mediante microscopía de fluorescencia usando un microscopio de epifluorescencia (Olympus BMAX51) acoplado a una cámara digital (ProgRes C3). Para cada muestra se contó el número de células que expresan Gc y de núcleos de al menos 3 campos en cada condición y se calculó el índice de fusión usando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de fusión} = 1 - \frac{n^{\circ} \text{ de células}}{n^{\circ} \text{ de núcleos}}$$

6.6 Detección del intermediario de hemifusión mediado por Gc silvestre y mutantes

Tomando como modelo los experimentos desarrollados por Giraudo y col. (2005), se estandarizó un ensayo con el cual determinar si alguna de las mutantes del segmento TM de Gc queda detenida en el intermediario de hemifusión. Para ello, se evaluó la transferencia lipídica monitoreando el traspaso del gangliósido GM1 al co-cultivar células que presentan esta molécula en la capa externa de la membrana con otras que no lo presentan bajo condiciones fusogénicas (Giraudo y col., 2005).

Células HEK-293FT, que presentan GM1 en la capa externa de la membrana citoplasmática (Qi y col., 2010), fueron sembradas en placas de 12 pocillos (Nunc) en medio DMEM suplementado en condiciones de cultivo celular estándar (250.000 células/pocillo). 24 h después fueron transfectadas con 5 µg de los plásmidos que codifican las proteínas Gc silvestre y mutantes usando lipofectamina 2000 (Invitrogen). 40 h después estas células (denominadas en adelante "efectoras") se pasaron a tubos eppendorf, se centrifugaron a 700 g por 5 min y se resuspendieron en medio nuevo para contarlas. Por otro lado, se sembraron 600.000 células CHO-K1 (línea celular derivada de células epiteliales de ovario de hámster chino, ATCC), que no presentan GM1 en la membrana plasmática (Rosales Fritz y col., 1997), en placas de 6 pocillos con medio F-12K (Gibco) suplementado con 10% SBF. Dos días después, y de forma paralela a las células efectoras, se desprendieron estas células y se incubaron por 40 min a 37°C con el fluoroforo citoplasmático CMAC (Molecular Probes), se centrifugaron a 700 g por 5 min y se incubaron con medio nuevo por 30 min para eliminar el exceso

de fluoroforo. Tras una nueva centrifugación, estas células llamadas en adelante "células blanco", se resuspendieron en medio DMEM y se contaron. Se co-cultivaron células efectoras junto con células blanco a la razón 1:4 en un portaobjetos de 16 pocillos y se activó la proteína de fusión incubando por 5 min con medio bajo pH. Se devolvió a pH neutro con DMEM, tras lo cual se fijó con PFA al 4%. Cada muestra se incubó con la subunidad β de la toxina del cólera, que se une específicamente al gangliósido GM1, conjugada a Alexa Fluor 488 (CTX-488, Molecular Probes) por 30 min a 37°C, se lavó con PBS y se montó con DABCO y un cubreobjetos. Las muestras fueron analizadas por microscopía de fluorescencia confocal (Olympus Fluoview FV1000). Se realizó el mismo procedimiento a muestras sin exponer a bajo pH.

Para cada mutante se tomaron fotografías de 10 campos distintos elegidos al azar y se cuantificó el número de células blanco que exhibía la marca de color verde correspondiente a CTX-488 (CMAC⁺/CTX⁺) y el número de células efectoras que estaban en contacto por lo menos con alguna célula blanco (CTX⁺ en contacto). Con estos datos, para cada imagen se calculó el porcentaje de transferencia de GM1 de acuerdo a la siguiente ecuación y se promediaron los valores obtenidos para determinar el % de transferencia de GM1 de cada mutante.

$$\% \text{ transferencia GM1} = \frac{\text{CMAC}^+/\text{CTX}^+}{\text{CTX}^+ \text{ en contacto}}$$

La significancia estadística entre los datos obtenidos de cada mutante fue calculada mediante la prueba *t-student* considerando significativo un valor de $P < 0,05$, usando para ello el programa GraphPad Prism 5 (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>).

7. RESULTADOS

7.1 Mutantes del dominio TM de Gc de ANDV

Con el fin de determinar cuáles son los requerimientos de la secuencia aminoacídica del dominio TM de la glicoproteína Gc de ANDV necesarios para mantener la actividad fusogénica, se diseñaron mutantes de delección del largo y dos mutantes de sustitución de residuos de este segmento.

7.1.1 Mutantes de delección del largo del dominio TM

Para definir cuál es el largo mínimo del dominio TM de Gc requerido para mediar la fusión entre dos membranas, se continuó con la construcción de tres mutantes de delección de este dominio, Gc- Δ 1TM, Gc- Δ 2TM y Gc- Δ 3TM, comprendidas entre las mutantes Gc- Δ endoTM que de acuerdo a datos previos obtenidos en el laboratorio conserva la actividad fusogénica y Gc- Δ 4TM que carece de actividad de fusión (Tesis Ana Victoria Sarno, 2011; datos no publicados).

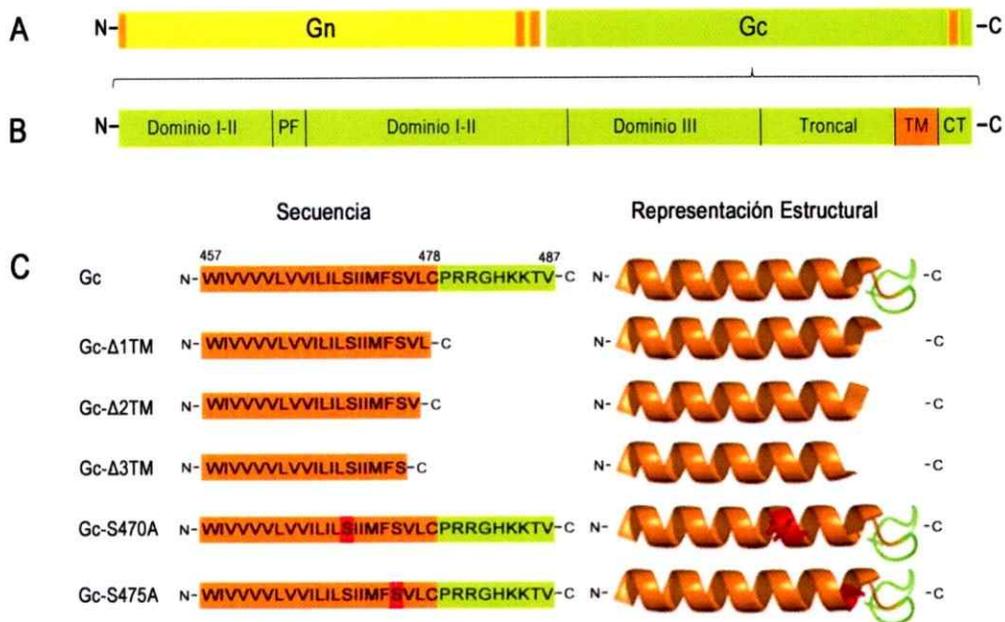


Figura 5. Diseño de mutantes del dominio TM de la proteína Gc de ANDV. En **A** se muestra una representación de la secuencia de GPC de ANDV indicando el sitio de corte WAASA en color blanco y los TM en color naranja. En **B** se representa de forma unidimensional la secuencia de la glicoproteína Gc con sus dominios estructurales. En **C** se muestran las secuencias aminoacídicas y la representación estructural del TM de Gc de ANDV silvestre y de las diferentes deleciones y sustituciones diseñadas. Esta última fue generada en Pymol viewer (<http://www.pymol.org/>) basándose en un modelo molecular generado en colaboración con el Dr. Tomás Pérez Acle y Fernando Abarca del centro de Genómica y Bioinformática, Fundación Ciencia & Vida (datos aún no publicados). El dominio TM se muestra en naranja, el endodominio en verde y los residuos serina sujetos a sustituciones en rojo.

Los mutantes del dominio TM obtenidos se analizaron mediante secuenciación, obteniéndose los clones positivos pl.18/Gc-Δ1TM clon 13.3, pl.18/Gc-Δ2TM clon 7.1 y pl.18/Gc-Δ3TM clon 14.9 (Fig. 6). Las mutaciones de deleción del dominio TM generaron largos finales de 21, 20 y 19 aminoácidos respectivamente.

```

Gc silvestre: 5'-GTAGTGCTTGGTTGTGATACTCATTCTCTCTATCATAATGTTTCAGTGTTCTGTGCCCCAGGAGAG-3'
Gc-Δ1TM:      5'-GTAGTGCTTGGTTGTGATACTCATTCTCTCTATCATAATGTTTCAGTGTTCTG---TAGCTCGAGG-3'
Gc-Δ2TM:      5'-GTAGTGCTTGGTTGTGATACTCATTCTCTCTATCATAATGTTTCAGTGTT-----TAGCTCGAGG-3'
Gc-Δ3TM:      5'-GTAGTGCTTGGTTGTGATACTCATTCTCTCTATCATAATGTTTCAGT-----TAGCTCGAGG-3'
Gc-S470A:     5'-GTAGTGCTTGGTTGTGATACTCATCTCCTATAATAATGTTTCAGTGTTCTGTGCCCCAGGAGAG-3'

```

Figura 6. Secuencia nucleotídica de clones positivos pl.18/GPC con mutaciones en Gc-TM. En la figura se muestra parte del alineamiento de secuencias realizado a los resultados obtenidos de la secuenciación de los clones positivos para las mutaciones Gc-Δ1TM, Gc-Δ2TM, Gc-Δ3TM y Gc-S470A comparado con la secuencia que codifica Gc silvestre. En color gris se resalta el endodominio, en color naranja se señala el codón de término introducido para acortar el segmento TM en las mutantes de delección precedido por los codones eliminados indicados con líneas horizontales y en amarillo se destacan las bases que fueron cambiadas para producir la mutante de sustitución S470A. El primer nucleótido mostrado en el extremo 5' corresponde a 3.334 de la secuencia de GPC de ANDV aislado Chi-7913, NCBI gi: 30313865 (Tischler y col., 2003).

7.1.2 Mutantes de sustitución Gc-S470A y Gc-S475A del dominio TM

Para analizar si existen residuos específicos del segmento TM de Gc de ANDV que puedan ser esenciales para su funcionalidad, se analizó el grado de conservación del dominio TM de las proteínas Gc de diversos hantavirus, los cuales fueron predichos con el programa TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html). Como se ve en la Fig. 7, los segmentos TM de todos los miembros analizados están predominantemente formados por residuos hidrofóbicos o apolares como es de esperarse de una hélice TM (Krishnakumar & London, 2007) y varios de estos, ubicados principalmente en el extremo amino terminal de la secuencia, se encuentran conservados entre todas las secuencias analizadas. Sin embargo, se encontraron tres residuos polares altamente conservados entre los miembros analizados. Uno de estos es un residuo cisteína ubicado en el extremo carboxilo terminal lo que es explicable ya

que estaría ubicado en la zona polar de la bicapa lipídica o incluso podría estar en el espacio interno del virus ya que además no en todas las predicciones obtenidas fue considerado parte del segmento TM (ver Fig. 7 A). Los otros dos son residuos serinas ubicados en la zona centro-carboxilo de las secuencias (posiciones Gc 470 y 475) y que podrían ser análogos a las glicinas y/o serinas que son cruciales en la actividad de fusión de la proteína HA (H2N2) (Melikyan y col., 1999; Melikyan y col., 2000a) y de la proteína G de VSV (Cleverley & Lenard, 1998) las que cuando fueron mutadas por residuos apolares quedaron detenidas en el intermediario de hemifusión.

Basándose en estos antecedentes se construyeron dos mutantes de sustitución de los residuos S470 y S475, intercambiándolos por el residuo apolar alanina, obteniendo las mutantes Gc-S470A y Gc-S475A. La ubicación de las serinas sustituidas se encuentran resaltadas con color rojo en la secuencia y en la representación estructural de la Fig. 5. Asimismo, en la Fig. 6 se muestra el resultado de la secuenciación de la mutante Gc-S470A construida en nuestro laboratorio, verificando la correcta mutación. En este caso, además de cambiar la primera base del codón que codifica para la serina (TCT → GCT), se tuvo que introducir dos mutaciones silentes a las isoleucinas 468 y 471 para evitar la formación de estructuras secundarias internas y la hibridación inter e intra partidores usados en la amplificación, lo cual se muestra destacado con color amarillo. Para la mutante Gc-S475A se sintetizó y clonó un nuevo fragmento de ADN, incluyendo el codón sustituido, el cual se ligó en el plásmido p1.18-GPC clon 4, sustituyendo la misma región silvestre.

A

Virus Puumala (138342)	NMWAVLWVLLILSILLFTLCC -1136
Virus Sin Nombre (442409)	NVWAVLIVILILSILLFSFFC -1130
Virus Andes (30313865)	NVWVWLWVILILSIIMFSVLC -1129
Virus Hantaan (138339)	NIVLIVLCVFLFSLVLLSILC -1127
Virus Seoul (38505532)	NVVLIVLCVLLLFSLILLSILC -1125
Virus Dobrava-Belgrade (38505526)	NIVIVLVVFFFILSLILLSLLC -1127

:: ** .: : : * : : : : . *

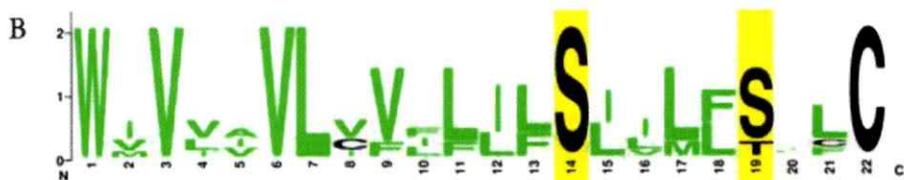


Figura 7. Alineamiento de los dominios TM de Gc de distintos hantavirus. En A se muestra el alineamiento realizado con el programa ClustalW. La predicción *in silico* del dominio TM (color naranja) de la proteína Gc de los hantavirus *Hantaan*, *Puumala*, *Dobrava-Belgrade*, *Seoul*, *Sin Nombre* y *Andes*, se realizó con el programa TMPred. Entre paréntesis se muestra el número de acceso en *GenBank* (gi) para cada hantavirus. En el extremo carboxilo-terminal de cada secuencia se indica el número del último residuo mostrado. El asterisco (*) indica 100% conservación entre residuos, dos puntos (:) indica sustituciones conservadas y un punto (.) indica sustituciones menos conservadas. En B se observa la representación en logo del alineamiento realizado, indicándose en color negro los residuos neutros polares, polares o hidrofílicos y en color verde los residuos apolares o hidrofóbicos. Mientras mayor es el tamaño de la letra, mayor grado de conservación.

7.2 Síntesis de Gc silvestre y mutantes en células eucariontes

La estrategia experimental para estudiar el rol del dominio TM de ANDV durante la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal, contempla el uso de un sistema de expresión eucarionte que permite caracterizar la i) expresión, plegamiento,

transporte a membrana, ii) actividad fusogénica y iii) detección de un intermediario de hemifusión, tanto de la proteína Gc silvestre, como de las mutantes construidas.

Así, en primer lugar se analizó la expresión de la proteína de fusión para lo cual se transfectaron células HEK-293FT con los plásmidos codificantes de Gc silvestre y mutantes. 48 h después se preparó un lisado celular de estas con el fin de analizar la presencia de Gn y Gc mediante *western blot*.

Como se observa en la Fig. 8, todas las mutantes de Gc-TM fueron sintetizadas y expresadas en las células transfectadas, presentando un patrón de migración similar a la proteína silvestre en el gel de poliacrilamida, correspondiente a 55 kDa. Sin embargo, se puede observar una pequeña disminución en la migración de las bandas de las mutantes de delección Gc- Δ 1TM, Gc- Δ 2TM y Gc- Δ 3TM, que se corresponde con la eliminación de 10, 11 y 12 residuos respectivamente.

Además, se tituló la cantidad de cada plásmido a transfectar para ajustar la expresión de cantidades similares de las proteínas Gc silvestre y mutantes en lisados celulares para generar resultados cuantitativamente comparables en los siguientes experimentos. Al analizar las bandas obtenidas para las distintas cantidades de ADN plasmidial transfectado, se observa en la mayoría de los casos una tendencia de aumento de la cantidad de Gc mutante al aumentar la cantidad de ADN transfectado de cada plásmido (Fig. 8).

Basado en estos resultados, se estableció que es necesario transfectar 1,4 μ g de plásmido para el caso de pl.18/Gc- Δ 1TM, pl.18/Gc- Δ 2TM, pl.18/Gc-S470A y pl.18/Gc-S475A y 2,1 μ g en el caso de pl.18/Gc- Δ 3TM para obtener cantidades equivalentes de proteína Gc en lisados celulares, cantidades que se ocuparon en los siguientes experimentos.

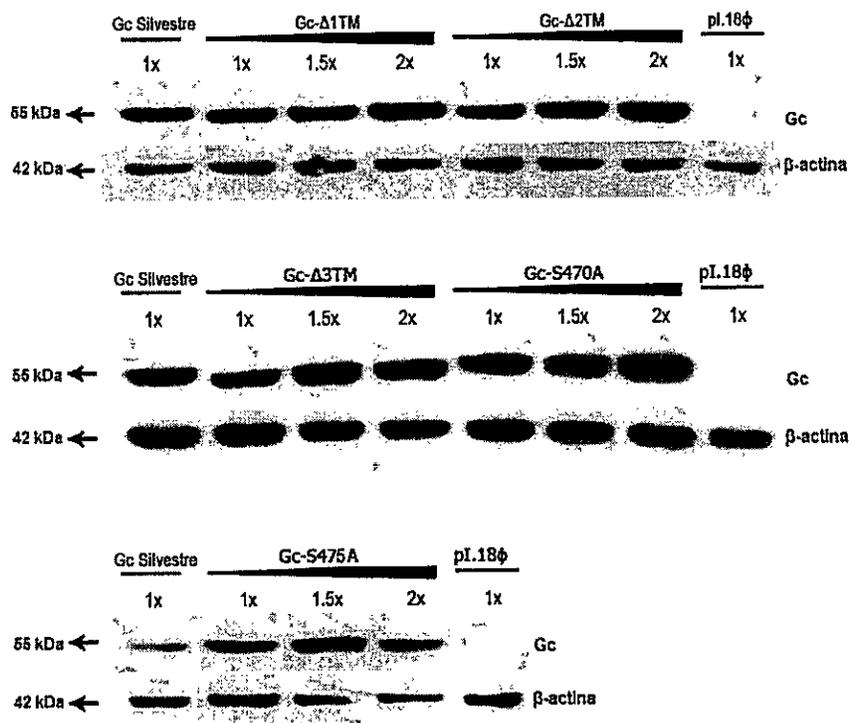


Figura 8. Síntesis de Gc silvestre y mutantes en células eucariotas. *Western blot* de lisados celulares de células HEK-293FT transfectadas con cantidades crecientes de pI.18/GPC silvestre o mutante del segmento TM de Gc utilizando el anticuerpo 2H4/F6. Como control se marcó además con anti β-actina. 1x corresponde a 1,4 μg, 1,5x a 2,1 μg y 2x a 2,8 μg de ADN plasmidial.

7.3 Acumulación de Gc silvestre y mutantes en membrana plasmática

Una vez determinado que las mutantes estudiadas son sintetizadas y expresadas en las células transfectadas, se procedió a estudiar si estas proteínas son plegadas correctamente mediante su transporte y acumulación en la membrana citoplasmática (Cifuentes-Muñoz y col., 2011). Para ello, 48 h post-transfección se biotinilaron las proteínas de superficie celular y se separaron de las proteínas citoplasmáticas usando una columna con neutravidina, compuesto que posee alta afinidad a la biotina. Luego

de la separación de ambas fracciones, se verificó mediante *western blot* la presencia de Gc y actina en cada fracción (Fig. 9).

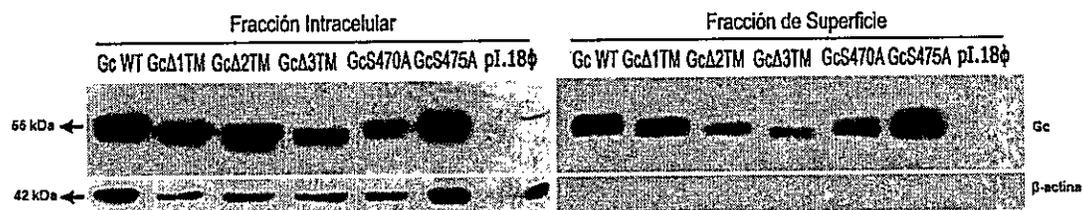


Figura 9. Acumulación de Gc en la membrana citoplasmática de células eucariontes. La superficie de células HEK-293FT expresando Gc silvestre o mutantes fue biotinilada 48 h post-transfección y separada de la fracción intracelular mediante resina de neutravidina. Ambas fracciones fueron analizadas mediante *western blot* con anticuerpos anti-Gc 2H4/F6 (arriba), anti β -actina (abajo).

Se puede observar que todas las mutantes del dominio TM de ANDV fueron transportadas y acumuladas en la membrana plasmática de las células transfectadas, además de migrar de forma similar a la proteína silvestre, salvo por una pequeña disminución del tamaño en las mutantes Gc- Δ 1TM, Gc- Δ 2TM y Gc- Δ 3TM que se corresponde con la delección de 10,11 y 12 residuos, respectivamente. Además, para verificar si solo las proteínas ubicadas en la superficie celular fueron biotiniladas, se usó como control la inmunodetección de β -actina que se ubica en la fracción intracelular (Fig. 9). Estos resultados confirman que todas las mutantes del segmento TM de Gc de ANDV estudiadas son sintetizadas y plegadas de forma correcta en la célula. Sin embargo, se pueden observar diferencias en los niveles de acumulación de las distintas mutantes, lo que puede atribuirse a variaciones experimentales de diferente naturaleza, como por ejemplo la eficiencia de la transfección o la carga de la

muestra en el gel de poliacrilamida, ya que al analizar las bandas correspondientes a actina, se pueden observar variaciones de esta. En la sección Anexos (10.2) se pueden encontrar diferentes *western blots* que muestran niveles de acumulación similares a la proteína silvestre y de las mutantes Gc- Δ 2TM y Gc- Δ 3TM, que en la Fig. 9 parecieran ser menores.

7.4 Caracterización de la actividad fusogénica de Gc silvestre y mutantes

Dado que todas las mutantes de Gc son transportadas y se acumulan en la superficie celular, se analizó su funcionalidad, evaluando si estas pueden inducir la fusión de membranas celulares al ser expuestas a bajo pH.

Para ello, se midió la actividad fusogénica de Gc silvestre y de cada mutante con un ensayo de fusión célula-célula basado en la formación de sincicios y en su identificación gracias a la utilización de tres fluoróforos con los que se marca el citoplasma celular (CMFDA, verde), el núcleo (DAPI, azul) y Gc (anti Gc-Alexa 455, rojo) (Cifuentes-Muñoz y col., 2011).

Así, células Vero E6 fueron transfectadas y 48 h post-transfección fueron expuestas a bajo pH con el fin de activar a la proteína Gc. La identificación de los sincicios fue llevada a cabo por microscopía de epifluorescencia, lo cual es mostrado en la Fig. 10.

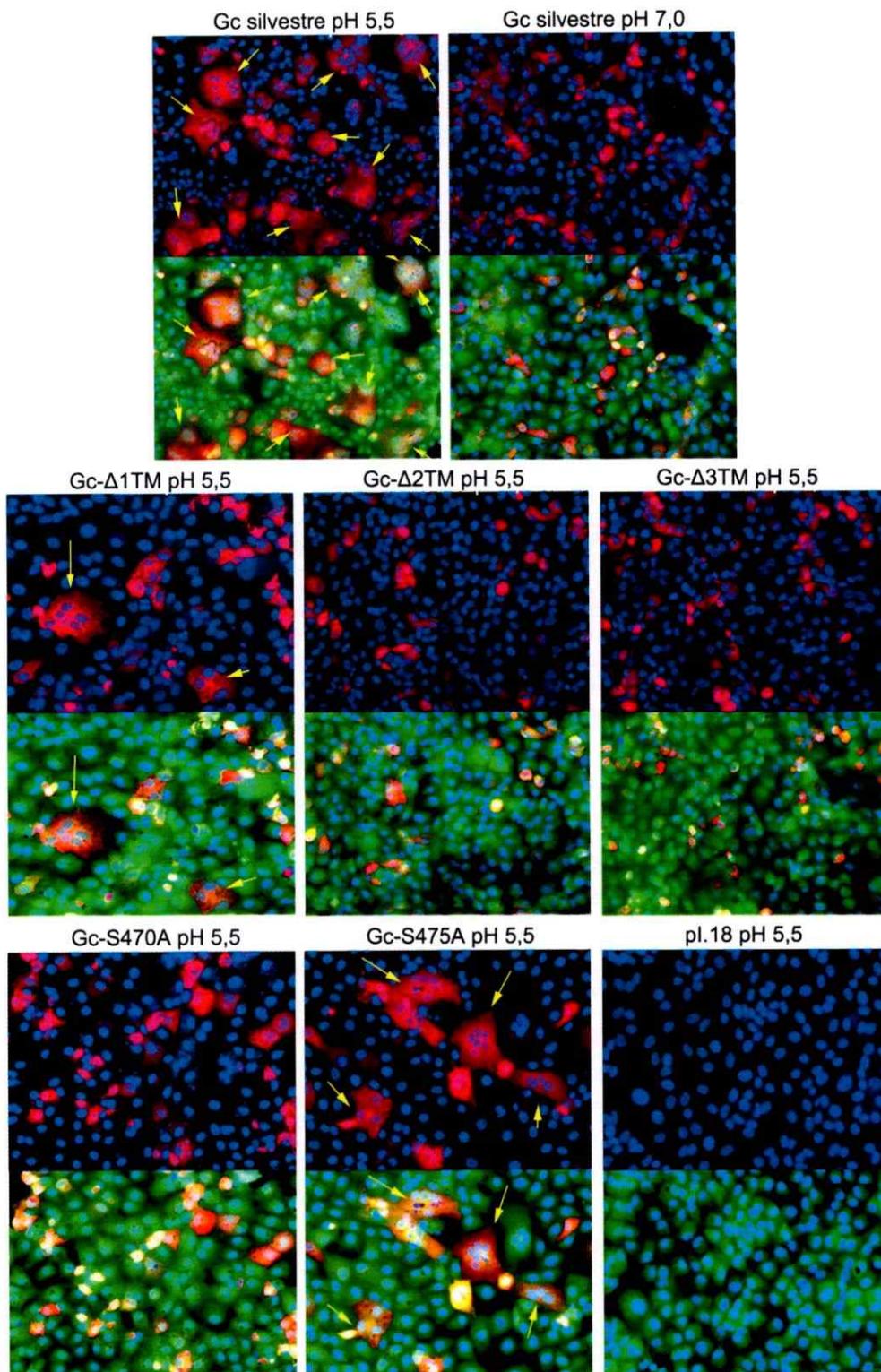


Figura 10. Actividad fusogénica de Gc silvestre y mutantes. Células Vero E6 expresando Gc silvestre o mutantes fueron expuestas a bajo pH y se analizó la formación de sincicios (flechas amarillas) mediante microscopía de fluorescencia. Como control negativo se muestra Gc silvestre a pH 7,0. Citoplasma, CMFDA (verde); núcleo, DAPI (azul) y Gc, alexa-555 (rojo).

Se puede observar que al transfectar células con el plásmido que codifica la proteína silvestre, a pH neutro, se encuentran solo células uninucleadas, aunque ocasionalmente es posible ver células con dos núcleos que corresponderían a células en estado de mitosis. En cambio, cuando estas células son expuestas a bajo pH es posible visualizar un gran número de sincicios de diferentes tamaños (indicados con flechas amarillas) que se distinguen por un citoplasma mayor al de una célula normal, con varios núcleos (entre los 4 y los 20) ubicados generalmente al centro y por una alta expresión de Gc.

Al expresar las mutantes de delección Gc- Δ 1TM, Gc- Δ 2TM y Gc- Δ 3TM y exponerlas a bajo pH, se puede ver que sólo la mutante Gc- Δ 1TM generó sincicios en el ensayo de fusión célula-célula. No obstante, las estructuras sinciciales detectadas fueron menos frecuentes que las encontradas en células que expresan la Gc silvestre y además son de menor tamaño, conteniendo como máximo 7 núcleos por sincicio.

Esto se ve reflejado en la cuantificación de la actividad de fusión (Fig. 11). Para la mutante Gc- Δ 1TM, el índice de fusión calculado es cercano al 45% de la actividad fusogénica generada por la proteína Gc silvestre cuando ambas son expuestas a bajo pH (barras color gris oscuro). Si se observa la actividad de fusión de las mutantes Gc- Δ 2TM y Gc- Δ 3TM, se puede ver que es muy similar a la encontrada cuando las distintas muestras no son expuestas a bajo pH (barras color gris claro), indicando que estas mutantes de Gc no poseen actividad fusogénica.

Estos resultados sugieren que el largo del dominio TM de esta proteína de fusión, es esencial para soportar la actividad de fusión, requiriéndose como mínimo 21 de los 22 aminoácidos del largo total. Además, este requerimiento en el largo del dominio TM parece ser aún más estricto que el indicado en la literatura para otras proteínas de fusión (Armstrong y col., 2000).

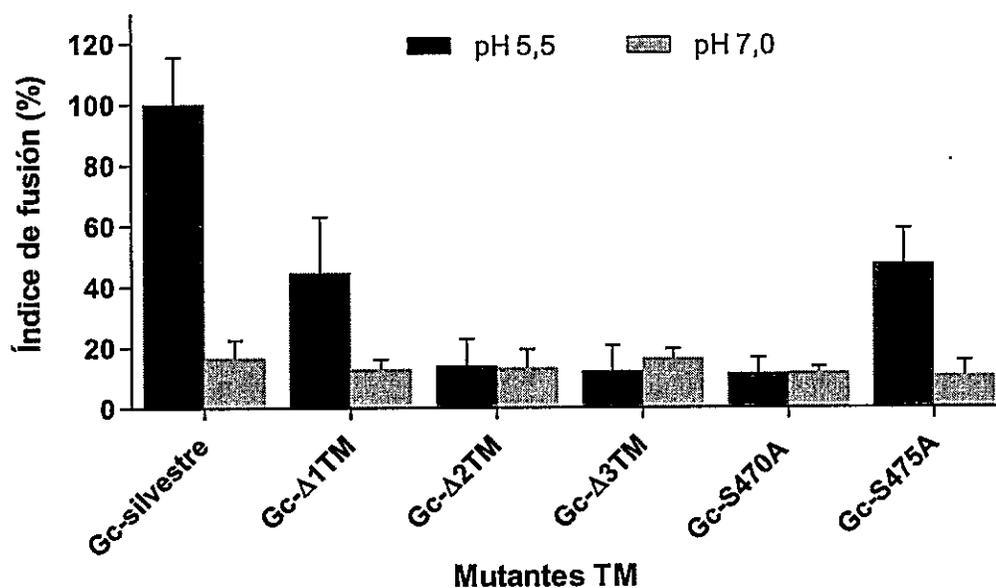


Figura 11. Cuantificación de la actividad de fusión de Gc silvestre y mutantes. Se contó el número de células y núcleos en al menos tres campos de microscopía para cada muestra a cada pH analizado (n = 3). El índice de fusión se calculó con la fórmula $[1 - n^\circ \text{ de células} / n^\circ \text{ de núcleos}]$ y se graficó como porcentaje, correspondiendo el índice de fusión de Gc silvestre al 100%. Gris oscuro: células expuestas a pH 5,5; gris claro: células mantenidas a pH 7,0.

Por otra parte, cuando se examinó la formación de sincicios de las dos mutantes de sustitución, se encontraron estas estructuras en células que expresaban Gc-S475A, pero no cuando las células expresaron la mutante Gc-S470A (Fig. 10).

Al calcular el índice de fusión en la condición de pH 5,5, la mutante Gc-S475A alcanzó un valor cercano al 50% de la actividad fusogénica de Gc silvestre, mostrando que la sustitución de este residuo soporta la actividad de fusión, pero en un grado menor al de la proteína silvestre. La mutante de sustitución Gc-S470A alcanzó valores similares en el índice de fusión calculado tanto a pH 7,0 como pH 5,5, evidenciando la pérdida de la actividad de fusión por la sustitución del residuo S470. Estas diferencias obtenidas en la actividad de fusión de las dos mutantes de sustitución son similares a los resultados obtenidos con mutantes de los residuos glicina conservados de HA (H2N2), donde la que está más hacia el C-terminal conserva su actividad fusogénica, mientras que la que está ubicada más al centro de la secuencia no presenta actividad de fusión, indicando que la posición, además de la característica polar de este residuo, parecen ser esenciales (Armstrong y col., 2000).

7.5 Caracterización del estado intermediario de hemifusión de membranas mediado por Gc silvestre y mutantes

La fusión entre dos membranas celulares involucra la mezcla tanto de los lípidos de ambas membranas plasmáticas como de los contenidos acuosos dado por la formación del poro de fusión. El ensayo de fusión célula-célula realizado previamente nos permite evaluar la actividad fusogénica de las mutantes del dominio TM de Gc observando si es que estas forman o no sincicios. Estas estructuras se producen solo cuando la proteína induce la fusión completa entre membranas citoplasmáticas de las células, que involucra la formación de un poro de fusión que se expande para formar una gran

célula. Sin embargo, este ensayo no permite identificar si es que el dominio TM cumple un rol específico en la etapa de expansión del poro de fusión desde el intermediario de hemifusión, rol que se le ha asociado anteriormente (Kemble y col., 1994; Cleverley & Lenard, 1998; Melikyan y col., 1995, 1997, 1999; Armstrong y col., 2000).

Por ello, en este seminario de título se tuvo como objetivo estudiar si las mutantes que no forman sincicios, producen la mezcla de los lípidos de las caras externas de las membranas de las células, alcanzando el intermediario de hemifusión de membranas. Para analizar este estado intermedio de fusión, se desarrolló un ensayo que permite la detección de la fusión de membranas externas.

Para establecer este ensayo, se utilizó como modelo los experimentos desarrollados por Giraudo y col. (2005), el cual se aprovecha del hecho de que las células HEK-293FT exponen en la cara externa de su membrana plasmática el gangliósido GM1 (Qi y col., 2010), mientras que las células CHO no lo poseen dado que carecen de la enzima que los sintetiza (Rosales Fritz y col., 1997). Este glicolípido sirve como receptor de la toxina del cólera de *Vibrio cholerae*, uniéndose específicamente a la subunidad β que no es tóxica (Merritt y col., 1994) y que se puede adquirir comercialmente conjugada a distintos fluoróforos. Basado en este principio, se analizó si hay mezcla entre los lípidos de las caras externas de membranas de células vecinas, monitoreando la transferencia de GM1 desde células efectoras HEK-293FT hacia células blanco CHO marcadas con el fluoroforo de citoplasma CMAC bajo condiciones fusogénicas (ver materiales y métodos).

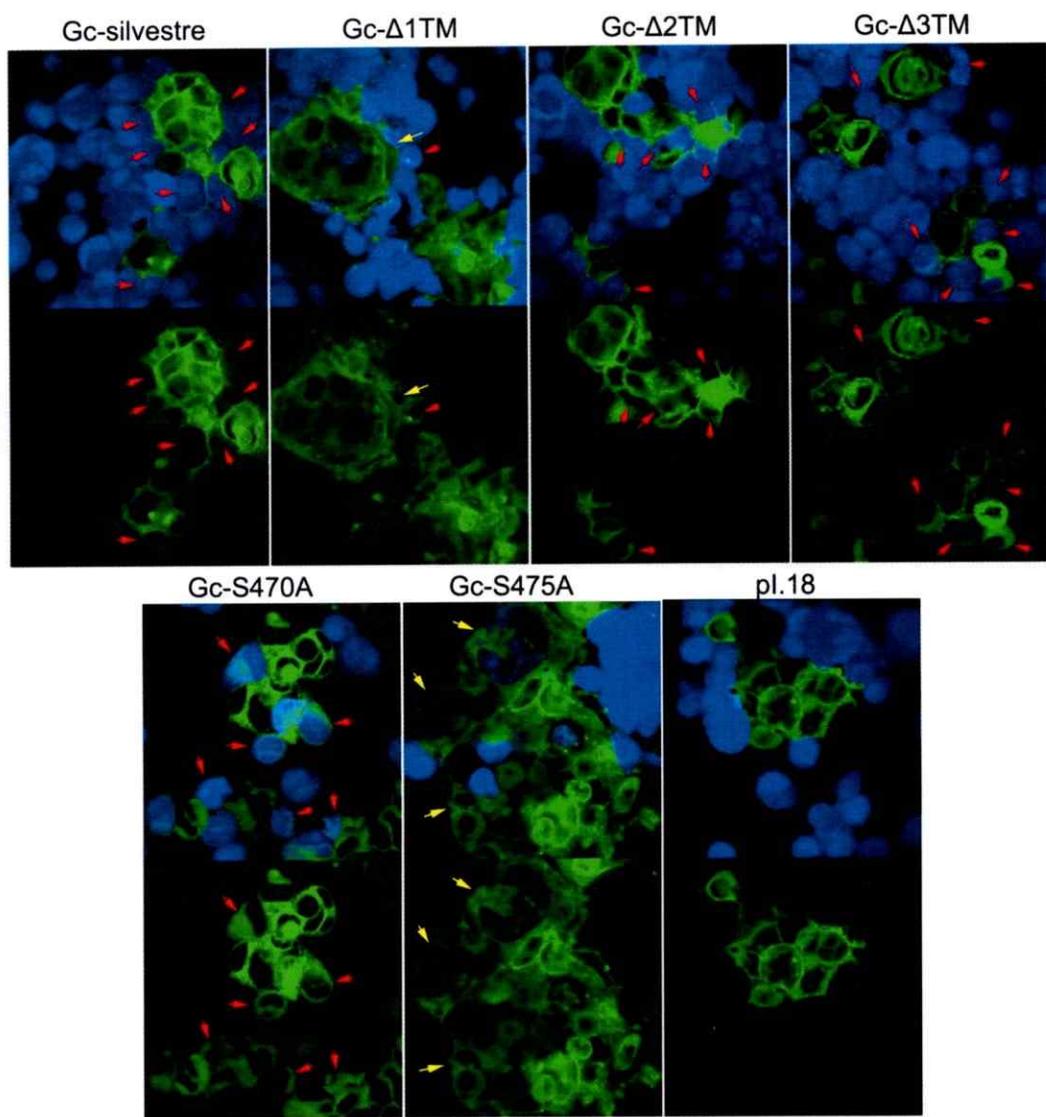


Figura 12. Transferencia lipídica entre células mediada por Gc silvestre ó mutantes a pH 5,5. Células HEK-293FT que expresan GM1 y Gc silvestre ó mutantes se co-cultivaron por 3 h con células CHO marcadas con el fluoroforo CMAC (azul). Se bajó el pH por 5 min y se incubó a 37°C por 1 h. Las células fueron fijadas, marcadas con CTX-488 (verde) y se evaluó la transferencia de GM1 (flechas rojas). Se tomaron fotografías de microscopía confocal de 10 campos por condición (n = 3).

Como se ve en la Fig. 12, todas las mutantes que no forman sincicios generan la transferencia de GM1 desde las células efectoras (de color verde) hacia las células blanco (de color azul), indicado en flechas de color rojo. Sin embargo, no todas las células efectoras promueven esta transferencia, lo que puede deberse a que la eficiencia de transfección y la acumulación en la membrana plasmática de la proteína de fusión Gc en las células HEK-293FT no es del 100%.

Además de las mutantes que no formaron sincicios, se efectuó el ensayo de hemifusión con las mutantes que si los forman (Gc-silvestre, Gc- Δ 1TM y Gc-S475A). En estos casos también se observó transferencia de GM1, además de que se pudieron detectar algunos sincicios con las mutantes Gc- Δ 1TM y Gc-S475A (Fig. 12, flechas amarillas).

Al cuantificar la transferencia de GM1 entre las células efectoras y las células blancos cuando fueron expuestas a bajo pH, se obtuvieron porcentajes cercanos al 70% con la mutante Gc- Δ 2TM y al 50% con la proteína Gc silvestre y las mutantes Gc- Δ 3TM y Gc-S470A (Fig. 13).

Cuando se cuantificó la transferencia de GM1 desde células efectoras transfectadas con el plásmido pl.18 vacío hacia las células blanco, la transferencia alcanzó un valor cercano al 20%, lo cual puede atribuirse al traspaso inespecífico del gangliósido GM1 de una célula a otra dado por la alta densidad de células sembradas, por la manipulación de las células al momento de cambiar medio varias veces para bajar y subir el pH o al momento de marcarlas con los distintos fluoróforos. Pese a este traspaso basal, el aumento observado en la transferencia del glicolípido GM1 incitado por la proteína Gc silvestre y las mutantes que no son fusogénicas es estadísticamente significativo con respecto al control con pl.18 vacío, indicando que las mutantes Gc-

$\Delta 2\text{TM}$, Gc- $\Delta 3\text{TM}$ y Gc-S470A arrestan el proceso de fusión en el intermediario de hemifusión.

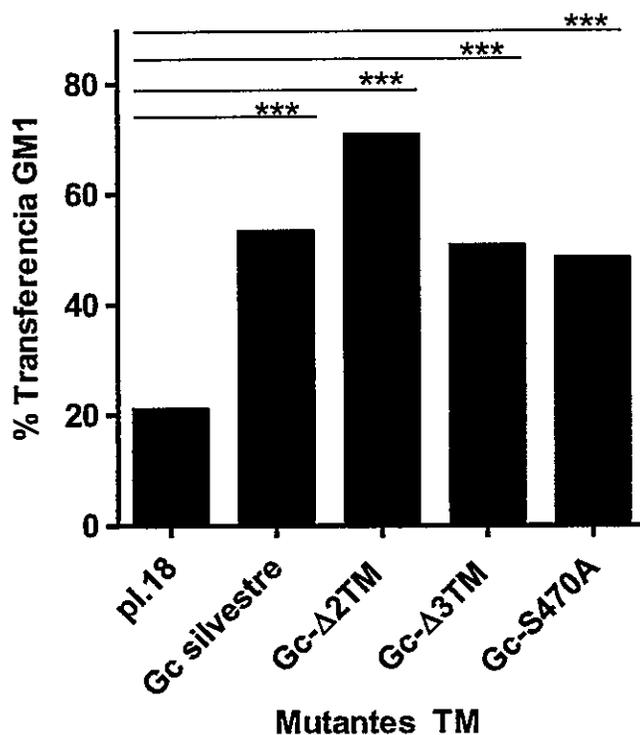


Figura 13. Cuantificación de la transferencia lipídica entre células mediada por Gc silvestre ó mutantes a pH 5,5. Para cada experimento (10 fotos) se contaron las células efectoras que están en contacto con al menos una célula blanco (GM1^+) y las células blanco que presentan marca de GM1 en la membrana ($\text{CMAC}^+/\text{GM1}^+$). Se calculó el porcentaje de transferencia de GM1 para cada foto de acuerdo a la fórmula $[100 * (\text{CMAC}^+/\text{GM1}^+) / (\text{GM1}^+)]$ y se graficó el promedio obtenido en cada foto en tres experimentos independientes (30 fotos en total). Una prueba *t-student* fue usada para evaluar estadísticamente si hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos para la proteína Gc silvestre o mutantes con respecto a pl. 18 vacío: ***, $P < 0,001$

Además de medir el traspaso de GM1 de las células efectoras hacia las células blanco cuando estas son expuestas a pH ácido, se realizó un nuevo experimento en donde se cuantificó el traspaso tanto a pH 5,5 como a pH 7,0, con el fin de tener un control para cada mutante. Los resultados, mostrados en la figura 14, revelan que todas las proteínas Gc analizadas a pH 5,5 presentan traspaso de GM1, con un valor que rodea el 70%. Este porcentaje es un poco mayor que el obtenido anteriormente (Fig.13), lo que puede explicarse por una mayor tasa de transfección de las células 293FT en este experimento.

Al cuantificar el traspaso para cada proteína a pH 7,0, se obtuvo un valor cercano al 20% en cada una de ellas, al igual que el valor obtenido con pl.18 vacío tanto en este experimento a los distintos pHs como el mostrado en la figura 13.

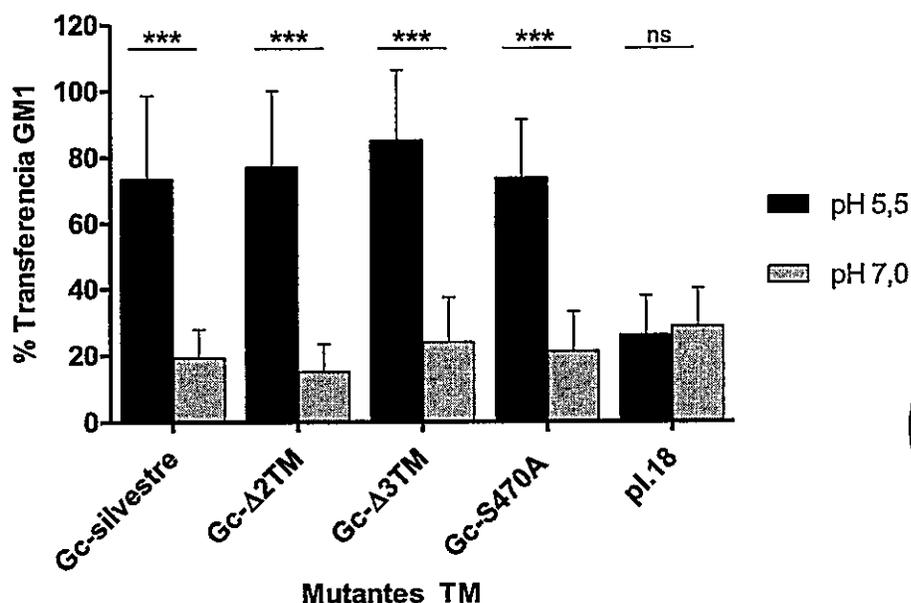


Figura 14. Cuantificación de la transferencia lipídica entre células mediada por Gc silvestre ó mutantes a pH 5,5 y pH 7,0. Para cada experimento (10 fotos) se contaron las células efectoras que están en contacto con por lo menos una célula blanco (GM1⁺) y las

células blanco que presentan marca de GM1 en la membrana (CMAC⁺/GM1⁺). Se calculó el porcentaje de transferencia de GM1 para cada foto de acuerdo a la fórmula $[100 \cdot (\text{CMAC}^+ / \text{GM1}^+) / (\text{GM1}^+)]$ y se graficó el promedio obtenido de un experimento. Una prueba *t-student* fue usada para evaluar estadísticamente si hay diferencias significativas entre las muestras a pH 5,5 y pH 7,0: ***, P < 0,001; ns = no significativo.

En conjunto, estos resultados sugieren que el dominio TM de la glicoproteína de fusión Gc de ANDV cumple un rol importante en la formación y expansión del poro de fusión y que existen requisitos en el largo y en residuos específicos de la secuencia de este dominio para soportar la actividad fusogénica.

8. DISCUSIÓN

Un paso crítico dentro del ciclo infectivo de los virus es el ingreso del material genético al citosol de la célula blanco para comenzar con la replicación y la generación de progenie viral (Plempner, 2011). Este traspaso ocurre a través de un poro de fusión que se forma tras la fusión de la membrana viral con una membrana de la célula infectada, proceso que es llevado a cabo por las proteínas de fusión virales (LeDuc & Shin, 2000). Estas proteínas disminuyen la barrera energética que involucra la fusión de las dos membranas, deformando y generando estrés elástico en las bicapas que finalmente tienden a fusionarse para adoptar una conformación energéticamente más estable (Kozlov y col., 2010). Se cree que la energía necesaria para producir estas deformaciones de membranas proviene de los cambios conformacionales que sufre la proteína de fusión viral tras activarse y parte de esta es probablemente transferida a la membrana viral a través del dominio TM (Nikolaus & Herrmann, 2012).

Numerosas evidencias muestran que el dominio TM cumple un rol importante en el proceso fusogénico (ver introducción) y algunas de ellas postulan que este dominio estaría involucrado específicamente en la formación y expansión del poro desde el intermediario de hemifusión (Kemble y col., 1994; Melikyan y col., 1995, 1997, 1999, 2000a; Cleverley & Lenard, 1998; Armstrong y col., 2000). Se ha sugerido que el dominio TM podría generar estrés elástico en la membrana al cambiar su posición en esta durante el proceso de fusión, desestabilizando y facilitando el reordenamiento de los lípidos de las bicapas que conllevarían al colapso del intermediario de hemifusión y a la formación del poro de fusión (Chernomordik & Kozlov, 2005).

Se ha visto que distintas proteínas de fusión poseen distintas propiedades específicas o requerimientos en este dominio que permiten mantener la actividad fusogénica. Por

ello, en este seminario de título se estudió qué propiedades de la secuencia aminoacídica del dominio TM de Gc de ANDV son requeridas para promover la hemifusión y la fusión de membranas. Para ello, se generaron distintas mutantes de delección y de sustitución de residuos específicos y se evaluó su expresión, localización en la membrana y actividad fusogénica.

8.1 Requisito del largo del dominio TM de Gc de ANDV para promover la fusión de membranas

Diversos estudios con mutantes en donde se ha reemplazado el dominio TM de distintas proteínas de fusión por GPI, o donde se ha acortado este dominio, han mostrado que se requiere un largo determinado para permitir la formación y/o expansión del poro de fusión.

8.1.1 La mutante Gc- Δ 1TM promueve la fusión de membranas

Anteriormente en nuestro laboratorio, se descubrió que al eliminar el endodominio de la glicoproteína de fusión Gc de ANDV (Gc- Δ endo) se mantiene la actividad fusogénica medido a través de la formación de sincicios. Sin embargo, al eliminar el endodominio más 4 residuos del dominio TM (Gc- Δ 4TM) no se formaron estas estructuras, indicando la pérdida de actividad fusogénica (Tesis Ana Victoria Sarno, 2011; datos no publicados). Basándose en estos resultados, en este trabajo se quiso establecer el largo mínimo del dominio TM que promueve la hemifusión y la fusión de membranas. Para ello, se construyeron las mutantes de delección Gc- Δ 1TM, Gc- Δ 2TM y Gc- Δ 3TM y se corroboró su expresión y localización en la membrana plasmática de las células transfectadas (Fig. 8 y 9). Al evaluar la formación de sincicios de estas mutantes, sólo Gc- Δ 1TM produjo estas estructuras, revelando que se requieren como mínimo 21 de

los 22 aminoácidos totales para mantener la actividad fusogénica de la proteína Gc. Este requerimiento es aún más estricto que en otras proteínas de fusión hasta aquí caracterizadas, como por ejemplo para HA de Influenza en donde se requieren 17 de 27 residuos (Armstrong y col., 2000), para la proteína gp41 de HIV donde se necesitan 18 de 25 (Yue y col., 2009) o para gp41 de SIV que demanda 23 de los 26 aminoácidos totales que conforman este segmento para promover la fusión (West y col., 2001; Lin y col., 2003).

A pesar de que la mutante Gc- Δ 1TM induce la formación de sincicios, estos son muchos menos frecuentes y más pequeños, lo que se refleja en el índice de fusión que fue de un 45% aprox. de la actividad obtenida con la proteína silvestre. Este valor es un 15% menor al índice de fusión obtenido anteriormente con la mutante Gc- Δ endo (Tesis Ana Victoria Sarno, 2011; datos no publicados), indicando que la eliminación del último residuo del dominio TM afecta en parte la funcionalidad de la proteína. Esto podría deberse a que este residuo, que corresponde a una cisteína, podría ser sensible a modificaciones post-traduccionales, tales como la palmitoilación. Este tipo de modificación se ha descrito para residuos cisteínas que se encuentran en posiciones equivalentes de la proteína HA del virus influenza. Cuando este residuo fue sustituido en el subtipo H2 (C211A) se eliminó casi por completo la formación de sincicios (Naeve & Williams, 1990), aunque cuando fue sustituido en el subtipo H7 (C511S), la formación de estas estructuras solo se vio disminuida en un ~20% (Fischer y col., 1998). Cuando se sustituyó este residuo en el subtipo H1 (C555S) la formación de sincicios se redujo en un ~90%, aunque encontraron evidencias de la formación de un pequeño poro sin verse afectada la transferencia lipídica, por lo que esta mutante sería deficiente en la expansión del poro de fusión (Sakai y col., 2002). De forma similar a estos resultados, al analizar la mutante Gc- Δ 1TM con el ensayo de hemifusión

se obtuvo que, además de generar sincicios, provocó la transferencia de GM1 (Fig. 12, 13 y 14), por lo que la disminución en la formación de sincicios podría deberse a una deficiencia en la expansión del poro de fusión. Cabe señalar que la desacilación de residuos reduce su hidrofobicidad. Si este tipo de modificación ocurriera en el dominio TM de Gc, se puede hipotetizar que la desacilación de este residuo podría desfavorecer la inclinación del dominio TM en la membrana y por lo tanto, interferir en la desestabilización de la bicapa que conlleva a la expansión del poro de fusión.

8.1.2 Las mutantes Gc- Δ 2TM y Gc- Δ 3TM median la hemifusión

El mecanismo propuesto por el cual se fusiona la membrana viral con la membrana blanco procede a través de un intermediario denominado hemifusión. Este intermediario se caracteriza por presentar fusión de las caras externas pero no de las caras internas de las bicapas, restringiéndose la mezcla de los contenidos internos de ambos compartimientos (Kielian & Rey, 2006; Harrison, 2008).

Análisis de actividad fusogénica con GPI-HA muestran que esta proteína que está anclada solo a la cara externa de la bicapa lipídica no permite la fusión completa de dos membranas, sino que el proceso fusogénico queda retenido en el intermediario de hemifusión (Kemble y col., 1994; Melikyan y col., 1995, 1997). Este mismo fenotipo es encontrado al analizar mutantes de delección de HA que poseen un largo menor a los 17 residuos (Armstrong y col., 2000).

En este trabajo de tesis, encontramos que las mutantes Gc- Δ 2TM y Gc- Δ 3TM, que no formaron sincicios en el ensayo de fusión célula-célula, si mediaron la transferencia lipídica de una célula a otra (Fig. 12, 13 y 14). Sin embargo, para poder afirmar que estas mutantes quedan detenidas en el estado de hemifusión, es necesario discriminar entre la deficiencia en la formación de un poro de fusión y la formación de un poro

pequeño que no se dilata. Esto se suele caracterizar mediante el análisis de la transferencia de pequeños fluoróforos citoplasmáticos de una célula a otra. En nuestro caso, se pudo comprobar esto al no observar difusión del fluoróforo CMAC de la célula blanco a la célula efectora. Este fluoróforo tiene un peso molecular de 209,6 g/mol, tamaño menor al de los fluoróforos frecuentemente usados para distinguir entre estos dos fenotipos (Kemble y col., 1994; Melikyan y col., 1995; Armstrong y col., 2000; Lin y col., 2003; Miyauchi y col., 2005; Shang & Hunter, 2010; Yue y col., 2009). Pese a esto, mediante esta metodología no es posible descartar completamente la formación de un pequeño poro de fusión, sino que en el futuro tendría que confirmarse estos resultados mediante mediciones electrofisiológicas (Melikyan y col., 1997).

Los antecedentes mostrados tanto en la literatura como en nuestros resultados sugieren que el dominio TM debe atravesar por completo la bicapa para soportar la formación y expansión del poro de fusión. Armstrong y col. (2000), lograron re-establecer la actividad fusogénica de HA al agregar un residuo hidrofílico al extremo C-terminal del dominio TM de una mutante acortado previamente (15 residuos) que solo promueve la hemifusión. Basándose en esto, propusieron un modelo que postula que este TM es demasiado corto para abarcar la bicapa completa, quedando ubicado por completo dentro de esta (Armstrong y col., 2000) y que este residuo hidrofílico forzaría al dominio TM a atravesar ambas caras de la membrana. La necesidad de que este dominio atravesase toda la bicapa lipídica podría explicarse porque si este no se inserta en ambas capas el dominio sería incapaz de aplicar el estrés necesario a la membrana, especialmente a la cara interna de la membrana, para alcanzar el colapso del intermediario de hemifusión hacia la formación del poro de fusión. Este modelo se refuerza con los resultados obtenidos al agregar clorpromazina, la cual rescata la fusión completa de GPI-HA (Melikyan y col., 1997) y de la de las mutantes de delección

de esta misma proteína (Armstrong y col., 2000). Este efecto se logra ya que este agente permeable entra a la célula y se ubica en la cara interna de la membrana, desestabilizándola. Por el contrario, al agregar metaclopropromazina, que se ubica preferentemente en la cara externa de la bicapa, no se recupera el fenotipo de fusión completa, indicando que la desestabilización de la cara interna de la bicapa es necesaria para formar el poro de fusión (Melikyan y col., 1997).

8.2 Requisito de secuencia del dominio TM de Gc de ANDV

Al igual que los antecedentes que muestran que el largo del dominio TM es relevante en el proceso fusogénico, diversos trabajos han mostrado que la secuencia de este dominio también lo es. En particular, dos residuos glicinas en el dominio TM de la proteína G de VSV parecen ser importantes en la transición desde el intermediario de hemifusión a la formación del poro de fusión (Cleverley & Lenard, 1998). De manera análoga, el dominio TM de HA del virus influenza de la cepa de Japón (H2N2) y X:31 (H3N2) también contiene estos residuos, aunque en estas proteínas pueden ser residuos glicina o serina, que poseen similares propiedades, como el peso molecular o el índice hidropático (Nelson & Cox, 2005). Sin embargo solo la primera de estas cepas parece requerir el residuo glicina que está ubicado cercano al medio del dominio (Armstrong y col., 2000; Melikyan y col., 1999, 2000).

En este seminario, se sustituyeron los residuos S470 y S475 del dominio TM de Gc de ANDV, los cuales serían equivalentes a los antes mencionados. Se observó que sólo la mutante Gc-S475A produce sincicios en el ensayo de célula-célula, pero en menor medida que la proteína silvestre (ver Fig. 10 y 11). Además, se encontró que la mutante Gc-S470A promueve la transferencia lipídica, revelando que esta mutante queda detenida en el estado de hemifusión. Estas sustituciones coinciden con los

resultados reportados para HA de la cepa de Japón, donde el residuo apolar ubicado al medio de la secuencia fue crucial para permitir la transición hemifusión-fusión. La propiedad flexible de aminoácidos tales como glicina y serina desestabilizarían la hélice del dominio TM, permitiendo que adopte distintas conformaciones en la membrana. Se ha sugerido que esta flexibilidad podría incluso inducir un cambio desde α -hélice a sábana β , lo cual se vería apoyado por la gran abundancia de residuos que promueven la formación de hojas β como isoleucina y valina (Fig. 7) (Nikolaus & Herrmann, 2012). Sin embargo, parece improbable que ocurra un cambio tan drástico dentro del ambiente hidrofóbico de la membrana, aunque si es posible especular que esta tendencia a desestabilizar la hélice, facilite la desestabilización de los lípidos alrededor del dominio TM, ayudando de esta manera a colapsar el intermediario de hemifusión.

Por otro lado, se ha visto que los residuos glicina tienen un rol importante en dominios TM participando en interacciones hélice-hélice, como por ejemplo en la dimerización de la glicoporina A (Brosig & Langosch, 1998) o en la auto-asociación de la proteína de fusión de distintos paramyxovirus (Smith y col., 2013) y de gp41 de HIV-1 (Reuven y col., 2012). En el caso de Gc de ANDV, los residuos serina podrían generar interacciones entre los segmentos TM de distintas unidades de Gc o incluso podrían interactuar con el péptido de fusión una vez que se la proteína ha adoptado la conformación tipo horquilla.

Además de estos posibles roles que se han indicado para los residuos hidrofílicos que están insertos en una hélice TM, se ha encontrado que estos pueden influir en la posición de la hélice dentro de la bicapa, produciendo un desplazamiento de esta hacia la superficie de la membrana (Krishnakumar & London, 2007). Este desplazamiento impediría al dominio TM abarcar ambas caras de la membrana, requerimiento que,

como ya se mencionó, sería necesario para producir el colapso del intermediario de hemifusión.

Queda a futuro realizar estudios adicionales para dilucidar el mecanismo por el cual dominio TM de Gc del hantavirus Andes logra desestabilizar el intermediario de hemifusión para luego formar y expandir el poro de fusión. Es necesario aún ver la participación de este dominio en la desestabilización de membranas, evaluar si hay asociación de este con el péptido de fusión o entre dominios TM y ver si los residuos serina serían claves en esta interacción, usando por ejemplo péptidos derivados de estos dominios.

Los resultados obtenidos en este seminario de título ayudan a entender como los hantavirus fusionan su membrana con la membrana blanco, paso clave en el proceso infectivo del virus. La comprensión de este proceso y el estudio específico de las características de la glicoproteína de fusión Gc que promueve la fusión de membranas es un acercamiento a desarrollar posibles estrategias anti-virales, como por ejemplo la administración de inhibidores del proceso de fusión de membranas.

9. CONCLUSIONES

- El largo mínimo del dominio TM de Gc de ANDV requerido para mantener la actividad fusogénica es de 21 residuos de los 22 totales.
- Largos del dominio TM de 19 y 20 residuos retienen el proceso de fusión en el intermediario de hemifusión.
- El residuo S470, ubicado en la zona media del dominio TM, cumple un rol crucial en la actividad fusogénica de la proteína Gc y su sustitución por alanina retiene el proceso fusogénico en el intermediario de hemifusión.
- La sustitución del residuo S745 por un residuo hidrofóbico no elimina la actividad fusogénica de Gc de ANDV.
- El dominio TM de la glicoproteína de fusión Gc del hantavirus Andes cumple un rol crucial en el proceso de fusión, específicamente en la formación y expansión del poro desde el intermediario de fusión.

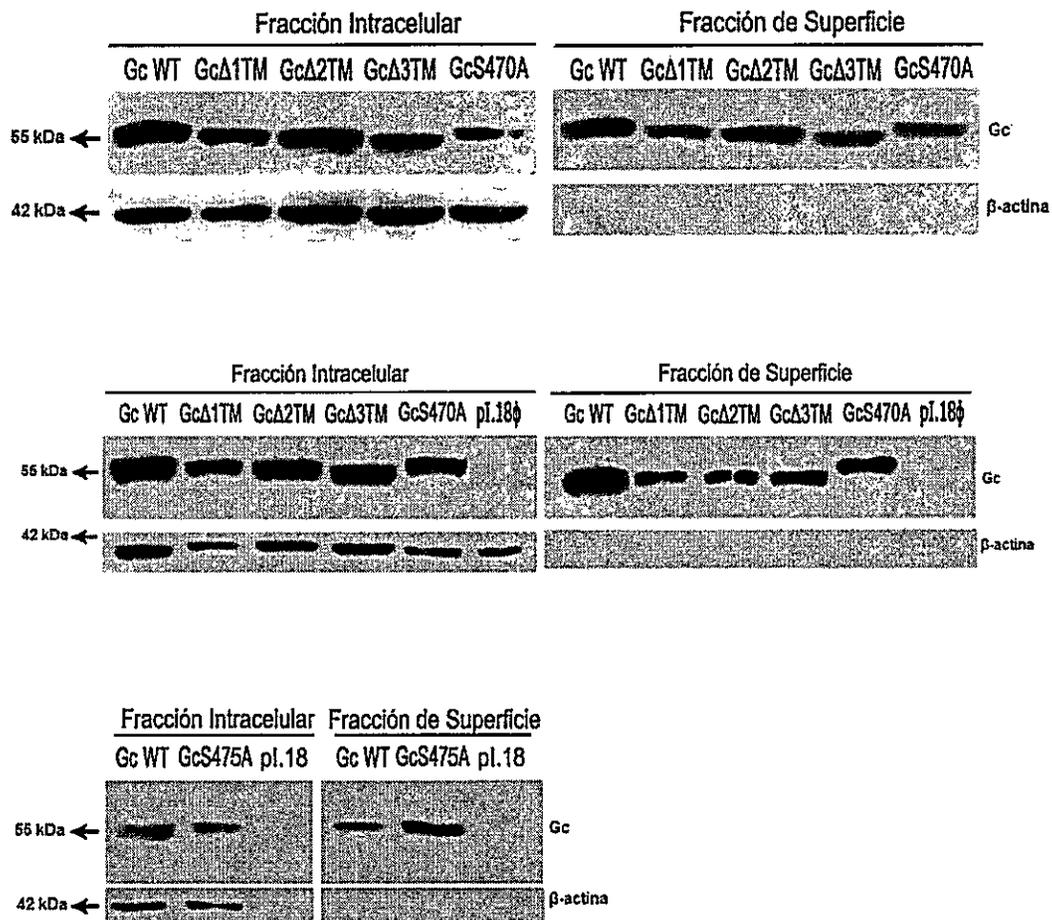
10. ANEXOS

10.1 Fragmento de ADN sintetizado para generar mutante Gc-S475A

Se adjunta la secuencia del segmento de ADN que fue sintetizado y clonado en el vector pl.18-GPC clon 4 para generar la mutante Gc-S475A (DNA 2.0 Inc.). Se destaca con color gris oscuro el sitio de corte de la enzima de restricción *AvrII* y en color gris claro el sitio de corte de la enzima *XhoI*. Además, en color amarillo se señalan los nucleótidos que fueron intercambiados para introducir la sustitución del residuo S475.

```
CCTAGGTC CGTTAGAACAAAGGGGGGGTCATCCTTAAACAATGGTGCACAACATCA
TGTGCATTTGGGGACCCTGGTGATATCATGTCTACTCCTAGTGGTATGAGGTGTCC
AGAACACACTGGATCATT CAGGAAAATTTGTGGTTTTGCCACTACACCAGTTTGCG
AATACCAAGGTAATACCATTTCTGGATATAAAAGAATGATGGCAACAAAAGATTCAT
TCCAATCATTTAACTTAACAGAACCTCACATCACAGCAAATAAGCTTGAATGGATTG
ACCCAGATGGGAATACAAGAGACCATGTAAACCTTGTCTTAAATAGAGATGTTTCA
TTTCAGGATTTAAGTGATAACCCCTGTAAAGTGGACTTACACACACAAGCAATAGA
AGGGGCATGGGGTTCTGGTGTAGGGTTTACACTTACATGTACTGTCTCGGATTAACA
GAGTGCCCGAGTTTTATGACATCAATTAAGGCATGTGATCTTGCTATGTGTTATGG
ATCAACAGTAGCAAACCTTGCTAGGGGGCTCTAATACAGTAAAAGTGGTTGGTAAGG
GAGGTCATTCAGGGTCTTCATTTAAATGCTGTCATGATACAGATTGCTCCTCTGAG
GGTCTACTTGCATCAGCCCCACACCTTGAGAGAGTGACAGGCTTCAATCAAATCGA
TTCAGATAAGGTTTATGATGATGGTGCACCACCTTGCACATTCAAATGCTGGTTCA
CCAAGTCAGGTGAGTGGCTCCTTGGGATCTTAAACGGGAATTGGATTGTTGTTGTA
GTGCTTGTGTGATACTCATTCTCTCTATCATAATGTTGCCTGTTCTGTGCCCCAGG
AGAGGACACAAGAAAACGTCTAAGCGGCCCGCCTCGAG
```

10.2 Acumulación de Gc en la membrana citoplasmática de células eucariontes



11. REFERENCIAS

- Armstrong, R. T., Kushnir, a S., & White, J. M. (2000). The transmembrane domain of influenza hemagglutinin exhibits a stringent length requirement to support the hemifusion to fusion transition. *The Journal of Cell Biology*, 151(2), 425–37.
- Bi, Z., Formenty, P. B. H., & Roth, C. E. (2008). Hantavirus Infection : a review and global update. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2(1), 3–23.
- Brosig, B., & Langosch, D. (1998). The dimerization motif of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 7(4), 1052–6.
- Chakrabarti, L., Emerman, M., Tiollais, P., & Sonigol, P. (1989). The cytoplasmic domain of simian immunodeficiency virus transmembrane protein modulates infectivity. *Journal of Virology*, 63(10), 4395–4403.
- Chernomordik, L. V., & Kozlov, M. M. (2005). Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps. *Cell*, 123(3), 375–82.
- Chernomordik, L. V., & Kozlov, M. M. (2008). Mechanics of membrane fusion. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(7), 675–683.
- Choi, Y., Kwon, Y. C., Kim, S. I., Park, J. M., Lee, K. H., & Ahn, B. Y. (2008). A hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome requires gC1qR/p32 for efficient cell binding and infection. *Virology*, 381(2), 178–83.
- Cifuentes-Muñoz, N., Barriga, G. P., Valenzuela, P. D. T., & Tischler, N. D. (2011). Aromatic and polar residues spanning the candidate fusion peptide of the Andes virus Gc protein are essential for membrane fusion and infection. *The Journal of General Virology*, 92, 552–63.
- Cifuentes-Muñoz, N., Salazar-Quiroz, N., & Tischler, N. D. (2014). Hantavirus Gn and Gc envelope glycoproteins: structural key units for virus cell entry and virus assembly. *Viruses*, 6.
- Cleverley, D., & Lenard, J. (1998). The transmembrane domain in viral fusion : Essential role for a conserved glycine residue in vesicular stomatitis virus G protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(March), 3425–3430.
- Dessau, M., & Modis, Y. (2013). Crystal structure of glycoprotein C from Rift Valley fever virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(5), 1696–701.

- Dubay, J. W., Roberts, S. J., Hahn, B. H., & Hunter, E. (1992). Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity. *Journal of Virology*, 66(11), 6616–25.
- Earp, L. J., Delos, S. E., Park, H. E., & White, J. M. (2004). The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 285, 25–66.
- Fischer, C., Schroth-Diez, B., Herrmann, a, Garten, W., & Klenk, H. D. (1998). Acylation of the influenza hemagglutinin modulates fusion activity. *Virology*, 248(2), 284–94.
- Fritz, R., Blazevic, J., Taucher, C., Pangerl, K., Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2011). The unique transmembrane hairpin of flavivirus fusion protein E is essential for membrane fusion. *Journal of Virology*, 85(9), 4377–85.
- Gabuzda, D. H., Lever, a, Terwilliger, E., & Sodroski, J. (1992). Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *Journal of Virology*, 66(6), 3306–15.
- Gavrilovskaya, I. N., Shepley, M., Shaw, R., Ginsberg, M. H., & Mackow, E. R. (1998). beta3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(June), 7074–7079.
- Gavrilovskaya, I. N., Brown, E. J., Ginsberg, M. H., & Mackow, E. R. (1999). Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *Journal of Virology*, 73(5), 3951–3959.
- Giraud, C. G., Hu, C., You, D., Slovic, A. M., Mosharov, E. V, Sulzer, D., Melia J. T., & Rothman, J. E. (2005). SNAREs can promote complete fusion and hemifusion as alternative outcomes. *The Journal of Cell Biology*, 170(2), 249–60.
- Godoy, P., Marsac, D., Stefas, E., Ferrer, P., Tischler, N. D., Pino, K., Ramdohr, P., Vial, P., Valenzuela P. D. T., Ferrés, M., Veas, F., & López-Lastra, M. (2009). Andes virus antigens are shed in urine of patients with acute hantavirus cardiopulmonary syndrome. *Journal of Virology*, 83(10), 5046–55.
- Graham, F. L., & Van der Eb, A. J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, 54(2), 536–9.
- Gravel, K. a, McGinnes, L. W., Reitter, J., & Morrison, T. G. (2011). The transmembrane domain sequence affects the structure and function of the Newcastle disease virus fusion protein. *Journal of Virology*, 85(7), 3486–97.
- Hardestam, J., Karlsson, M., Falk, K. I., Olsson, G., Klingström, J., & Lundkvist, A. (2008). Puumala hantavirus excretion kinetics in bank voles (*Myodes glareolus*). *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1209–15.

- Harman, A., Browne, H., & Minson, T. (2002). The Transmembrane Domain and Cytoplasmic Tail of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein H Play a Role in Membrane Fusion. *Journal of Virology*, 76(21), 10708–10716.
- Harrison, S. C. (2008). Viral membrane fusion. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(7), 690–698.
- Hart, C. A., & Bennett, M. (1999). Hantavirus infections: epidemiology and pathogenesis. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 1(14), 1229–37.
- Helseth, E., Olshevsky, U., Gabuzda, D., Ardman, B., Haseltine, W., & Sodroski, J. (1990). Changes in the Transmembrane region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Envelope Glycoprotein Affect Membrane Fusion. *Journal of Virology*, 64(12), 6314–6318.
- Hooper, J. W., Larsen, T., Custer, D. M., & Schmaljohn, C. S. (2001). A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome. *Virology*, 289(1), 6–14.
- Horvath, C. M., & Lamb, R. A. (1992). Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. *Journal of Virology*, 66(4), 2443–55.
- Huiskonen, J. T., Hepojoki, J., Laurinmäki, P., Vaheri, A., Lankinen, H., Butcher, S. J., & Grünewald, K. (2010). Electron cryotomography of Tula hantavirus suggests a unique assembly paradigm for enveloped viruses. *Journal of Virology*, 84(10), 4889–97.
- Hussein, I. T. M., Haseeb, A., Haque, A., & Mir, M. A. (2011). *Recent advances in hantavirus molecular biology and disease. Advances in applied microbiology* (1st ed., Vol. 74, pp. 35–75). Elsevier Inc.
- Jeetendra, E., Robison, C. S., Albritton, L. M., & Whitt, M. A. (2002). The Membrane-Proximal Domain of Vesicular Stomatitis Virus G Protein Functions as a Membrane Fusion Potentiator and Can Induce Hemifusion. *Journal of Virology*, 76(23), 12300–12311.
- Jin, M., Park, J., Lee, S., Park, B., Shin, J., Song, K. J., Ahn, T.I., Hwang, S. Y., Ahn, B. Y., & Ahn, K. (2002). Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology*, 294(1), 60–9.
- Jonsson, C. B., Figueiredo, L. T. M., & Vapalahti, O. (2010). A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 412–41.
- Kemble, G. W., Danieli, T., & White, J. M. (1994). Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion. *Cell*, 76(2), 383–91.

- Kiellian, M., & Rey, F. A. (2006). Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(1), 67–76.
- Kozerski, C., Ponimaskin, E., Schroth-Diez, B., Schmidt, M. F., & Herrmann, A. (2000). Modification of the cytoplasmic domain of influenza virus hemagglutinin affects enlargement of the fusion pore. *Journal of Virology*, 74(16), 7529–37.
- Kozlov, M. M., McMahon, H. T., & Chernomordik, L. V. (2010). Protein-driven membrane stresses in fusion and fission. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(12), 699–706.
- Krautkrämer, E., & Zeier, M. (2008). Hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome enters from the apical surface and requires decay-accelerating factor (DAF/CD55). *Journal of Virology*, 82(9), 4257–64.
- Krishnakumar, S. S., & London, E. (2007). The control of transmembrane helix transverse position in membranes by hydrophilic residues. *Journal of Molecular Biology*, 374(5), 1251–1269.
- LeDuc, D. L., & Shin, Y. K. (2000). Insights into a structure-based mechanism of viral membrane fusion. *Bioscience Reports*, 20(6), 557–70.
- Liao, M., & Kiellian, M. (2005). The conserved glycine residues in the transmembrane domain of the Semliki Forest virus fusion protein are not required for assembly and fusion. *Virology*, 332(1), 430–7.
- Lin, X., Derdeyn, C. A., Blumenthal, R., West, J., & Hunter, E. (2003). Progressive Truncations C Terminal to the Membrane-Spanning Domain of Simian Immunodeficiency Virus Env Reduce Fusogenicity and Increase Concentration Dependence of Env for Fusion. *Journal of Virology*, 77(12), 7067–7077.
- Loftus, J., Smith, J. W., & Ginsberg, M. H. (1994). Integrin-mediated Cell Adhesion: The extracellular face. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(41), 25235–25238.
- Lorizate, M., Huarte, N., Sáez-ciri3n, A., & Nieva, J. L. (2008). Interfacial pre-transmembrane domains in viral proteins promoting membrane fusion and fission. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 1624–1639.
- Macneil, A., Nichol, S. T., & Spiropoulou, C. F. (2011). Hantavirus pulmonary syndrome. *Virus Research*, 162(1-2), 138–47.
- Markosyan, R., Fredric, C., & Melikyan, G. (2000). The Lipid-anchored Ectodomain of Influenza Virus.pdf. *Molecular Biology of the Cell*, 11, 1143–1152.
- Martinez, V. P., Bellomo, C., San Juan, J., Pinna, D., Forlenza, R., Elder, M., & Padula, P. J. (2005). Person-to-person transmission of Andes virus. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1848–53.

- Melikyan, G. B., White, J. M., & Cohen, F. S. (1995). GPI-anchored influenza hemagglutinin induces hemifusion to both red blood cell and planar bilayer membranes. *The Journal of Cell Biology*, 131(3), 679–91.
- Melikyan, G. B., Brener, S. A, Ok, D. C., & Cohen, F. S. (1997). Inner but not outer membrane leaflets control the transition from glycosylphosphatidylinositol-anchored influenza hemagglutinin-induced hemifusion to full fusion. *The Journal of Cell Biology*, 136(5), 995–1005.
- Melikyan, G. B., Lin, S., Roth, M. G., & Cohen, F. S. (1999). Amino acid sequence requirements of the transmembrane and cytoplasmic domains of influenza virus hemagglutinin for viable membrane fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 10(6), 1821–36.
- Melikyan, G. B., Markosyan, R. M., Roth, M. G., & Cohen, F. S. (2000a). A point mutation in the transmembrane domain of the hemagglutinin of influenza virus stabilizes a hemifusion intermediate that can transit to fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 11(11), 3765–75.
- Melikyan, G., Markosyan, R., Brener, S., Rozenberg, Y., & Cohen, F. (2000b). Role of the cytoplasmic tail of ecotropic moloney murine leukemia virus Env protein in fusion pore formation. *Journal of Virology*, 74(1), 447–55.
- Mercer, J., Schelhaas, M., & Helenius, A. (2010). Virus entry by endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 803–33.
- Merritt, E. A., Sixma, T. K., Kalk, K. H., Ben, A., Zanten, M. Van, & Hop, W. G. J. (1994). Galactose-binding site in Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Molecular Microbiology*, 13(4), 745–753.
- Miyauchi, K., Komano, J., Yokomaku, Y., Sugiura, W., & Yamamoto, N. (2005). Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. *Journal of Virology*, 79(8), 4720–4729.
- Modis, Y. (2013). Class II fusion proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 790, 150–166.
- Moshe Reuven, E., Yakir, D., Viard, M., Manukovsky, N., Blumenthal, R., & Shai. (2012). HIV-1 gp41 Transmembrane Domain Interacts with the Fusion Peptide: Implication in Lipid Mixing and Inhibition of Virus-Cell Fusion. *Biochemistry*, 51(13), 2867–2878.
- Naeve, C. W., & Williams, D. (1990). Fatty acids on the A/Japan/305/57 influenza virus hemagglutinin have a role in membrane fusion. *The EMBO Journal*, 9(12), 3857–66.



- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger, Principios de Bioquímica 4ª Edición*.
- Nikolaus, J., & Herrmann, A. (2012). Functional relevance of transmembrane domains in membrane fusion. *Biological Chemistry*, 393(11), 1231–45.
- Obijeski, J. F., Bishop, D. H. L., Murphy, F. A., & Palmer, E. L. (1976a). Structural proteins of La Crosse virus. *Journal of Virology*, 19(3), 985–997.
- Obijeski, J. F., Bishop, D. H. L., Palmer, E. L., & Murphy, F. A. (1976b). Segmented genome and nucleocapsid of La Crosse virus. *Journal of Virology*, 20(3), 664–75.
- Odell, D., Wanas, E., Yan, J., & Ghosh, H. (1997). Influence of Membrane Anchoring and Cytoplasmic Domains on the Fusogenic Activity of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *Journal of Virology*, 71, 7996–8000.
- Ogino, M., Yoshimatsu, K., Ebihara, H., Araki, K., Lee, B., Okumura, M., & Arikawa, J. (2004). Cell Fusion Activities of Hantaan Virus Envelope Glycoproteins. *Journal of Virology*, 78(19), 10776–10782.
- Owens, R. J., Burke, C., & Rose, J. K. (1994). Mutations in the Membrane-Spanning Domain of the Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoprotein That Affect Fusion Activity av Fomean igfoftplasmid. *Journal of Virology*, 68(1), 570–574.
- Padula, P. J., Edelstein, A., Miguel, S. D., López, N. M., Rossi, C. M., & Rabinovich, R. D. (1998). Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology*, 241(2), 323–30.
- Paulick, M. G., & Bertozzi, C. R. (2008). The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring. *Biochemistry*, 47, 6991–7000.
- Pensiero, M. N., Sharefkin, J. B., Dieffenbach, C. W., & Hay, J. (1992). Hantaan virus infection of human endothelial cells. *Journal of Virology*, 66(10), 5929–5936.
- Pierson, T. C., & Kielian, M. (2013). Flaviviruses: braking the entering. *Current Opinion in Virology*, 3(1), 3–12.
- Plassmeyer, M. L., Soldan, S. S., Stachelek, K. M., Martín-García, J., & González-Scarano, F. (2005). California serogroup Gc (G1) glycoprotein is the principal determinant of pH-dependent cell fusion and entry. *Virology*, 338(1), 121–32.
- Plassmeyer, M. L., Soldan, S. S., Stachelek, K. M., Roth, S. M., Martín-García, J., & González-Scarano, F. (2007). Mutagenesis of the La Crosse Virus glycoprotein supports a role for Gc (1066-1087) as the fusion peptide. *Virology*, 358(2), 273–82.
- Plempner, R. (2011). Cell Entry of Enveloped Viruses. *Current Opinion in Virology*, 1(2), 92–100.

- Qi, R., Mullen, D. G., Baker Jr., J. R., & Banaszak Holl, M. M. (2010). The Mechanism of Poluplexes Internalization into Cells: Testing the GM1/Caveolin-1-Mediated Lipid Raft Mediated Endocytosis Pathway. *Molecular Pharmaceutics*, 7(1), 267–279.
- Qiao, H., Armstrong, R. T., Melikyan, G. B., Cohen, F. S., & White, J. M. (1999). A specific point mutant at position 1 of the influenza hemagglutinin fusion peptide displays a hemifusion phenotype. *Molecular Biology of the Cell*, 10(8), 2759–69.
- Rafferty, M. J., Kraus, A. A., Ulrich, R., Detlev, H., & Kru, D. H. (2002). Hantavirus Infection of Dendritic Cells. *Journal of Virology*, 76(21), 10724–10733.
- Ramanathan, H. N., & Jonsson, C. B. (2008). New and Old World hantaviruses differentially utilize host cytoskeletal components during their life cycles. *Virology*, 374(1), 138–50.
- Rosales Fritz, V. M., Daniotti, J. L., & Maccioni, H. J. (1997). Chinese hamster ovary cells lacking GM1 and GD1a synthesize gangliosides upon transfection with human GM2 synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1354(2), 153–8.
- Roth, M. G., Doyle, C., Sambrook, J., & Gething, M.-J. (1986). Heterologous Transmembrane and Cytoplasmic Domains Direct Funcional Chimeric Influenza Virus Hemagglutinins into the Endocytic Pathway. *The Journal of Cell Biology*, 102(April), 1271–1283.
- Sakai, T., Ohuchi, R., & Ohuchi, M. (2002). Fatty Acids on the A / USSR / 77 Influenza Virus Hemagglutinin Facilitate the Transition from Hemifusion to Fusion Pore Formation. *Journal of Virology*, 76(9), 4603–4611.
- Salzwedel, K., West, J. T., & 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. *Journal of Virology*, 73(3), 2469–2480.
- Schmaljohn, C. (2009). Vaccines for hantaviruses. *Vaccine*, 27 Suppl 4, D61–4.
- Schroth-diez, B., Ponimaskin, E., Reverey, H., Schmidt, M. F. G., & Herrmann, A. (1998). Fusion Activity of Transmembrane and Cytoplasmic Domain Chimeras of the Influenza Virus Glycoprotein Hemagglutinin. *Journal of Virology*, 72(1), 133–141.
- Schroth-Diez, B., Ludwig, K., Baljinnyam, B., Kozerski, C., Huang, Q., & Herrmann, A. (2000). The role of the transmembrane and of the intraviral domain of glycoproteins in membrane fusion of enveloped viruses. *Bioscience Reports*, 20(6), 571–95.

- Shang, L., Yue, L., & Hunter, E. (2008). Role of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in cell-cell fusion and virus infection. *Journal of Virology*, 82(11), 5417–28.
- Shang, L., & Hunter, E. (2010). Residues in the membrane-spanning domain core modulate conformation and fusogenicity of the HIV-1 envelope glycoprotein. *Virology*, 404(2), 158–167.
- Shi, X., Kohl, A., Li, P., & Elliott, R. M. (2007). Role of the cytoplasmic tail domains of Bunyamwera orthobunyavirus glycoproteins Gn and Gc in virus assembly and morphogenesis. *Journal of Virology*, 81(18), 10151–60.
- Sjöberg, M., & Garoff, H. (2003). Interactions between the Transmembrane Segments of the Alphavirus E1 and E2 Proteins Play a Role in Virus Budding and Fusion. *Journal of Virology*, 77(6), 3441–3450.
- Smith, E. C., Smith, S. E., Carter, J. R., Webb, S. R., Gibson, K. M., Hellman, L. M., Fired M.G. & Dutch, R. E. (2013). Trimeric transmembrane domain interactions in paramyxovirus fusion proteins: roles in protein folding, stability and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 35726-35735.
- Spies, C. P., & Compans, R. W. (1994). Effects of cytoplasmic domain length on cell surface expression and syncytium-forming capacity of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *Virology*, 203, 8–19.
- Taylor, G. M., & Sanders, D. A. (1999). The role of the membrane-spanning domain sequence in glycoprotein-mediated membrane fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 10(9), 2803–15.
- Tischler, N. D., Fernández, J., Müller, I., Martínez, R., Galeno, H., Villagra, E., Mora, J., Ramírez E., Roseblatt, M., Valenzuela P.D.T. (2003). Complete sequence of the genome of the human isolate of Andes virus CHI-7913: comparative sequence protein structure analysis. *Biological Research*, 36, 201–210.
- Tischler, N. D., Gonzalez, A., Perez-Acle, T., Roseblatt, M., & Valenzuela, P. D. T. (2005). Hantavirus Gc glycoprotein: evidence for a class II fusion protein. *The Journal of General Virology*, 86(Pt 11), 2937–47.
- Weiss, C. D., & White, J. M. (1993). Characterization of Stable Chinese Hamster Ovary Cells Expressing wild-type, secreted and Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein. *Journal of Virology*, 67(12), 7060–7066.
- Weissenhorn, W., Hinz, A., & Gaudin, Y. (2007). Virus membrane fusion. *FEBS Letters*, 581(11), 2150–5.

- West, J. T., Johnston, P. B., Dubay, S. R., & Hunter, E. (2001). Mutations within the Putative Membrane-Spanning Domain of the Simian Immunodeficiency Virus Transmembrane Glycoprotein Define the Minimal Requirements for Fusion, Incorporation, and Infectivity. *Journal of Virology*, 75(20), 9601–9612.
- White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M., & Schornberg, K. (2008). Structures and Mechanisms of Viral Membrane Fusion Proteins: Multiple Variations on a Common Theme. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43(3), 189–219.
- Yanagihara, R., & Silverman, D. J. (1990). Experimental infection of human vascular endothelial cells by pathogenic and nonpathogenic hantaviruses*. *Archives of Virology*, 111, 281–286.
- Yue, L., Shang, L., & Hunter, E. (2009). Truncation of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein defines elements required for fusion, incorporation, and infectivity. *Journal of Virology*, 83(22), 11588–98.