

UCH - FC
Biotecnología
M963
C.1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**“CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA
REGIÓN TRONCAL DE LA PROTEÍNA G_c DEL VIRUS ANDES
(HANTAVIRUS)”**

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

IGNACIO ALEJANDRO MUÑOZ LEÓN



Directora de Seminario de Título: Dra. Nicole Tischler

Co-Director de Seminario de Título: Dr. Octavio Monasterio

Noviembre 2009

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Ignacio Alejandro Muñoz León:

“CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA REGIÓN TRONCAL DE LA PROTEÍNA G_c DEL VIRUS ANDES (HANTAVIRUS)”

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

Dra. Nicole Tischler

Directora Seminario de Título

Dr. Octavio Monasterio

Co-Director

Comisión de Evaluación

Dr. Christian González-Billault

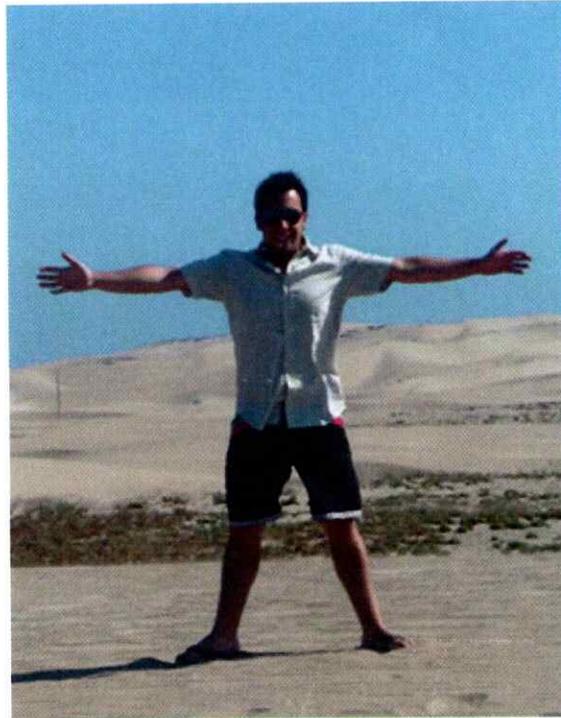
Presidente Comisión

Dr. Oscar León

Evaluador



27 de Noviembre del 2009, Santiago, Chile.



*A mi familia, amigos y a todos
quienes me acompañaron en este proceso*

AGRADECIMIENTOS

Partiré agradeciendo a Nicole, por su apoyo incondicional en el trabajo que he realizado y por la confianza que ha depositado en mí. Por ser más que una tutora, con quién no sólo he compartido un trabajo de laboratorio sino que también entablado una amistad. Por las incontables tardes en las que nos hemos quedado discutiendo sobre esta fascinante proteína! Su entusiasmo me ha hecho valorar y motivarme aún más en el trabajo que realicé.

Gracias también al profesor Octavio Monasterio, quien participó activamente en el desarrollo de este trabajo. Así cómo también a Luis Pouchucq quien me ayudó en experimentos y discusión de resultados, a Ángel González y Tomás Pérez-Acle del Centro de Bioinformática UC por su ayuda en modelamiento molecular y al profesor Pablo Valenzuela por la confianza depositada y el apoyo en las diferentes propuestas nacidas bajo esta investigación.

Agradecer también a mis compañeros del laboratorio, el team Hanta: Nicolás, Simón, Gonzalo y en su tiempo Anke, Toya, Rodrigo y Margarita, con quienes construimos un fuerte lazo de equipo, compartiendo tanto frustraciones como éxitos. Gracias también a mis amigos de la Fundación por generar un grato ambiente de trabajo: Carola, Sole, Eve, Mónica, Concho, Manuel entre muchos otros.

Dentro de los 6 años que he estado en la Universidad, he conocido gente que valoro y quiero, con los cuáles he creado un estrecho vínculo. Sin ellos el paso por la Universidad no hubiese sido el mismo. ¡Muchas gracias a todos!, a los rats!, a las pájaras! Tantas historias vividas, conversaciones, carretes, anécdotas, viajes, noches de estudios memorables, entre tantas otras cosas. Muchas gracias por su amistad e incondicional apoyo: a la Tami, la Fran, Felipe, Ulises, JP, Pao, Fefi, Gato, Perucete y muchos más! Me gratifica contar con un sólido grupo de amistades al término de esta etapa.

¡Gracias también a muchos amigos que ni el tiempo ni el espacio dan para mencionar!

Para terminar, gracias a mi familia: a mi mamá, mi papá y a mi hermano. Quienes me han querido, apoyado y soportado durante toda mi vida y en particular durante todo este proceso.

¡¡Gracias a todos uds!!



Nacho

INDICE DE CONTENIDOS



INDICE DE TABLAS	III
INDICE DE FIGURAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VIII
INTRODUCCION	1
Hantavirus: Características generales.....	1
Proteínas de fusión virales.....	3
Fusión de membranas biológicas.....	6
Regiones funcionales dentro de las proteínas de fusión.....	7
HIPOTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECIFICOS	13
MATERIALES Y METODOS	14
Análisis Bioinformático.....	14
Reconstrucción de la región troncal de la proteína E del virus Dengue.....	15
Modelamiento por comparación.....	16
Modelamiento por <i>Threading</i>	16
Dinámica molecular en cascada.....	17
Síntesis de péptidos.....	18
Dicroísmo circular.....	18
Preparación de liposomas.....	20
Biotinilización de péptidos.....	20
Coflotación de péptidos con liposomas.....	21
Medición del índice de refracción.....	22
Fluorescencia de 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH).....	22
<i>Slot blot</i>	22
RESULTADOS	24
Identificación y análisis de la región troncal de ANDV Gc.....	24
Modelamiento molecular de la región troncal de ANDV Gc.....	25
Dicroísmo circular.....	28
Análisis fisicoquímico de la región troncal de ANDV Gc.....	30
Interacción de la región troncal de ANDV Gc con membranas modelos.....	32
DISCUSION	41



CONCLUSIONES	49
PROYECCIONES	50
MATERIAL SUPLEMENTARIO	52
BIBLIOGRAFIA	57

INDICE DE TABLAS



Tabla S1. Resultados del modelamiento por comparación_____	54
Tabla S2. Resultados del modelamiento por <i>Threading</i> usando el servidor LOMETS_____	54
Tabla S3. Análisis comparativo de los modelos tridimensionales obtenidos mediante diferentes métodos_____	55
Tabla S4. Deconvolución de espectros de dicroísmo circular para péptidos de ANDV Gc_____	55
Tabla S5. Densidades de las fracciones obtenidas posterior a la ultracentrifugación_____	56
Tabla S6. Fluorescencia de liposomas marcados con DPH contenidos en fracciones obtenidas posterior a ultracentrifugación_____	57

INDICE DE FIGURAS



Figura 1. Clases de proteínas de fusión virales _____	11
Figura 2. Modelo para la fusión de membranas mediada por proteínas de fusión clase II _____	12
Figura 3. Alineamiento múltiple de regiones troncales conocidas y predichas de tres géneros virales con proteínas de fusión clase II _____	34
Figura 4. Modelos tridimensionales de la probable región troncal de ANDV Gc obtenidos mediante modelamiento por comparación con la región troncal de DENV E _____	35
Figura 5. Modelos tridimensionales de las regiones H1 y H2 de la probable región troncal de ANDV Gc obtenidos por <i>Threading</i> _____	35
Figura 6. Espectros de dicroísmo circular de péptidos análogos a la probable región troncal de ANDV Gc _____	36
Figura 7. Contenido de estructura secundaria de péptidos análogos a la probable región troncal de ANDV Gc _____	37
Figura 8. Representación en rueda de las hélices de la probable región troncal _____	38
Figura 9. Hidrofobicidad de regiones troncales y transmembranas predichas y conocidas de ANDV Gc y DENV E _____	39
Figura 10. Coflotación de péptidos con liposomas _____	40
Figura S1. Identificación teórica del segmento transmembrana de ANDV Gc utilizando TMHMM _____	52
Figura S2. Predicciones de estructura secundaria de regiones troncales de Gc de distintos hantavirus _____	52
Figura S3. Alineamiento entre la región troncal de la proteína de fusión E de DENV y la región equivalente de ANDV Gc _____	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ANDV	Virus Andes
ARN	Ácido Ribonucleico
DC	Dicroísmo circular
DENV	Virus Dengue
DOPE	<i>Discrete Optimized Protein Energy</i>
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
ENTH	Epsina homólogo N-terminal
FHSR	Fiebre hemorrágica con síndrome renal
GPC	<i>Glycoprotein precursor</i>
<i>LUV's</i>	Vesículas unilamelares grandes
PBS	Buffer fosfato salino
RMS	Desviación cuadrática media
SPHV	Síndrome pulmonar por hantavirus
TFE	2,2,2- Trifluoroetanol
TM	Transmembrana
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VSV	Virus de la Estomatitis Vesicular
WW	Hidrofobicidad interfacial Wimley & White

RESUMEN

Los hantavirus son virus envueltos con un genoma tripartito de RNA monohebra sentido negativo capaces de infectar humanos. En Chile, desde el año 1995 se ha descrito la presencia de la especie virus Andes (ANDV). En su membrana de envoltura se encuentran ancladas dos glicoproteínas: Gn y Gc. Se postula que Gn es la proteína que reconoce al receptor celular, mientras que nuestro laboratorio ha demostrado previamente que Gc es la proteína que fusiona la membrana viral con la membrana celular, permitiendo de esta forma la entrada de las ribonucleocápsides virales al citoplasma celular. Gc ha sido clasificada como proteína de fusión clase II, las cuales poseen un gran ectodominio amino-terminal rico en hojas- β y están ancladas a la membrana viral por un segmento transmembrana carboxilo-terminal. La región troncal corresponde a la región que comunica el ectodominio con el segmento transmembrana. En esta tesis se identificó la región troncal de ANDV Gc y se caracterizó su estructura e interacción con membranas. Usando inicialmente herramientas *in silico* se encontró que la probable región troncal de ANDV Gc puede estar formada por dos hélices α conectadas (denominadas H1 y H2), lo cual se corroboró midiendo el espectro de dicroísmo circular a péptidos análogos de esta región. Por otra parte, se predijo que la región H2 corresponde a una hélice anfipática que se localiza en la interfase de membrana/agua, sin encontrar el mismo patrón para H1. En ensayos *in vitro* de péptidos análogos con liposomas se demostró que tanto la región H1, H2 como la región troncal completa de ANDV Gc fueron capaces de interactuar con membranas modelos. Los resultados encontrados concuerdan con lo descrito para la región troncal de la proteína E del virus Dengue, que corresponde actualmente a la única estructura disponible de esta región para proteínas de fusión clase II. Proponemos que la región troncal de ANDV Gc y de otras proteínas de fusión clase II es capaz de inducir estrés elástico en la membrana viral, favoreciendo de ésta forma el proceso de fusión entre membranas. Estudios para apoyar esta hipótesis se están realizando como continuación de esta tesis.

ABSTRACT

Hantaviruses are enveloped viruses with a tripartite genome consisting of single strand negative polarity RNA capable to infect humans. In Chile, the presence of the Andes virus specie (ANDV) has been described since 1995. In their envelope membranes two glycoprotein are anchored: Gn and Gc. It has been postulated that Gn is the protein that recognizes the cellular receptor, while we have previously shown that Gc is the protein that promotes the fusion between the viral and the cellular membrane. Gc has been classified as a class II fusion protein, which has a large N-terminal ectodomain rich in β -sheets and is anchored to the viral membrane through a C-terminal transmembrane segment. The stem region connects the ectodomain with the transmembrane segment. In this thesis, the stem region of ANDV Gc has been identified, and its structure and membrane interaction properties characterized. Using as a first approach *in silico* tools, it was found that the stem region of ANDV Gc may be formed by two connected α -helices (termed H1 and H2). This was confirmed using circular dichroism of different analogous peptides spanning this region. Also, it was predicted that the region H2 corresponds to an amphipatic helix that localizes at the membrane water interface, a pattern which was not found for the H1 region. *In vitro* assays of analogous peptides incubated with liposomes showed that the regions H1, H2 and the full stem region of ANDV Gc were able to interact with model membranes. The found results coincide with the structural characterization of the stem region of the Dengue virus E protein, which corresponds currently to the unique information of class II stem regions. We propose that the stem region of ANDV Gc and other class II fusion proteins is able to induce elastic stress in the viral membrane, promoting by these means the membrane fusion process. Studies to support this hypothesis are currently being performed as continuation of this thesis.

INTRODUCCION

Hantavirus: Características generales

Los hantavirus pertenecen a la familia *Bunyaviridae*, la cual abarca más de 300 virus clasificados en cinco géneros y es una de las familias virales más grandes que infecta tanto animales como plantas. A pesar de su gran diversidad, estos virus coinciden en su organización genómica de ARN simple hebra con polaridad negativa tripartita, su ensamblaje en el aparato de Golgi y la morfología de sus partículas virales. Los hantavirus son envueltos de forma esférica y su genoma de tres segmentos codifica para cuatro proteínas diferentes: el segmento de mayor tamaño codifica para una ARN polimerasa dependiente de ARN, mientras que el segmento de menor tamaño codifica para una nucleoproteína. Una proteína precursora glicosilada es codificada por el segmento mediano: GPC (*glycoprotein precursor*). Ésta es posteriormente cortada por una proteasa celular originando dos proteínas denominadas Gn y Gc de acuerdo a su posición (N- o C- terminal) en el precursor. Estas últimas corresponden a glicoproteínas de superficie y se localizan ancladas en la envoltura lipídica del virus. Las glicoproteínas virales son responsables del reconocimiento del receptor celular y posterior entrada a la célula blanco mediante la fusión de la membrana viral con la membrana blanco. Gc corresponde a la proteína de fusión de los hantavirus (Tischler y col, 2005), mientras que Gn es la responsable del reconocimiento del receptor (Plassmeyer y col, 2005).

Los hantavirus reconocen a receptores del tipo integrina $\alpha_v\beta_3$ presentes en células endoteliales y macrófagos (Pensiero y col, 1992 y Gavrillovskaya y col, 1998). Luego de la unión al receptor, los hantavirus entran a la célula a través de endocitosis mediada por clatrina (Jin y col, 2002). Durante la maduración del

endosoma su pH disminuye y aquí es cuando se fusionan la membrana viral con la membrana endosomal, liberándose las ribonucleocápsides al citoplasma. Para ello se requiere que el pH del endosoma sea menor a 6.3, puesto que las glicoproteínas de hantavirus se activan a este pH ocasionando la fusión de membranas (Arikawa y col, 1985).

Los hantavirus patogénicos se encuentran distribuidos a nivel global y son causantes de dos severos cuadros clínicos en humanos: la fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR) y el síndrome pulmonar por hantavirus (SPHV), siendo la vía de contagio hacia humanos la inhalación de aerosoles provenientes de heces y saliva de roedores infectados. Las infecciones por hantavirus ocasionan en Europa y Asia principalmente síndromes renales. En América, recién en 1993 se describió el primer caso de infección humana por un hantavirus (especie *Sin nombre virus*) en EE.UU., y desde la fecha, se han producido casos a lo largo de todo el continente americano. Los hantavirus presentes en América se diferencian de los de Eurasia en que éstos ocasionan principalmente síndromes pulmonares en vez de síndromes renales. En Chile y Argentina se encuentra presente la especie *virus Andes* (ANDV), cuyo primer caso de infección se describió en 1995. Este virus causa una mortalidad cercana al 40% y es transmitido por el roedor *Oligoryzomys longicaudatus* (Levis y col, 1998).

A la fecha no existe un tratamiento específico contra infecciones por hantavirus. En algunos pacientes se han realizado transferencias de sueros de pacientes sobrevivientes hacia pacientes en la fase aguda, esperando que los anticuerpos del suero sean capaces de neutralizar al virus. De esta forma impiden que el virus se disemine por el cuerpo con el resultado de mejorar la sobrevivencia de los pacientes (datos no publicados). El uso de agentes anti-virales como ribavirina es ineficiente

en pacientes con SPHV (Mertz y col, 2004), por lo que en este escenario urge el desarrollo de drogas específicas contra infecciones por hantavirus.

Proteínas de fusión virales

Para que un virus envuelto se replique al interior de la célula hospedera requiere el ingreso de su genoma al interior de ésta. Este proceso requiere de la fusión de las membranas virales con la membrana blanco, el cual es llevado a cabo por las proteínas de fusión virales. La fusión de la membrana viral puede ocurrir con la membrana plasmática o con una membrana en una localización intracelular después de la internalización del virus por endocitosis.

La fusión de membranas es un proceso altamente endergónico, puesto que la bicapa lipídica es una estructura altamente estable. La energía para que ocurra la fusión entre membranas proviene del cambio conformacional o de la reorganización que sufre la proteína de fusión (Kielian & Rey, 2005). El gatillante de este cambio depende del virus en cuestión, por ejemplo, para los hantavirus el factor de iniciación es el bajo pH que se encuentra dentro del endosoma (Arikawa y col, 1985), mientras que para otros virus, por ejemplo para el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el inicio de la fusión es gatillado por la interacción secuencial con el receptor (CD4) y un co-receptor (CCR5/ CXCR4) (Gallo y col, 2003).

Tres clases de proteínas de fusión han sido descritas en base a sus características estructurales. Dentro de las proteínas de fusión de clase I se encuentran: gp41 del VIH, hemaglutinina HA2 del virus de la influenza y proteína GP2 del virus Ebola. Estructuralmente poseen un alto contenido de hélices α (ver figura 1a) (revisado en Jardetzky & Lamb, 2004 y Kielian & Rey, 2005). En su conformación pre-fusión,

están formando un homotrímero, el cual se encuentra en un estado metaestable en la superficie del virión. Cuando la proteína es activada sufre un cambio conformacional que termina en un homotrímero altamente estable. El péptido de fusión corresponde a un péptido helicoidal de carácter anfipático localizado en el extremo N-terminal. Éste se inserta en la membrana blanco e inicia el proceso de fusión, el cuál terminará con la formación de un poro, conectando los dos compartimentos membranosos (ver Figura 1a) (revisado en Gallo y col, 2003; Jardetzky & Lamb, 2004 y en Kielian & Rey, 2006).

Proteínas de fusión de clase II y clase III también catalizan la formación de un poro de fusión mediante un mecanismo esencialmente similar (Zaitseva y col, 2005), pero su estructura es completamente diferente. La estructura de las proteínas de fusión de clase III recientemente se describió y consiste en hélices α y hojas β (ver Figura 1c); formando, al igual que clase I, homotrímeros antes y después de la fusión. A esta clase pertenecen las proteínas de fusión gB del virus herpes simple y G del virus de la estomatitis vesicular (revisado en Weissenhorn y col, 2007).

La proteína Gc de los hantavirus se ha clasificado como una proteína de fusión de clase II (Tischler y col. 2005). Los miembros clásicos de proteínas de fusión de clase II son las proteínas de fusión E de los virus Dengue (DENV) y *Tick-borne encephalitis* (TBEV), ambos pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, y la proteína E1 del alphavirus *Semliki Forest* (SFV), perteneciente a la familia *Togaviridae*. A pesar de su baja similitud a nivel de secuencia aminoacídica, sus estructuras secundarias y terciarias son altamente similares (Zhang y col, 2003; Modis y col, 2004; Gibbons y col, 2004).

Estructuralmente, las proteínas de fusión de clase II poseen un gran ectodominio amino terminal, el cual está formado por tres dominios globulares compuestos

principalmente por hojas β (ver figura 1b). El dominio II contiene el péptido de fusión en su extremo. A diferencia de las proteínas de fusión de clase I, éste corresponde a una horquilla anfipática y no a una hélice anfipática N-terminal. El dominio I contiene el extremo N-terminal y conecta al dominio II con el dominio III. El segmento transmembrana, localizado al extremo C-terminal ancla la proteína a la membrana viral. El ectodominio es conectado mediante el dominio III al segmento transmembrana mediante una región de tamaño variable denominada región troncal o región pre-transmembrana (ver figura 2a) (Kielian, 2006).

A diferencia de las proteínas de fusión de clase I y clase III, las proteínas de fusión de clase II sufren un cambio oligomérico, pasando de un heterodímero metaestable a un homotrímero estable (en el caso de los Bunyavirus el heterodímero consiste en Gn-Gc). Durante la fusión, las proteínas de fusión clase II se disocian del dímero, se reorientan, pasando de estar paralelas a ubicarse perpendicularmente respecto a la superficie viral (Gibbons y col, 2004). En esta posición pueden insertar el péptido de fusión en la membrana blanco. Además, las subunidades se encuentran paralelas entre sí, lo que favorece la trimerización. En este momento, el ectodominio comienza a sufrir una reorganización, en el cual el dominio III con la región troncal llegan a desplazarse hasta 40Å hacia una cavidad localizada entre los dominios I y II. Al término de esta reorganización, el segmento transmembrana se localiza junto al péptido de fusión, y las membranas se han fusionado formando un poro de fusión (ver figura 2) (Kielian & Rey, 2006).

En la conformación trimérica post-fusión, la parte central del trímero está compuesto por los dominios I y II, mientras que la superficie externa, por el dominio III y la región troncal. Una etapa crítica en la formación del trímero y la fusión de membranas, por ende, consiste en el empaque del dominio III y la región troncal contra los dominios I y II (ver figura 2c-e). La adición exógena de dominios III

recombinantes durante la fusión de los alphavirus y flavivirus inhibe la reacción de fusión viral y, por ende, la infección (Liao & Kielian, 2005). Además, se ha mostrado que péptidos análogos a la región troncal también logran la inhibición de la fusión en el caso de flavivirus (Hrobowski y col, 2005), no así en el caso de alphavirus. Éste es un ejemplo de cómo la información molecular sobre la fusión viral permitiría el desarrollo de drogas anti-virales que impiden la fusión.

Fusión de membranas biológicas: mecanismo, energía y rol de las proteínas de fusión

La fusión de dos membranas biológicas implica al menos tres etapas: el contacto inicial entre las dos bicapas, la hemifusión de éstas, terminando con la formación y expansión de un poro de fusión. La hemifusión corresponde a un estado intermedio en el cual sólo las monocapas exteriores de las bicapas se han fusionado, pero las monocapas internas se mantienen intactas (ver la membrana de la figura 2d).

El contacto inicial de las dos bicapas depende de la capa de hidratación y de que la zona de contacto se encuentre libre de proteínas. El establecimiento de un contacto inicial no es suficiente para que ocurra la hemifusión de membranas. La energía para que ésta ocurra puede provenir de la curvatura de la membrana (Chernomorkik y Kozlov, 2003). Todas las membranas poseen una curvatura espontánea, la cual es definida proporcionalmente por la curvatura de cada lípido que la compone. Si la curvatura de la membrana es diferente de su curvatura espontánea se encuentra bajo estrés elástico. Este estrés promueve la hemifusión de membranas. Las proteínas de fusión generan estrés elástico en la membrana blanco debido a la inserción del péptido de fusión (Chernomordik y col, 2006).

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

Regiones funcionales dentro de las proteínas de fusión

El mecanismo mediante el cual las proteínas de fusión permiten la formación de un poro de fusión es un proceso complejo que involucra diferentes regiones dentro de la misma proteína. En el caso de la proteína gp41 del VIH, a pesar de que inicialmente se pensaba de que la proteína interactuaba con membranas sólo mediante el péptido de fusión y la región transmembrana, se ha mostrado que diferentes regiones son capaces de interactuar con membranas modelos, indicando que podrían tener un rol en el proceso de fusión viral (Moreno y col, 2006). A pesar de que la mayoría de estos estudios se han centrado en proteínas de fusión de clase I, como las de retrovirus y coronavirus (Guillén y col, 2005), el concepto de regiones funcionales dentro de las proteínas de fusión puede ser aplicable a todas las clases.

Regiones que son capaces de ocasionar un estrés elástico en la membrana, tanto viral como blanco, favorecerán la fusión de membranas, por lo que tanto el péptido de fusión como la región transmembrana son fundamentales para este proceso. El péptido de fusión, en general, no acepta mutaciones (revisado en Eband, 2003), y

el segmento transmembrana no puede ser reemplazado por una región de anclaje periférico a membrana (anclaje de glicofosfatidilinositol), sino que debe estar presente la secuencia aminoacídica hidrófoba que atraviesa la membrana (Odell y col, 1997).

El concepto de hidrofobicidad interfacial ha sido introducido al momento de analizar posibles regiones funcionales dentro de la proteína de fusión. Éste se basa en una nueva escala de hidrofobicidad denominada escala de Wimley-White (WW) (Wimley & White, 1996), la cual calcula la energía libre necesaria para transferir cada aminoácido de agua a una interfase membrana-agua. Esta escala ha sido útil para la detección de secuencias virales que muestran una tendencia a localizarse en interfases de membrana-agua, por lo que podrían contribuir a generar un estrés elástico en ésta, facilitando la fusión de membranas (Lorizate, 2008).

Al analizar las regiones pre-transmembranas o troncales¹ de diferentes familias virales (retrovirus, coronavirus, filovirus, orthomyxovirus, rhabdovirus) se ha visto que poseen un alto contenido de aminoácidos aromáticos, en especial, de triptófanos (Suárez y col, 2000). Además muestran una alta hidrofobicidad interfacial y un alto contenido helicoidal (revisado en Lorizate y col, 2008). Estas características han motivado que diferentes estudios se centren en esta región.

En el caso del segmento pre-transmembrana de la proteína gp41 del VIH se ha visto que posee estructura helicoidal y que es capaz de interactuar con membranas modelos promoviendo además la fusión y formación de poros en ellas, de esta forma, se postula que juega un rol importante en la fusión al desestabilizar las membranas (Schilibi y col, 2001 y Sáez-Ciri3n y col, 2003). Análisis mutacionales

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

han mostrado que esta región es necesaria para la fusión de membranas (Salzwedel y col, 1999). La delección de la región completa anula la actividad fusogénica de la proteína sin afectar su maduración, transporte o habilidad de unirse al receptor CD4. El mismo fenotipo se observó al sustituir los cinco triptófanos conservados por alaninas (W1-5A). En este caso, las mutantes eran incapaces de agrandar los poros de fusión iniciales. Por el contrario, al mutar un triptófano central por prolina (W672P) no hubo efecto en la actividad fusogénica. En resumen, se requiere que la región pre-transmembrana de gp41 posea un largo mínimo y una hidrofobicidad interfacial alta, pero la estructura helicoidal aparentemente no es necesaria. Por otra parte, se ha visto que esta región se requiere para la incorporación de la proteína en los viriones, por lo que podría participar también en la fisión de membranas (Salzwedel y col, 1999).

Para la proteína G de VSV se ha descrito que la región troncal contribuye al ensamblaje del virión, es capaz de inducir hemifusión y puede potenciar la fusión de proteínas fusogénicas virales heterólogas (Robinson & Whitt, 2000; Jeetendra y col, 2002). Estudios previos con esta proteína han mostrado que la distancia entre el ectodominio y el segmento transmembrana son importantes para la actividad fusogénica. Además existe un requerimiento de secuencia específica en la región troncal, pero a diferencia de gp41 del VIH los triptófanos no son esenciales (Jeetendra y col, 2003).

Para proteínas de fusión clase II existen estudios realizados con flavivirus y alphavirus. Las regiones troncales de los flavivirus corresponden a dos hélices α localizadas en la cara externa de la membrana viral (Zhang y col, 2003). Mediante análisis mutacionales se ha visto que la región troncal juega un rol fundamental en la formación del homotrímero durante la fusión de membranas (Allison y col, 1999). Pero no hay estudios que analizan si péptidos análogos producen un efecto en

membranas ni estudios que determinan residuos claves dentro de la región. Por otra parte, estudios con alphavirus han mostrado que la región troncal participa en el ensamblaje y también en interacciones que estabilizan el homotrímero. Análisis mutacionales demostraron que la secuencia no es importante para la actividad fusogénica y tal como para la proteína G de VSV, se requiere de un largo mínimo (Liao & Kielian, 2006). Al igual que para los flavivirus, no se han realizado estudios con péptidos análogos.

Como conclusión, no existe un consenso general sobre el rol de la región troncal en proteínas de fusión de clase II. Además, dentro de las proteínas de fusión de clase II esta región muestra gran variación. Por ejemplo, la de los flavivirus es mucho más estructurada que la de los alphavirus y también de un largo mayor (50 residuos versus 30 residuos aproximadamente). Mayores estudios para determinar la función en el proceso de fusión de membranas de la región troncal son necesarios.

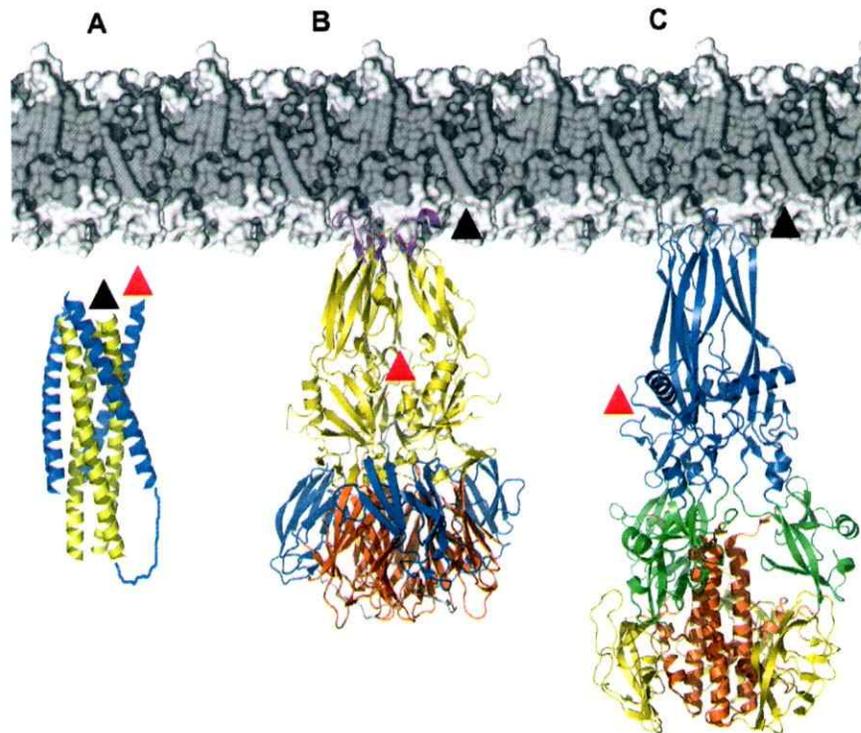


Figura 1. Clases de proteínas de fusión virales. Diagrama de cintas para tres ectodominios en su estado trimérico post-fusión. **(A)** Clase I: proteína gp41 del VIH. **(B)** Clase II: proteína E del virus Dengue. **(C)** Clase III: proteína G de VSV. Los péptidos de fusión se indican como un triángulo negro. Sólo existe información cristalográfica de los ectodominios, es por eso que no se muestran ni la región troncal ni el segmento transmembrana. El triángulo rojo muestra donde comienza la región troncal. (Tomado de Weissenhorn y col, 2007).

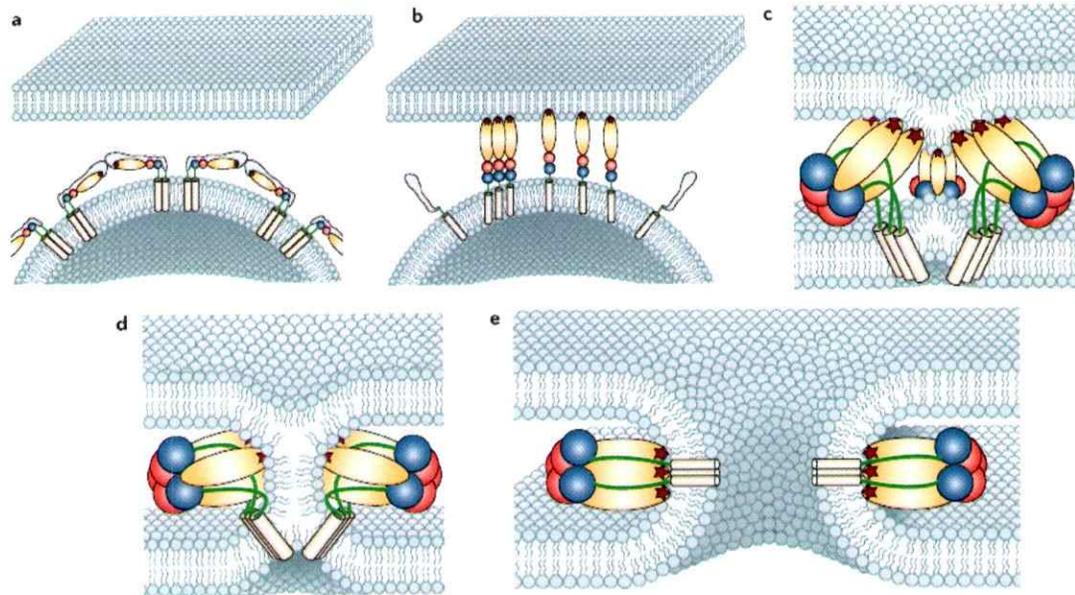


Figura 2. Modelo para la fusión de membranas mediada por proteínas de fusión clase II. (A) En la superficie del virión se encuentran las proteínas de fusión en su estado pre-fusogénico en forma de heterodímero. (B) Al activarse se disocian, se relocalizan perpendicularmente respecto a la membrana insertando el péptido de fusión en la membrana blanco. (C) Al trimerizar comienza el reordenamiento del dominio III y la región troncal. (D) Debido al reordenamiento, las membranas comienzan a fusionarse pasando por el estado intermedio de hemifusión. (E) Formación de un poro de fusión y estado post-fusión de la proteína. El dominio I se representa en amarillo; el dominio II, en rojo; el dominio III, en azul; la región troncal se encuentra trazada verde; el segmento transmembrana es indicado en blanco y el péptido de fusión es representado por una estrella roja (Tomado de Kielian & Rey, 2006).

HIPOTESIS

“La región troncal de la proteína de fusión Gc del virus Andes (ANDV) posee un alto contenido helicoidal y es capaz de interactuar con membranas”.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la estructura y la capacidad de interacción con membranas modelos de la región troncal de la proteína de fusión Gc de ANDV.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Identificar teóricamente la región troncal de ANDV Gc
2. Analizar la conservación de la región troncal de Gc dentro del género *Hantavirus*.
3. Determinar la estructura de la región troncal de ANDV Gc.
4. Determinar la capacidad de interactuar con membranas modelos de la región troncal de ANDV Gc.

MATERIALES Y METODOS

Análisis Bioinformático

La probable región troncal de la proteína Gc de ANDV (número de acceso de *Genbank*: 30313865) se identificó bioinformáticamente. El ectodominio de Gc se modeló previamente por nuestro laboratorio (Tischler y col, 2005). El segmento transmembrana se predijo usando el programa TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>). Contando con la identificación de estos dos segmentos se pudo identificar teóricamente la región troncal, ya que comunica al ectodominio con el segmento transmembrana.

Por analogía con ANDV Gc se identificó la región troncal de las proteínas de fusión de otras especies representativas del género *Hantavirus* (números de acceso de *Genbank*: 639775, 17149025, 82780787, 435651, 39573681, 38371724, 75568149, 310903, 38565476 y 2199579). Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias para determinar el grado de conservación de esta región. Se usó el programa ClustaW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) con la matriz de sustitución de residuos Blosum62. Además se realizó un alineamiento de las regiones troncales de otros géneros virales que corresponden a proteínas de fusión clase II (*Alphavirus* y *Flavivirus*). La región troncal de los alphavirus ya estaba definida experimentalmente (Liao & Kielian, 2006). Para los flavivirus, también se usó información experimental (Allison y col, 1999; Zhang y col, 2003; Bonaldo y col, 2007). Las secuencias utilizadas fueron las siguientes: alphavirus: números de acceso en *Genbank*: 496957, 25121513, 25121500, 25140297, 29611994, 29653361, 40317152, P27284.1, 25121761 y 25121770. Flavivirus: números de acceso en *Genbank*: 123874531, 75569535, 123879868, 81932586, 75569466, 27696328, 81942093, 829369, 16945826 y 24418982.

Predicciones de estructura secundaria se realizaron utilizando NPS@ (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/dbbrowser/bioactivity/NPS2.html>), el cual entrega una predicción consenso utilizando ocho diferentes algoritmos.

Para analizar la distribución de hélices α en cuanto a la disposición de los residuos apolares versus los polares se utilizó el programa *HeliQuest* (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr>), con una ventana correspondiente a la secuencia completa.

Para determinar la tendencia de la región troncal de localizarse en interfase agua-membrana se utilizó la escala de hidrofobicidad interfacial de Wimley-White (WW) (Wimley & White, 1996). Se promedió el valor de hidrofobicidad interfacial con una ventana de 15 residuos. También se utilizó la escala de hidrofobicidad de octanol (Wimley y col, 1996).

Reconstrucción de la región troncal de la proteína E del virus Dengue

Los únicos datos disponibles sobre la estructura de regiones troncales de proteínas de fusión clase II corresponde a una crío-microscopía electrónica de la proteína E del virus Dengue (Zhang y col, 2003). La resolución de esta estructura es de 9,5 Å y muestra que la región troncal está compuesta por dos hélices α que interactúan con la membrana viral. En el mapa no están presentes los primeros cuatro residuos de la región troncal (396-SSIG-399). A partir del mapa de carbonos α disponible (código 1P58), se reconstruyó la región troncal de DENV E. Para esto, se insertaron las cadenas laterales y se refinó su posición utilizando el algoritmo *ChiRotor* (Spasov y col, 2007). Luego se aplicó una minimización energética para determinar la configuración de los átomos que daba menor energía a la estructura, la cual consistió en una minimización a convergencia usando una tolerancia raíz

cuadrática media (RMS) de 0,1 kcal/mol* Å y una tolerancia de energía de 0,01 usando el programa *Studio* (Accelrys). La minimización energética se realizó en un ambiente con solvente implícito (constante dieléctrica del medio = 80). La estructura resultante se analizó respecto a los ángulos de Ramachandran usando RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) y respecto a la estereoquímica de los residuos usando Verify 3D (http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D/). Además se calculó la energía de cada residuo en la cadena usando ANOLEA (<http://swissmodel.expasy.org/anolea/>). Posteriormente, la estructura se sometió a una dinámica molecular en cascada (ver más adelante) para ver si la estructura se mantenía en el tiempo.

Modelamiento por comparación

La estructura de la región troncal de la proteína E del virus Dengue se utilizó como patrón para modelar la región equivalente de ANDV Gc. El alineamiento entre ambas secuencias se optimizó a mano para maximizar la similitud entre ambas. 100 modelos se obtuvieron de MODELER, utilizando el software *Discovery Studio* (Accelrys Inc.). Estos modelos se ordenaron en base a su puntaje DOPE (*Discrete Optimized Protein Energy*). Los modelos se analizaron como se mencionó anteriormente. Los 10 mejores modelos se sometieron a una dinámica molecular en cascada (ver abajo).

Modelamiento por *Threading*

Diversos servidores *on-line* que realizan *threading* se utilizaron: FUGUE (<http://tardis.nibio.go.jp/fugue/prfsearch.html>), LOOPP

(<http://cbsuapps.fc.cornell.edu/loopp.aspx>), Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>), I-TASSER (<http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER/>), MUSTER (<http://zhang.bioinformatics.ku.edu/MUSTER/>) y LOMETS (<http://zhang.bioinformatics.ku.edu/LOMETS/>). Los modelos obtenidos en cada uno de los casos se analizaron usando el *Z-score* de cada programa para determinar la confianza de la predicción. No se obtuvieron modelos válidos usando la región troncal completa. Cuando ésta se dividió en las regiones correspondientes a H1 (H413-Y419) y H2 (T437-N456) (definidas en la sección de resultados) se obtuvieron resultados válidos usando LOMETS (Wu & Zhang, 2007). Un modelo de H1 y uno de H2 se sometieron a dinámica molecular en cascada (ver abajo).

Dinámica molecular en cascada

Como una forma de validar las estructuras obtenidas, se aplicó una dinámica molecular en cascada para analizar si la estructura se mantenía en el tiempo. Ésta consistió en 5 etapas: 2 minimizaciones energéticas para generar una estructura con la menor energía posible, es decir, la estructura más probable. Ésta se calentó, para darle energía al sistema, dejándose equilibrar hasta que la energía se mantuvo estable y una vez que llegó al equilibrio se realizaron los análisis. Para toda la dinámica se utilizó el programa *Discovery Studio* (Accelrys Inc.) aplicando un campo de fuerza CHARMM. Así, para la primera minimización de energía se puso una tolerancia raíz cuadrada media (RMS) de 0,1 kcal/mol*Å y la tolerancia de energía a 0,01 kcal. Se hizo una segunda minimización de energía más rigurosa, aumentando la tolerancia RMS a 0,01 kcal/mol* Å y la tolerancia de energía a 0,001 kcal. La etapa de calentamiento se realizó en 2000 pasos elevando la temperatura del sistema de 50°K a 300°K. La etapa de equilibrio se realizó en

100.000 pasos con un 1fs por paso sin ninguna restricción al enlace peptídico (tiempo total de simulación = 100ps). Y por último se realizó una producción en 100.000 pasos con un 1fs por paso usando un ensamble NVT (número de moléculas, temperatura y volumen constante). Toda la dinámica se realizó con solvente implícito (constante dieléctrica del medio = 80). Se comparó la estructura inicial con la final después de la dinámica.

Síntesis de péptidos

Tres péptidos se sintetizaron (New England Peptides, pureza >85%). GcSt H1 (413-HLERVTGFNQIDSDKVY-429) correspondiente a la región denominada hélice uno de ANDV Gc. GcSt H2 (437-TFKCWFTKSGEWLLGILNGN- 456) correspondiente a la región denominada hélice dos de ANDV Gc. Y GcSt (413-HLERVTGFNQIDSDKVYDDGAPPCTFKCWFTKSGEWLLGILNGN-456) correspondiente a la probable región troncal completa de ANDV Gc.

Dicroísmo Circular (DC)

Para determinar el contenido de estructura secundaria de los péptidos se realizó DC. Esta técnica se basa en que la absorción de la luz circularmente polarizada es diferente tanto para una hélice α , una hoja β como para una estructura al azar. Una vez tomado el espectro de DC, este se compara con una base de datos de proteínas con estructura conocida, y mediante un proceso denominado deconvolución se puede obtener el contenido de estructura secundaria de la muestra de interés.

Se midieron los espectros de los péptidos en tampón (tampón fosfato 10 mM, pH 7,0 para GcSt H1 y GcSt; tampón borato 10 mM, pH 9,0 para GcSt H2). La concentración de péptido a usar se determinó experimentalmente, siendo elegida aquella que daba una mayor relación señal/ruido. Éstas fueron: GcSt H1: 0,5 mg/ml; GcSt H2: 0,25 mg/ml y GcSt: 0,35 mg/ml. Además se realizó una titulación con 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), como agente inductor del plegamiento (Roccatano y col, 2002). Se utilizaron los siguientes parámetros de medición: tiempo de respuesta: 1 s; ancho de banda: 1 nm; velocidad de barrido: 50 nm/min. Se realizaron cinco barridos de 250 nm a 190 nm los cuales se promediaron para entregar el espectro final.

Una vez adquirido los espectros de DC, estos se suavizaron utilizando un algoritmo de Savitzky-Golay (Savitzky & Golay, 1964) con el software *Igor Pro* (WaveMetrics, Inc). El valor de elipticidad (θ) obtenido en el espectro se transformó a elipticidad residuo promedio ($[\theta]_{MRW}$) usando la ecuación 1, donde PM corresponde al peso molecular en Dalton, c a la concentración de la muestra en mg/ml, l a la longitud del paso óptico en cm y n al número de residuos de la proteína.

$$[\theta]_{MRW} = \frac{100 \cdot \theta \cdot PM}{c \cdot l \cdot n} \left[\frac{\text{grados cm}^2}{\text{dmol}} \right] \quad \text{Ecuación 1}$$

Posteriormente, los datos se analizaron con el programa CDPPro (Sreerama & Woody, 2000) para determinar el contenido de estructura secundaria. Éste contiene diferentes algoritmos y diferentes bases de datos de proteínas conocidas. Para realizar la deconvolución se aplicaron los algoritmos CONTIN/LL, SELCON3 y CDSSTR y se usaron bases de datos que contenían información de proteínas en solución, proteínas denaturadas y proteínas de membrana.

Preparación de liposomas

Se prepararon vesículas grandes unilaminares (*LUV's*) mediante el método de extrusión (Hope y col, 1985). Para la mezcla de lípidos se utilizó fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélinea y colesterol (Avanti Lipids) en una razón de 2:2:2:3 moles. Debido a la oxidación rápida que sufren los lípidos, todo el proceso se hizo bajo un ambiente de nitrógeno. Para marcar los liposomas se utilizó el fluoróforo 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) (Molecular Probes, Invitrogen) en una relación de 1: 300 = sonda: lípidos. DPH se solubilizó en cloroformo y se agregó la cantidad necesaria a la mezcla de lípidos. DPH se localiza en la zona correspondiente a las cadenas hidrocarbonadas y sólo fluoresce cuando se encuentra en un ambiente apolar. Dado que los lípidos se mezclaron en una solución de cloroformo, ésta se evaporó bajo un ambiente de nitrógeno. Para asegurarse de que la evaporación fuera completa, se dejó la mezcla al vacío durante 15 minutos. Posteriormente se hidrataron los lípidos con tampón HNE (5 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1 M EDTA, pH 7,4) y se dejaron reposar durante 30 min. Para formar vesículas multilaminares se agitaron durante un minuto. Luego se congelaron/descongelaron cinco veces. Finalmente, para formar las vesículas unilaminares de tamaño homogéneo, se pasaron a través de una membrana de nitrocelulosa de 100 nm utilizando un "extruder" (Avanti Lipids). El proceso de extrusión se realizó a 55°C, temperatura superior a la temperatura de cambio de fase de la mezcla de lípidos (Mountcastle y col, 1979).

Biotinilización de péptidos

Para detectar los péptidos, estos se marcaron con biotina (Sulfo-NHS-Biotin, Pierce). Se utilizó una relación molar péptido/biotina de 25 veces. La reacción de

marcaje transcurrió durante dos horas en hielo en amortiguador fosfato 10 mM pH 7,0 para GcSt H1 y GcSt y en fosfato disodio dibásico (Na_2HPO_4) 10 mM pH 8,8 para GcSt H2 por razones de solubilidad del péptido. El exceso de biotina libre se eliminó mediante diálisis contra el mismo amortiguador usado en el marcaje, para lo cual se utilizó una membrana de diálisis con corte de 1.000 Da (Spectra/Por 6 Membrane). Para GcSt H2 se dializó contra amortiguador borato 10 mM pH 9,0. Como control negativo, se utilizó un péptido correspondiente al extremo N-terminal de la nucleoproteína de ANDV, N1: 19-QLVTARQKLKDAEKAVEVDPDDVNKSTLQRRRAAVSTLETCLG-59, el cual se marcó con biotina al igual que los péptidos análogos de la región troncal de ANDV Gc en amortiguador fosfato salino (PBS) (Winkler).

Coflotación de péptidos con liposomas

Para determinar si los péptidos que representan la probable región troncal de ANDV Gc interactúan con membranas modelos se realizaron experimentos de coflotación de éstos con liposomas. Para esto, se mezcló 1 mM de liposomas con 0,1 mM de péptido. Se incubaron durante 30 min a 37°C. La muestra se mezcló posteriormente con sacarosa de forma que resultara una concentración final de sacarosa de 40% p/v en un volumen final de 380 µl. Sobre la muestra se colocó una capa de sacarosa al 25% (3600 µl), y sobre ésta una capa de sacarosa al 5% (510 µl). Se centrifugó a 217.145 g (Rotor AH-650 swinging bucket, Sorwall Combi) durante 3:30 hrs a 4°C. Después de la ultracentrifugación, los componentes se localizan en una fase correspondiente a su densidad. Se espera que los liposomas al ser livianos floten hacia la parte superior, mientras que los péptidos se localicen en la parte inferior. Si los péptidos interactúan con liposomas se espera que estos cofluten a fracciones

superiores. Una vez finalizada la centrifugación se tomaron 23 fracciones de igual volumen desde la parte superior.

Medición del índice de refracción

Para determinar las densidades alcanzadas en el gradiente de sacarosa después de la ultracentrifugación, se centrifugó un gradiente sin muestra y se midió el índice de refracción de cada una de las fracciones obtenidas usando un refractómetro. La densidad se obtuvo usando valores tabulados para sacarosa.

Fluorescencia de 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH)

Para determinar en que fracción se encontraron los liposomas se midió la fluorescencia del DPH para cada una de las fracciones. Se usó un fluorímetro Perkin-Elmer LS50. En la medición se utilizaron los siguientes parámetros: longitud de onda de excitación = 350 nm, abertura de excitación = 5 nm, abertura de emisión 5 nm, tiempo de integración = 2 s. Se registró la intensidad de fluorescencia a 427 nm, que corresponde al máximo de emisión de DPH.

Slot Blot

Para determinar en que fracciones se encontraban los péptidos, se realizó un *Slot Blot*. Cada una de las fracciones se cargó completamente en una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μm (BioRad) usando una máquina de *Slot Blot (Hybri-Slot Manifold*, Bethesda Research Laboratories). La membrana se bloqueó con leche al 5% en amortiguador PBS durante toda la noche a 4°C y con agitación. Luego se

incubó con NeutrAvidina acoplada a peroxidasa de rábano (Pierce) (1:1000 en leche al 5% en amortiguador PBS) por dos horas a temperatura ambiente con agitación. La NeutrAvidina se une específicamente a la biotina y de ésta manera se pueden detectar los péptidos biotinilados. Se realizaron tres lavados con tampón PBS de 10 min cada uno para eliminar la NeutrAvidina no unida y se reveló mediante quimiluminiscencia usando el sustrato *SuperSignal West Pico* (Pierce).

RESULTADOS

Identificación y análisis de la región troncal de ANDV Gc

Se identificó teóricamente la región troncal de ANDV Gc como la región que conecta el ectodominio con el segmento transmembrana. El ectodominio abarca desde E1 a P412 según el modelo molecular de Gc (Tischler y col, 2005). El segmento transmembrana se predijo usando TMHMM (ver figura S1) y abarca desde W457 a P479. De ésta forma, se definió la región troncal de Gc como la región de 44 residuos entre H413 y N456. De forma similar se identificó la región troncal de otros hantavirus, encontrándose que corresponde a una región altamente conservada dentro del género (identidad = 50% y similitud = 80%) (ver figura 3a). También se analizó la región troncal de otras proteínas de fusión clase II. En el caso de las proteínas E1 de alphavirus, ésta, posee 29 residuos y su conservación es menor (identidad = 10 %, similitud = 31 %) (ver figura 3b). Las proteínas E de los flavivirus poseen una región troncal con 53 residuos y su nivel de conservación es mayor que el de los alphavirus pero menor que el de los hantavirus (identidad = 38 %, similitud = 72 %) (ver figura 3c). Al analizar estos tres géneros virales se ejemplifica la divergencia existente en la región troncal, puesto que tanto el largo como la conservación de residuos varían.

Al analizar con mayor detalle el alineamiento de la probable región troncal de Gc del género *Hantavirus*, se observa que existen 3 glicinas y dos cisteínas conservadas (G418, G431, G450, C435 y C439), una región de cinco residuos conservados al medio al medio de la región (429-DDGAP-433) y al extremo C-terminal se encuentran tres residuos aromáticos conservados (W440, F441 y W447).

Al analizar la predicción de estructura secundaria para la probable región troncal de Gc se observa que se predicen dos hebras β cortas al extremo C-terminal y el resto

estaría desestructurado, lo mismo se predice para los otros hantavirus (ver figura S2). Esto difiere completamente con lo descrito en la literatura donde se ha visto que la región troncal de distintas familias virales es helicoidal. Es sabido que si bien las predicciones de estructura secundaria dan una visión rápida de lo que puede estar ocurriendo con dicha secuencia, sólo entregan un 70% de certeza (Rost & Sander, 1993).

Del análisis de secuencia es llamativo la conservación de dos prolinas y una glicina al medio de la probable región troncal (G432, P434 y P435). Estos residuos tienden a romper estructura secundaria debido a su alta movilidad o su restricción al enlace peptídico, respectivamente. Por lo que sería posible que antes de dicha secuencia exista un segmento estructurado y que después de ésta exista otro segmento estructurado, como lo que ocurre con la región troncal de la proteína E del virus Dengue. De esta forma se decidió realizar un estudio con mayor profundidad de la estructura de la región troncal de Gc.

Modelamiento molecular de la región troncal de ANDV Gc

En colaboración con el centro de Bioinformática de la Pontificia Universidad Católica (CBUC) se utilizaron diferentes estrategias para modelar la región troncal de ANDV Gc. Debido a que no existe una estructura cristalográfica para la región troncal de ninguna proteína de fusión de clase II, y debido a que la probable región troncal de ANDV Gc no posee una similitud superior al 30% con ninguna proteína del *Protein Data Bank* (PDB), se utilizó una reconstrucción de crío-microscopía electrónica de la proteína E del virus Dengue (Zhang y col, 2003) para modelar la región de ANDV Gc. A partir del mapa de carbonos α disponible se reconstruyó la estructura de la región troncal del virus Dengue. Ésta se encuentra formada por dos

hélices α interconectadas que interactúan con membrana denominadas DENV H1 (Q400-W421) y DENV H2 (V428-A447).

Al analizar la estructura reconstruida con *Verify3D* y *ANOLEA* hay regiones que tienen una baja probabilidad de estar correctamente plegadas (ver tabla S3), pero en el momento en que se realizó la crío-microscopía electrónica estaban estructuradas de esa manera. Es probable que las bajas probabilidades se deban a los algoritmos utilizados, ya que éstos fueron parametrizados con estructuras provenientes de proteínas globulares (Bowie y col, 1991; Melo y Feytmans, 1998), es decir, no con proteínas que se encuentran interactuando con membranas, como es el caso para la región troncal de la proteína de fusión del virus Dengue. Por otra parte, todos los ángulos de Ramachandran se encontraron en zonas permitidas según RAMPAGE (ver tabla S3). Al comparar la estructura después de la dinámica molecular, se observa que ésta se conserva, es decir, tanto H1 como H2 son estables en el tiempo de la simulación y se mantienen, validando así la reconstrucción realizada (dato no mostrado).

Esta estructura generada se utilizó como patrón para modelar la probable región troncal de ANDV Gc. Al alinear las secuencias de ANDV Gc con la de virus Dengue, se obtuvo un 24,5% de similitud (ver figura S3). Este es un porcentaje bajo para realizar modelamiento por comparación aunque todas las proteínas de fusión de clase II poseen una estructura muy conservada a pesar de poseer secuencias aminoacídicas diferentes (Kielien, 2006). Además, la conservación es similar a la utilizada para modelar el ectodominio de Gc de ANDV, el cuál fue de un 24,4% (Tischer y col, 2005).

Los 10 mejores modelos obtenidos mantenían las dos hélices: H1 y H2. H1 abarca de His413-Tyr429 y H2 de Thr437-Asn456 (dos de los mejores modelos se

muestran en la figura 4a y 4b. Ver tabla S1). H1 se une al ectodominio, mientras que H2 al segmento transmembrana. Ambas hélices se encuentran conectadas por una vuelta en la cual se encuentran dos prolínas (P434 y P435) y glicina G432. Esta vuelta está compuesta de siete residuos, seis de los cuales se encuentran conservados en todo el género *Hantavirus* (ver alineamiento figura 3). Al analizar los modelos con RAMPAGE se encontró que en promedio, el 98,8% de los residuos se encontraba en ángulos permitidos y sólo un 1,2% con ángulos no permitidos (ver tabla S3). Con *Verify3D* y *ANOLEA* se encontraron resultados similares a los obtenidos con la reconstrucción de la región troncal del virus Dengue, regiones con baja probabilidad de encontrarse formando ese tipo de estructura (ver tabla S3). Esto era esperable, puesto que si el patrón del cual se partió tenía este comportamiento, los modelos obtenidos a partir de éste, lo más probable es que también lo tengan. Al analizar las estructuras después de la dinámica molecular se observó que se mantienen tanto H1 como H2, es decir, ambas hélices fueron estables (ver figura 4). Más aún, al igual que para la estructura de la región troncal del virus Dengue, se observa que ambas hélices son capaces de moverse una respecto a la otra, indicando la alta flexibilidad de ésta región.

La segunda estrategia utilizada para analizar *in silico* la estructura de la probable región troncal de ANDV Gc consistió en realizar *Threading* usando diferentes servidores disponibles en la red. No se obtuvieron resultados significativos al analizar la región troncal completa de ANDV Gc porque todos los modelos obtenidos no poseían un *Z-score* superior al valor de corte (*cut-off*) del programa (datos no mostrados), puesto que no existe ninguna proteína con un grado alto de similitud significativa en *Protein Data Bank*. Al analizar independientemente las regiones definidas con anterioridad H1 (H413-Y429) y H2 (T437-N456) se

encontraron resultados con una mayor significancia con el servidor LOMETS (ver tabla S2). De los modelos obtenidos, 3 modelos para H1 poseen estructura helicoidal, mientras que dos para H2. Pero sólo un modelo de H1 y H2 son válidos según el *Z-score* del programa utilizado. El modelo para H2 era mayoritariamente helicoidal, mientras que el de H1 también era helicoidal, pero en menor grado que el de H2. Estos modelos fueron sometidos a dinámica molecular. Nuevamente, la estructura helicoidal se mantenía después de la simulación (ver figura 5).

En conjunto, los análisis *in silico* de la estructura de la probable región troncal de ANDV Gc indican que es posible que ésta se encuentre formada por dos hélices α : H1 y H2, diferente a lo que se obtiene usando algoritmos de predicción de estructura secundaria.

Dicroísmo circular

Para determinar experimentalmente la estructura secundaria de la probable región troncal de ANDV Gc y para validar el análisis realizado *in silico*, se sintetizaron tres péptidos: GcSt, que corresponde a la probable región troncal completa mientras que los péptidos GcSt H1 y GcSt H2 corresponden a las regiones definidas como H1 y H2 en el modelamiento por comparación. Se determinó el contenido de estructura secundaria de cada uno de los péptidos mediante dicroísmo circular. Para cada uno de ellos se realizó una titulación con TFE, un agente inductor de plegamiento. Los espectros obtenidos se muestran en la figura 6. Para todos los péptidos se observa que la intensidad de la señal se incrementa cuando se usan concentraciones crecientes del cosolvente TFE. Este compuesto limita la accesibilidad de las moléculas de agua a la superficie del péptido, favoreciendo la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares por sobre las interacciones

intermoleculares con moléculas de agua, promoviendo así la formación de estructura secundaria (Roccatano y col, 2002). Por lo que el incremento de la señal observado corresponde probablemente a un aumento en el contenido de estructura secundaria.

Para GcSt H2 se observa un espectro característico de hélice α (figura 6b), con mínimos en 208 nm y 222 nm. Para los otros dos péptidos se observa un mínimo cercano a 208 nm. Se observa un segundo máximo cercano a 222 nm con GcSt cuando la concentración de TFE fue de 70% (ver figura 6c), indicando que el contenido de estructura helicoidal se ha incrementado.

Los espectros fueron deconvolucionados para estimar el contenido de estructura secundaria. Los resultados de la deconvolución muestran que los tres péptidos analizados poseen un alto contenido de hélice α (figura 7 y tabla S4) y que éste se incrementa a la par cuando se aumenta la concentración TFE. En solución acuosa, el contenido helicoidal es alto (entre 60% y 69%) lo cual indica la alta tendencia de los péptidos a estructurarse formando hélices α y que no es un artefacto debido al uso del TFE. En presencia de 70% de TFE el contenido helicoidal aumenta de entre 72% y 91% en GcSt H1 y GcSt H2, respectivamente.

Usando DC, se ha demostrado experimentalmente que péptidos que abarcan diferentes regiones de la probable región troncal de Gc poseen un alto contenido helicoidal. Además, se concluye de estos resultados que la región correspondiente a H2 posee más estructura helicoidal que la región correspondiente a H1. Del espectro de dicroísmo circular obtenido para GcSt no se puede afirmar que está formado por dos hélices α , pero debido a que dentro de la secuencia que conecta las regiones H1 y H2 se encuentran dos prolínas (P434 y P435) y una glicina

(G432) es muy probable que cualquier estructura secundaria se rompería en esta posición, más aún, estos residuos se encuentran altamente conservados en el género *Hantavirus* (ver figura 3). Esta información junto con la información de que los péptidos GcSt H1 y GcSt H2 poseen independientemente un alto contenido helicoidal refuerza la idea de que la probable región troncal de ANDV está conformada por dos hélices α independientes.

En resumen, se ha encontrado que la probable región troncal de ANDV Gc posee una estructura con alto contenido helicoidal al igual que lo descrito para regiones troncales de otras familias virales (tanto de clase I, II y III), con lo cual se ha comprobado la primera parte de la hipótesis planteada. Además validan la aproximación usada de modelamiento molecular para determinar la estructura.

Análisis fisicoquímico de la región troncal de ANDV Gc

Para determinar si la distribución de los residuos dentro de las regiones H1 y H2 poseen un patrón fisicoquímico particular, éstas se representaron en forma de rueda. Para GcSt H2 se encontró que una cara es mucho más apolar que la otra (ver figura 8b), por lo que podría tratarse de una hélice anfipática. Más aún, posee dos lisinas en la interfase polar- apolar de la hélice, lo cual es sustentado por la teoría del "snorkel" de hélices anfipáticas (Mishra y col, 1994), la cual afirma que la cadena lateral de la lisina es capaz de interactuar tanto con las colas hidrocarbonadas apolares como con las cabezas polares de los fosfolípidos. De esta forma, hélices anfipáticas que poseen lisinas en esta posición (clase A) tienen una mayor afinidad a los fosfolípidos (Segrest y col, 1990). Además, las proyecciones indican que GcSt H2 posee dos triptófanos orientados hacia la misma

dirección (ver figura 8b), que tienden a localizarse en la interfase de membrana (interfase entre las colas apolares y las cabezas polares de los fosfolípidos) debido a su planaridad (Kelkar y col, 2006).

Por otro lado, para GcSt H1 no se observa esta distribución diferencial de residuos (ver figura 8a). El mismo análisis se realizó con la proteína E del virus Dengue a modo de comparación, encontrándose que la región correspondiente a H2 también posee una cara mucho más apolar que la otra; pero a diferencia de H2 de ANDV, ésta no posee lisinas en la interfase polar-apolar de la hélice (ver figura 8d). Para la región H1, a diferencia de lo que ocurre en Gc H1, también se observa una cara más apolar que la otra, aunque es de menor tamaño que la de H2 del virus Dengue (ver figura 8c).

Para analizar la tendencia de la región troncal de localizarse en la interfase membrana/agua se utilizó la escala de hidrofobicidad interfacial de Wimley & White (1996). Con esta es posible calcular la energía libre de transferencia de un segmento aminoacídico de transferirse de agua a interfase de agua/membrana. Valores con energía libre negativa representan que dicho segmento tiende a localizarse en interfase. Esta escala difiere de las escalas clásicas de hidrofobicidad las cuales consideran la transferencia desde agua a octanol. La escala de octanol sirve para predecir segmentos transmembranas, es decir, regiones que atraviesan la bicapa y que se localizan en un medio completamente apolar. Se observa que la región correspondiente a H2 tanto de ANDV Gc como de la proteína E del virus Dengue se localizarían en interfase (ver figuras 9a y 9c), dado que tienen valores de energía libre negativos. No se predice lo mismo para las regiones correspondientes a H1 de Gc ni de E. Esta tendencia también es favorable para el segmento transmembrana. Ahora bien, si se compara la energía usando la escala

de transferencia a octanol (ver figuras 8b y 8d), no se observan valores negativos para la región troncal de Gc ni de E, sólo para los segmentos transmembrana.

Resumiendo, se predice que GcSt H2 podría corresponder a hélice anfipática que se localiza en interfase de membrana/agua. No es posible afirmar lo mismo para GcSt H1.

Interacción de la región troncal de ANDV Gc con membranas modelos

Para determinar si la región troncal de ANDV Gc interactúa con membranas, se realizó un ensayo de coflotación de péptidos análogos de la esta región con liposomas en un gradiente de sacarosa. Para medir la densidad de las fracciones, se cargó un gradiente sin muestra; como se esperaba, las fracciones superiores tienen una densidad menor, mientras que las más densas corresponden a las inferiores (ver tabla S5). En los ensayos, todas las fracciones fueron analizadas para determinar la presencia de los liposomas (mediante fluorescencia de DPH) y la presencia de los péptidos (mediante acoplamiento a biotina). En todos los casos la fluorescencia del DPH se encontró mayoritariamente en las fracciones superiores, lo cual indica que efectivamente los liposomas flotaron a fracciones de menor densidad (ver tabla S6).

Para los tres péptidos correspondientes a la región troncal de ANDV Gc: GcSt H1, GcSt H2 y GcSt en ausencia de liposomas, estos se localizaron en las fracciones inferiores de mayor densidad (ver figura 10 a-c respectivamente). Al incubar los péptidos con liposomas, en los tres casos, los péptidos coflotaron a fracciones de menor densidad, indicando que los péptidos análogos de la probable región troncal de ANDV Gc son capaces de interactuar con membranas modelos (ver figura 10 e-g). En los tres casos, no todo el péptido se localizó en las fracciones de menor densidad, sino gran parte se localizó también en las fracciones más densas. Esto

indica que la interacción de los péptidos con los liposomas no era completa bajo las condiciones experimentales utilizadas, lo cual puede deberse a una saturación de liposomas, o bien, a la existencia de un equilibrio entre péptido unido a liposomas y péptido libre.

Estos resultados son válidos puesto que el control negativo utilizado (N1), un péptido de 40 residuos del extremo N-terminal de la nucleoproteína de ANDV, no coflota a fracciones superiores al ser incubado con liposomas, sino que permanece en fracciones inferiores (ver figura 10 g-h). Por lo tanto, la coflotación observada corresponde al comportamiento particular de los péptidos análogos de la probable región troncal de ANDV Gc.

En resumen, la probable región troncal de ANDV Gc es capaz de interactuar con membranas modelos, afirmando de esta forma la hipótesis planteada bajo las condiciones experimentales.

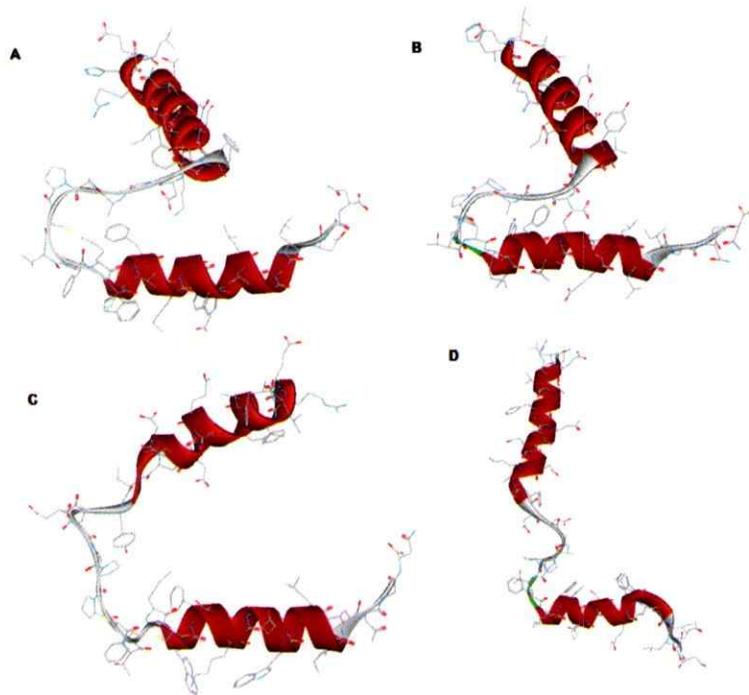


Figura 4. Modelos tridimensionales de la probable región troncal de ANDV Gc obtenidos mediante modelamiento por comparación con la región troncal de DENV E. (A) y (B) corresponden a dos de los mejores modelos obtenidos. (C) y (D) corresponden a los modelos A y B respectivamente después de una simulación por dinámica molecular. Nótese que mantienen la estructura helicoidal y que las hélices son capaces de moverse una respecto a la otra.

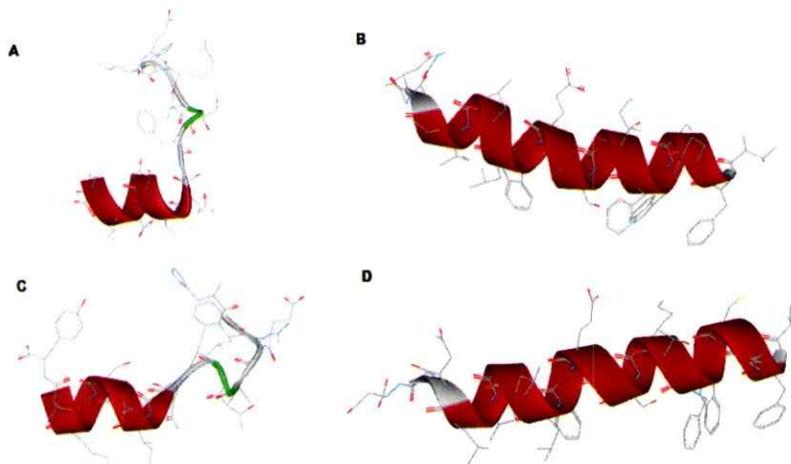


Figura 5. Modelos tridimensionales de las regiones H1 y H2 de la probable región troncal de ANDV Gc obtenidos por *Threading*. (A) Modelo de H1. (B) Modelo de H2. (C) y (D) corresponden respectivamente a A y B después de la dinámica molecular. Nótese que se mantiene la estructura helicoidal y que H2 es más helicoidal que H1. Modelos se obtuvieron usando el servidor LOMETS

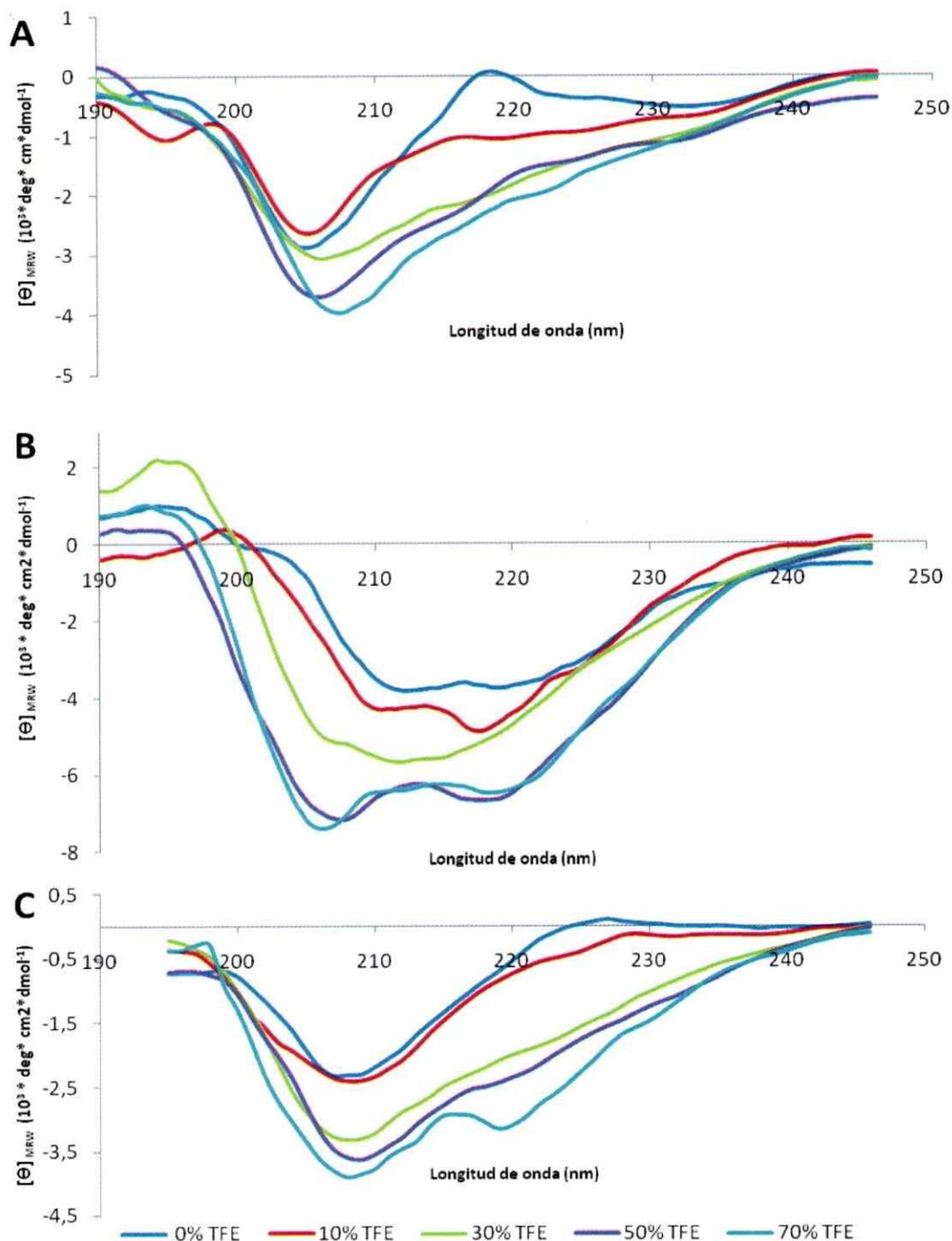


Figura 6. Espectros de dicroísmo circular de péptidos análogos a la probable región troncal de ANDV Gc. (A) GcSt H1. (B) GcSt H2. (C) GcSt. Se representa la elipticidad residuo promedio versus la longitud de onda. Se realizó una titulación con agente inductor de plegamiento TFE para cada uno de los péptidos. Nótese cómo se incrementa la señal con concentraciones crecientes de TFE. En el caso de GcSt sólo se pudo medir hasta 195 nm.

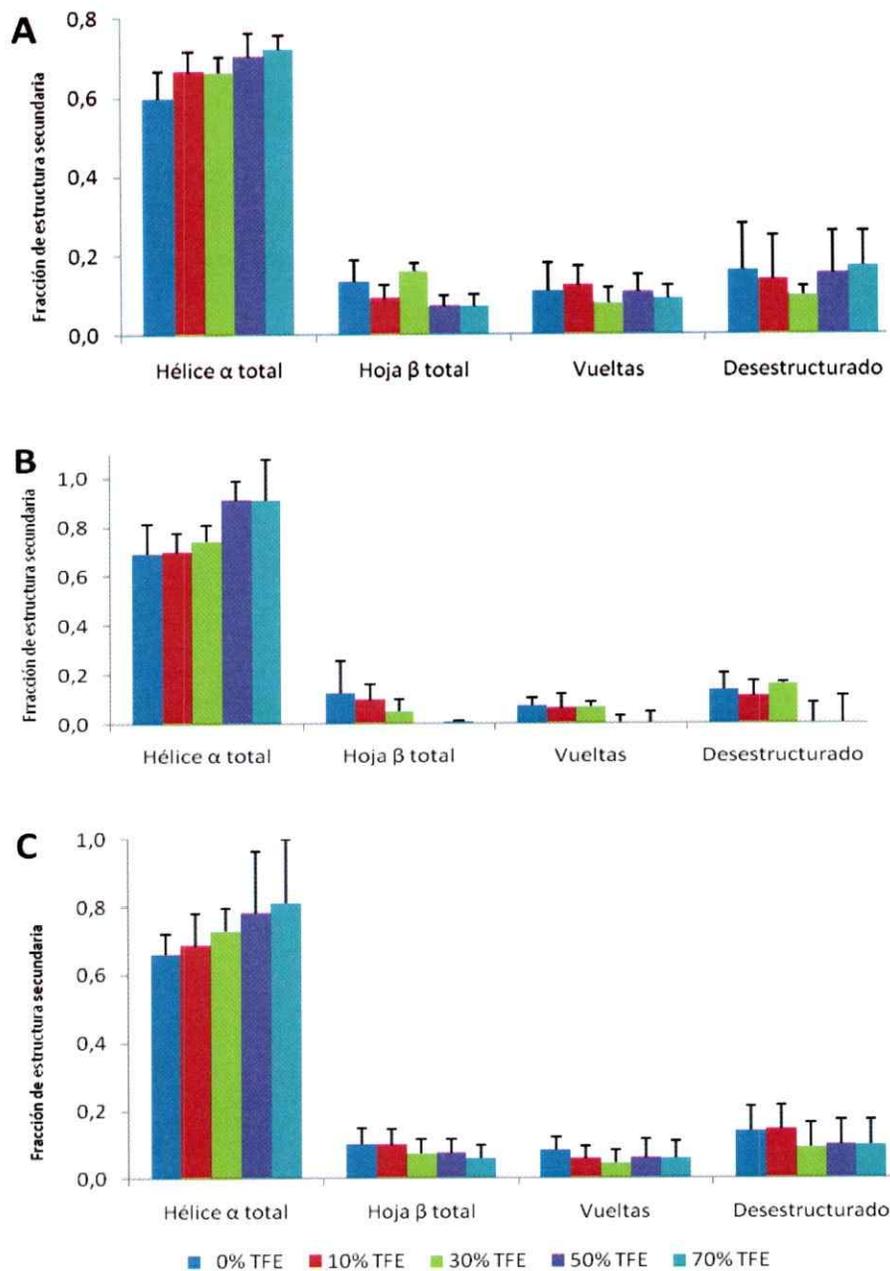


Figura 7. Contenido de estructura secundaria de péptidos análogos a la probable región troncal de ANDV Gc. (A) GcSt H1. (B) GcSt H2. (C) GcSt. Cada espectro de DC se deconvolucionó usando los algoritmos CONTIN/LL, CDSSTR y SELCON3 con diferentes bases de datos. Nótese el incremento del contenido helicoidal cuando la concentración de TFE se incrementa.

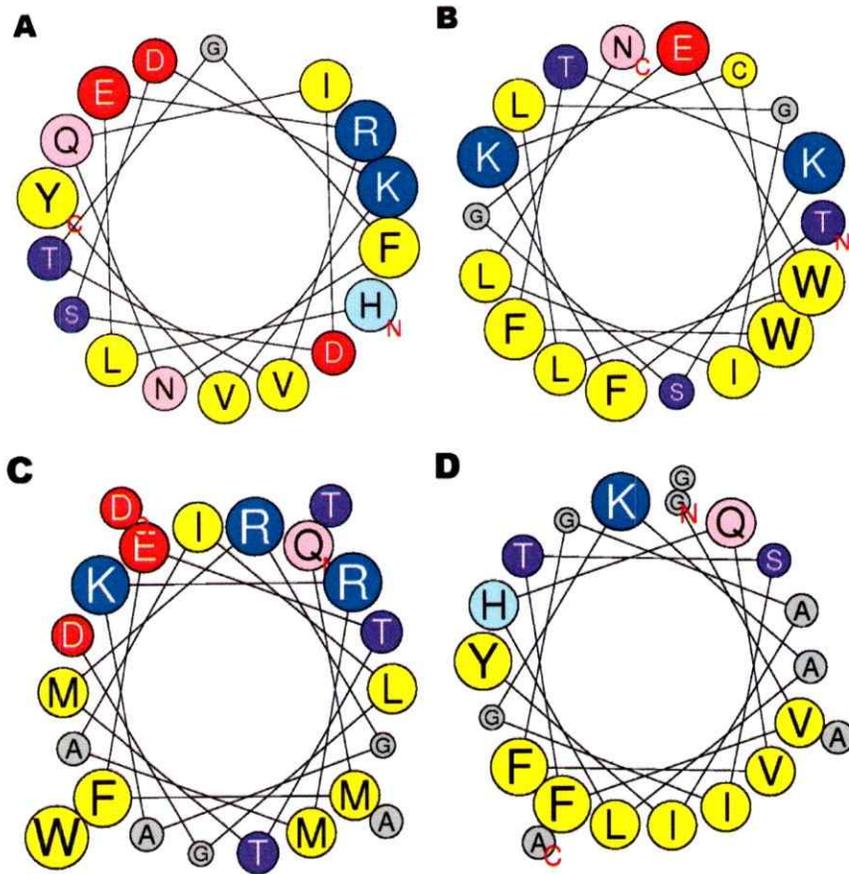


Figura 8. Representación en rueda de las hélices de la probable región troncal. (A) GcSt H1. (B) GcSt H2. (C) Dengue H1. (D) Dengue H2. Residuos se muestran en su representación de una letra con un tamaño proporcional a su volumen. Residuos amarillos = apolares. Residuos azules = cargados positivamente. Residuos rojos = cargados negativamente. Residuos púrpuras = polares sin carga. Alaninas y glicinas se representan de color gris.

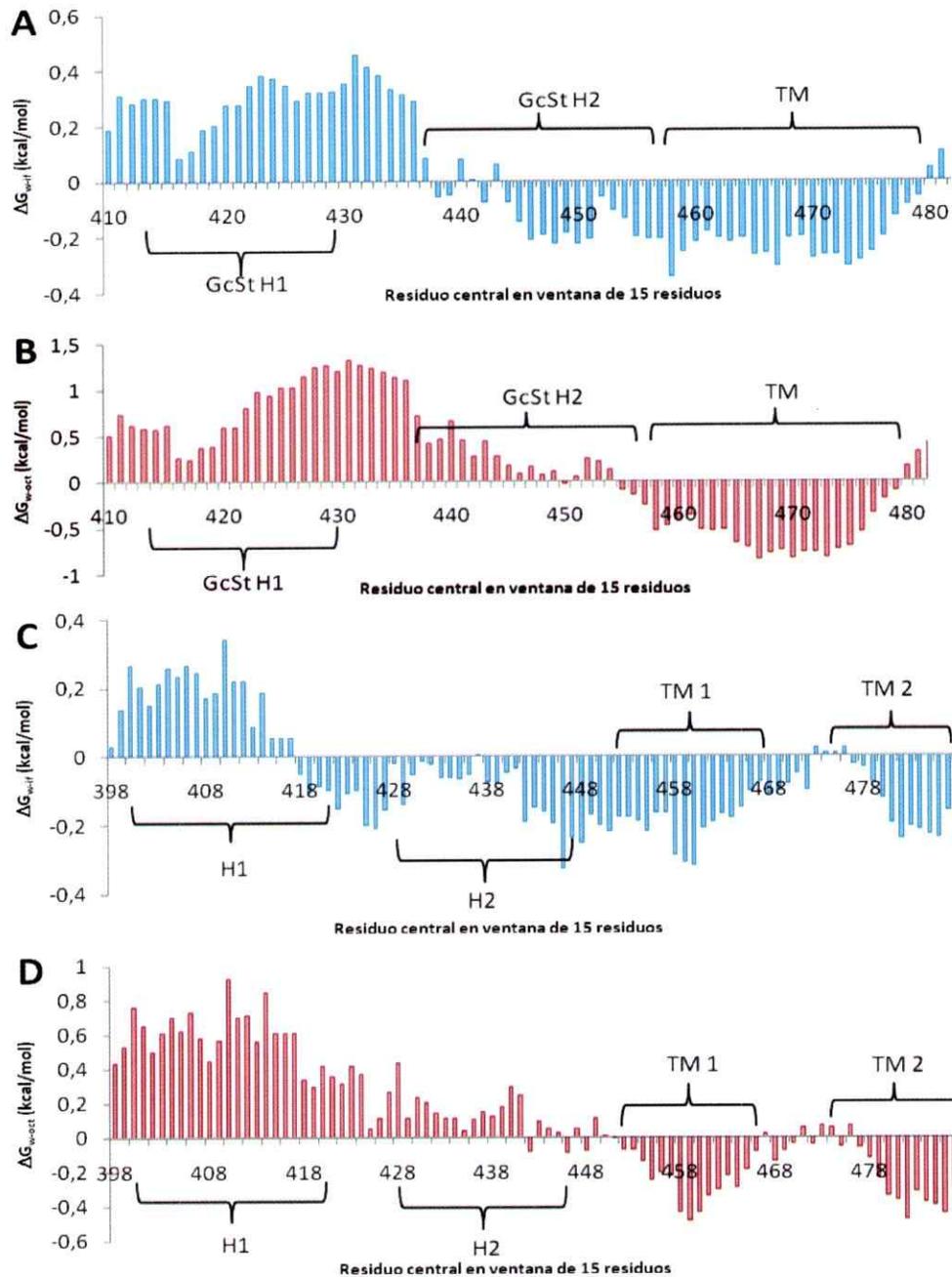


Figura 9. Hidrofobicidad de regiones troncales y transmembranas predichas y conocidas de ANDV Gc y DENV E. (A), (C) Hidrofobicidad interfacial W&W. (B), (D) Hidrofobicidad clásica. A y B corresponde a ANDV Gc, mientras de C y D a DENV E. TM = segmento transmembrana. La proteína E posee dos segmentos transmembrana, mientras que Gc sólo uno.

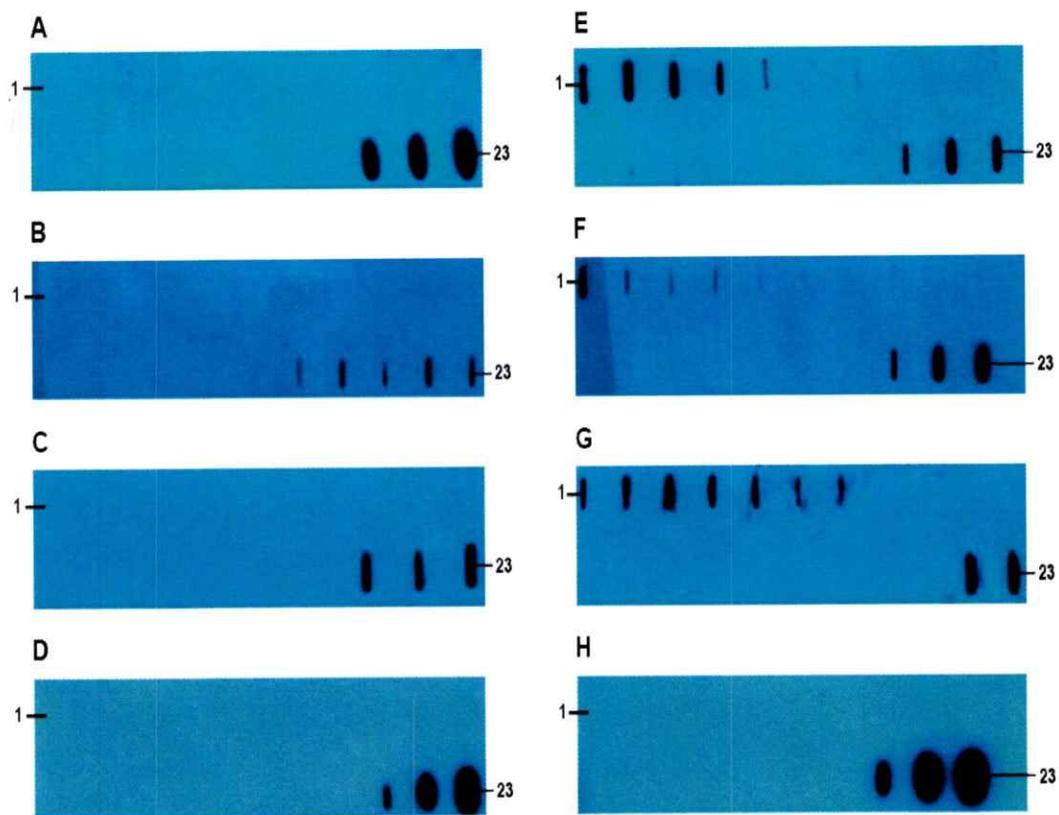


Figura 10. Coflotación de péptidos con liposomas. (A) GcSt H1 solo. (B) GcSt H2 solo. (C) GcSt solo. (D) N1 solo. (E) GcSt H1 más liposomas. (F) GcSt H2 más liposomas. (G) GcSt más liposomas. (H) N1 más liposomas. Se incubaron péptidos con o sin liposomas y se realizó un gradiente de sacarosa. Después de la ultracentrifugación los componentes se localizan de acuerdo a su densidad. Liposomas flotan a fracciones superiores, mientras que los péptidos se localizan en las fracciones inferiores. Si ocurre interacción el péptido coflota a fracciones superiores. En la membrana se cargaron las fracciones completas desde la primera fracción (fracción 1: menos densa, esquina superior izquierda) hasta la última fracción (fracción 23: más densa, esquina inferior derecha). El tiempo de exposición del revelado varía entre los diferentes experimentos, por lo que las comparaciones deben hacerse sólo entre el mismo péptido y no entre péptidos.

DISCUSION

La comprensión del mecanismo de entrada de virus patogénicos a la célula hospedera es de crucial importancia para el desarrollo de drogas antivirales que permitan el tratamiento de la enfermedad. En la bicapa lipídica de virus envueltos se encuentran las glicoproteínas virales, las cuales tienen dos funciones: unión al receptor, mediante las cuales el virus se une a las células blanco y, en segundo lugar, la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula hospedera. De ésta forma, el estudio de la estructura y función de la glicoproteínas virales entrega información para el desarrollo de inhibidores de fusión.

Muchos virus de la familia *Bunyaviridae* causan infecciones zoonóticas emergentes en humanos. *Hantavirus* corresponde al género con mayor número de miembros dentro de esta familia. Más de 150.000 casos de infecciones por hantavirus son reportadas anualmente, con una mortalidad que llega hasta el 40%.

En este trabajo se ha caracterizado la probable región troncal de la proteína de fusión Gc del virus Andes, hantavirus patogénico endémico en Chile y Argentina; describiéndose su estructura e interacción con membranas. Hasta la fecha, corresponde al único trabajo sobre la región troncal de proteínas de fusión de la familia *Bunyaviridae*.

En Gc se identificó teóricamente la región troncal como la región de 44 residuos que conecta el ectodominio con el segmento transmembrana. Ésta se encuentra altamente conservada en todo el género *Hantavirus* (80% similitud). El largo de la región difiere al compararlo con el de otras proteínas de fusión clase II, siendo intermedio entre alphavirus (~30 residuos) y flavivirus (~50 residuos), pero su grado de conservación es mayor que en los otros géneros analizados. Esta observación

podría indicar que esta región posee una función importante dentro del proceso de fusión de hantavirus mediado por Gc.

Se realizó un estudio *in silico* de la estructura de la probable región troncal de ANDV Gc. Inicialmente se predijo que estaba formada por dos hojas β cortas al extremo C-terminal y el resto era desestructurado, lo cual era completamente diferente a lo descrito para otras familias virales, donde se ha descrito que la región troncal posee un alto contenido helicoidal. Esta discrepancia motivó a realizar un estudio estructural más exhaustivo utilizando modelamiento molecular. Los resultados obtenidos con el modelamiento, si bien no son completamente concluyentes, muestran que es posible que la probable región troncal de ANDV Gc se encuentre formada por dos hélices α , como en el caso de DENV E. Los modelos obtenidos por comparación indicaron una baja probabilidad de estar correctamente plegados. Lo mismo ocurrió con el patrón usado para construir los modelos (reconstrucción de la región troncal de DENV E tomado de una crío-microscopía electrónica), por lo que tampoco se pudo derivar conclusiones definitivas de éste. De ésta forma se decidió a aplicar una corta dinámica molecular para validar los modelos. Si bien, la dinámica molecular fue de 100 ps, sirvió para observar que la estructura principal se mantenía estable en ese tiempo de simulación, es decir, en el caso de los modelos realizados por comparación, las dos hélices se mantenían. La segunda aproximación consistió en realizar *Threading*. Sólo al analizar independientemente las regiones definidas como H1 y H2 se encontraron resultados válidos. El modelo confiable de H2 consistió en una estructura completamente helicoidal, mientras que el modelo válido de H1 también era helicoidal, pero en menor grado que el modelo de H2. Para analizar estos modelos, se sometieron a la misma dinámica molecular y se observó que la estructura se mantenía, es decir, la hélice α no se desestructuraba en el tiempo de la simulación.

No se encontraron modelos válidos que poseyeran la estructura que predicen los algoritmos de predicción de estructura secundaria (NPS@).

En base a este análisis *in silico* de la estructura de la probable región troncal de ANDV Gc se sintetizaron péptidos sintéticos y se determinó experimentalmente el contenido de estructura secundaria.

Los resultados obtenidos por difracción circular muestran que la región troncal de ANDV Gc posee un alto contenido helicoidal tanto en solución como con el agente inductor de plegamiento TFE. Difracción circular es una herramienta ampliamente utilizada para determinar la estructura de péptidos sintéticos y mediante este análisis se puede extrapolar a la estructura que poseería dicha región dentro de la proteína. Por otra parte, TFE ha sido ampliamente usado como cosolvente para determinar la estructura de péptidos pequeños en solución (Blanco y col, 1994; Muñoz y col, 1995; Jimenez y col, 1999), por lo que los resultados obtenidos son extrapolables a la estructura que poseería la región troncal de ANDV Gc dentro de la proteína.

En resumen, usando diferentes aproximaciones se ha demostrado que la probable región troncal de ANDV Gc está compuesta por dos hélices α (H1 y H2) conectadas por una vuelta muy conservada. Estos resultados concuerdan con la estructura descrita para otras proteínas virales de fusión, como la proteína E del virus Dengue (Zhang y col. 2003) y de TBEV (Allison y col. 1999), la proteína gp41 del VIH (Schilibi y col. 2001) y la proteína G de VSV (Robinson y Whitt, 2000).

Así, una característica común de regiones troncales de proteínas de fusión, tanto de clase I, II y III es su alto contenido de estructura helicoidal. La implicancia funcional de esto aun no se conoce, pero se postula que la estructura helicoidal permitiría la flexibilidad necesaria que debe poseer esta región para permitir el gran reordenamiento que sufre el ectodominio al activarse. En el caso de proteínas de

fusión clase II, el dominio III con la región troncal se mueve hasta 40 Å (ver figura 2). En el estado pre-fusión, la región troncal se encontraría "acostada" sobre la membrana viral, interactuando con ésta; mientras que en el estado post-fusión, la región troncal se saldría de la membrana y se extendería a lo largo del ectodominio, permitiendo que el desplazamiento del dominio III ocurra. La flexibilidad de la región troncal es ejemplificada en la dinámica molecular realizada a los modelos hechos por comparación (ver figura 4), en los cuales se observa que las dos hélices son capaces de moverse entre sí, ya que la vuelta que los conecta les permite esta flexibilidad.

Por otra parte, usando ensayos de coflotación de péptidos con liposomas se encontró que tanto péptidos análogos a la probable región troncal completa (GcSt) como péptidos análogos a la región H1 (GcSt H1) y H2 (GcSt H2) interactúan con membranas modelos. Pero no así el péptido utilizado como control negativo (N1).

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis confirman la hipótesis planteada, ya que se demostró experimentalmente que la probable región troncal de ANDV Gc posee un alto contenido helicoidal y además es capaz de interactuar con membranas modelos.

Esta tesis ejemplifica que el trabajo con péptidos análogos es una aproximación válida y útil para caracterizar una región dentro de una proteína, puesto que permite determinar características biofísicas (como estructura e interacción con membranas) de una forma mucho más sencilla que si se trabajara con la proteína completa, ya que en este caso, sólo técnicas de mayor complejidad (como cristalografía de rayos X o crío-microscopía electrónica) permitirían determinar la estructura de una región dentro de la proteína.

La región definida como H2 de Gc corresponde a una hélice anfipática con tendencia a localizarse en la interfase de agua/membrana capaz de interactuar con membranas modelos en ensayos *in vitro*. Esto concuerda con la región H2 de la proteína E de DENV, la cual también consiste en una hélice anfipática y se localiza en interfase de membrana (Zhang y col, 2003), encontrándose “acostada” en ésta. Por otra parte, H1 de ANDV Gc no es una hélice anfipática y no tiende a localizarse en interfase de membranas, pero sí es capaz de interactuar con membranas modelos en ensayos *in vitro*. El mismo patrón se encuentra para la región H1 de DENV E, donde esta hélice se inclina insertando una parte en la membrana viral (Zhang y col. 2003).

Existen características comunes entre H2 del virus Dengue y Andes con el segmento pre-transmembrana (o troncal) de la proteína gp41 del virus VIH que corresponde a una proteína de fusión clase I ampliamente estudiada. El segmento pre-transmembrana de gp41 forma una hélice de 19 residuos de largo, 5 de los cuales son triptófanos. Por su parte, H2 de ANDV Gc tiene 20 residuos de largo y posee 2 triptófanos y dos fenilalaninas. El segmento pre-transmembrana de gp41 ha sido propuesto como una región altamente flexible que mantiene alejado el ectodominio de la membrana viral, evitando de esta forma, fusión con la misma membrana. Además, esta región es accesible a anticuerpos monoclonales neutralizantes contra el virus (Zwick y col. 2001). Estudios biofísicos han demostrado que se localiza en la interfase de membranas y puede perturbar la arquitectura de la bicapa (Suárez y col, 2000). Más aún, péptidos análogos a esta región son capaces de inhibir la fusión de membranas mediada por gp41 (Saéz-Cirión y col. 2003). Estudios son necesarios para determinar si la región troncal de Gc posee características similares.

Otra pregunta que surge de este análisis es el rol de la región correspondiente a H1, puesto que si virus como VIH sólo poseen una región similar a H2 y no poseen una región similar a H1, ¿cuál es la importancia funcional de la región H1 descrita para flavivirus y ahora para los hantavirus? Mayores estudios para determinar esto son necesarios.

Las membranas biológicas son muy dinámicas debido a un continuo remodelamiento al interior de la célula. Procesos tales como la formación de vesículas intracelulares y la fusión de éstas con su blanco requieren que existan mecanismos moleculares que permitan la perturbación de membranas, como también la subsecuente fusión de ellas. Este remodelamiento de membranas se logra por una comunicación entre los lípidos y proteínas. Tanto virus como células eucariontes han desarrollado mecanismos para la perturbación, fisión y fusión de membranas. La fusión de vesículas intracelulares mediada por el complejo de las proteínas SNARE es muy similar al proceso de fusión mediado por proteínas de fusión virales (clase I, II y III): acercamiento inicial de las membranas, cambios conformacionales de las proteínas participantes, hemifusión de las membranas, terminando con la fusión de ambos compartimentos.

Si se considera la formación de una vesícula a partir de una bicapa prácticamente plana, deben existir estructuras que funcionen coordinadamente para curvar la membrana, permitiendo la fisión de ésta. Este rol es llevado a cabo por proteínas de cobertura como clatrina, COPI y COPII, en conjunto con proteínas accesorias como epsinas. Epsinas poseen un dominio conservado en organismos tan diversos como levaduras, plantas y humanos, denominado dominio epsina homólogo N-terminal (ENTH) (revisado en Legendre-Guillemain, 2004). ENTH está compuesto por 8 hélices α ; cuando entra en contacto con membranas, se une a ésta y una nueva

hélice aparece ($\alpha 0$) (Ford y col, 2002). La unión a membrana y la aparición de $\alpha 0$ se realiza en forma coordinada. $\alpha 0$ es una hélice anfipática de 12 residuos, la cual es capaz de inducir la formación de curvatura de membrana en ensayos con membranas modelos (Ford y col, 2002). De esta forma favorece la deformación de la membrana, reduciendo la energía necesaria para formar una vesícula.

Un mecanismo molecular similar podrían usar las proteínas de fusión virales, es decir, serían capaces de inducir curvatura de membrana, disminuyendo de esta forma el costo energético de fusionar dos bicapas lipídicas. Es sabido que el péptido de fusión al insertarse en la membrana blanco la perturba, disminuyendo de esta forma el costo energético de la fusión. Basado en esta información surge la pregunta si, ¿la membrana viral no sufre ninguna perturbación? Postulamos que la región troncal podría inducir curvatura de membrana en ésta, mediante un mecanismo similar al que lo hacen las proteínas epsinas en la formación de una vesícula, es decir, mediante la inserción de una hélice anfipática en la membrana. Este sería un mecanismo común para las regiones troncales y explicaría el alto contenido helicoidal, su carácter anfipático y su tendencia a localizarse en interfase de membrana descrito en diferentes familias virales.

Más aún, cuando el virus madura debe salir de la célula hospedera, por lo que debe perturbar la mayoritariamente plana membrana celular para lograr que se libere la partícula viral. De ésta forma, la región troncal podría además ayudar a la fisión de las membranas durante el *budding* del virus, lo cual concuerda con lo descrito por Salzwedel y col (1999), donde mutantes de la región troncal del virus VIH poseen un ensamblaje deficiente de partículas virales.

¿Cuál es el rol que juega la región troncal en el proceso de fusión de membranas? Es la pregunta que hay que responder ahora. Sabemos que interactúa con membranas, pero ¿es esta interacción necesaria para que ocurra la fusión? ¿O es

sólo una región flexible que funciona como *linker* entre el ectodominio y el segmento transmembrana? Si la región troncal es una región funcional dentro de la proteína de fusión Gc, debe ayudar al proceso de fusión de membranas. Mayores estudios son necesarios para demostrar esto.

CONCLUSIONES

- Se logró identificar teóricamente la región troncal de ANDV Gc, encontrándose que posee 44 residuos, 6 de los cuales son residuos aromáticos y se encuentra altamente conservada dentro del género *Hantavirus*.
- Usando diferentes aproximaciones se demostró que la región troncal de ANDV Gc está compuesta por dos hélices α (H1 y H2) interconectadas por una vuelta flexible. Esto concuerda con lo descrito para regiones troncales de otros géneros virales.
- Se demostró que la región troncal de ANDV Gc es capaz de interactuar con membranas modelos, tanto la región completa como las regiones correspondientes a H1 y H2. Esto concuerda con lo descrito para la proteína E del virus Dengue. Además se predijo que la región H2 corresponde a una hélice anfipática que se localiza en la interfase de membrana.
- Se ha comprobado la hipótesis planteada, es decir, la región troncal de ANDV Gc posee un alto contenido helicoidal y es capaz de interactuar con membranas.

PROYECCIONES

- Se ha demostrado que la región troncal de ANDV Gc interactúa con membranas. Ahora se analizará si ésta interacción posee un efecto en la membrana, ya que si la región troncal corresponde a una región funcional dentro de la proteína de fusión, debe ocasionar estrés elástico en la membrana. Como continuación de este trabajo se planea estudiar si los péptidos análogos a la probable región troncal de ANDV Gc son capaces de cambiar la forma de liposomas y si son capaces de cambiar la viscosidad interna de éstos.
- El estudio estructural realizado en esta tesis sólo contempla la caracterización de la estructura secundaria de la región troncal de ANDV Gc. El obtener la estructura tridimensional de ésta región es el siguiente paso, lo cual puede ser realizado aplicando resonancia magnética nuclear a los péptidos análogos descritos aquí.
- Dada las características fisicoquímicas particulares que posee esta región (alto contenido helicoidal, rico en residuos aromáticos y alta hidrofobicidad interfacial) se planea analizar si estas características son o no necesarias para el proceso de fusión de membranas, o si sólo se requiere que la región troncal posea un largo determinado. Para esto, diferentes mutantes de la región troncal de ANDV Gc se diseñarán y se analizará la capacidad de éstas para fusionar membranas.

- Como se mencionó anteriormente péptidos análogos de la región pre-transmembrana de la proteína gp41 de VIH y de flavivirus son capaces de inhibir la fusión de membranas. Se determinará si los péptidos análogos de la probable región de troncal de ANDV Gc son capaces de inhibir la fusión de membranas mediada por Gc.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

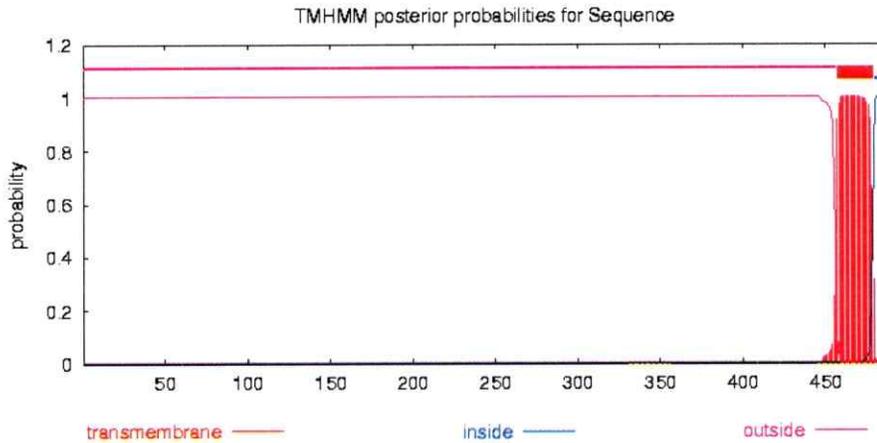


Figura S1. Identificación teórica del segmento transmembrana de ANDV Gc utilizando TMHMM. En rojo se muestra la única secuencia predicha como transmembrana, la cual abarca desde V457 a P479. Según este análisis Gc poseería una cola C-terminal de 8 residuos: R480 a V487.

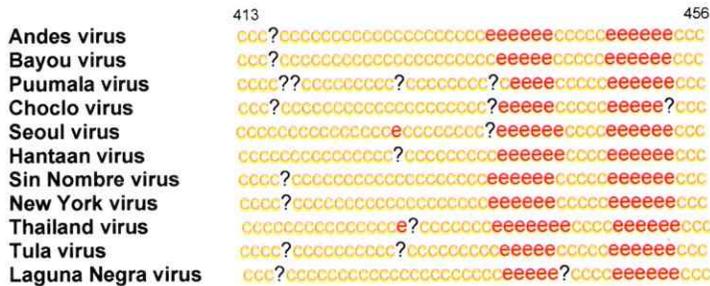


Figura S2. Predicciones de estructura secundaria de regiones troncales de Gc de distintos hantavirus. Se muestran las predicciones consenso utilizando 8 diferentes algoritmos para cada secuencia viral. h = hélice α . e = hebra β . c = desestructurado. ? = no existió consenso para ese residuo.



Figura S3. Alineamiento entre la región troncal de la proteína de fusión E de DENV y la región equivalente de ANDV Gc. Éste fue utilizado para el modelamiento por comparación de la región troncal de Gc. La similitud de los residuos se muestra con la intensidad del color, correspondiendo a un 24,5%.

Modelo	Puntaje DOPE
1	-2633,6
2	-2632,4
3	-2627
4	-2621,4
5	-2549,4
6	-2527,4
7	-2519,6
8	-2482,3
9	-2444,3
10	-2479,4

Tabla S1. Resultados del modelamiento por comparación. Se muestran los 10 mejores modelos obtenidos de Modeller ordenados según su puntaje DOPE.

A

Modelo	Patrón	Cobertura	Z-score	Similitud	Programa	Confianza	Observación
1	1ubdc2	1	8.940	0.235	SP3	Alta	S425-Y429 hélice α
2	3btpb	0.941	6.546	0.250	SPARKS2	Baja	Q422-Y429 hélice α
3	hs2f49c	1	3.990	0.294	FUGUE	Baja	F420-D426 hélice α
4	1p4xA1	1	8.977	0.353	SAM-T02	Baja	Desestructurado
5	1x9y_A	0.705	6.735	0.417	HHsearch	Baja	Desestructurado

B

Modelo	Patrón	Cobertura	Z-score	Similitud	Programa	Confianza	Observación
1	2fvzA1	1	10.951	0.100	SAM-T02	Alta	F438-L453 hélice α
2	2fvzA	1	9.133	0.100	SAM-T02	Baja	F438-L453 hélice α
3	1qgma	0.9	7.277	0.167	SP3	Baja	Desestructurado
4	2bibA5	0.9	8.855	0.222	PPA-I	Baja	K439-F442, W448-G451 hoja β
5	1gl0i	0.95	6.143	0.316	SPARKS2	Baja	W441-F442, W448-L449 hoja β

Tabla S2. Resultados del modelamiento por *Threading* usando el servidor LOMETS. (A) usando la secuencia correspondiente a H1 de ANDV Gc como entrada. (B) usando la secuencia correspondiente a H2 de ANDV Gc como entrada. LOMETS es un servidor que realiza *threading* usando diferentes programas, por lo que el Z-score no es comparable entre los diferentes programas. 3 modelos para H1 poseen estructura helicoidal, mientras que dos para H2. Sólo un modelo de H1 y H2 es válido según el Z-score del programa utilizado.

	Reconstrucción región troncal de DENV E	Modelos de ANDV Gc: comparación con DENV E	Modelos de ANDV Gc: Threading
RAMPAGE			
% residuos en región favorecida	95,8	93,9	100
% residuos en región permitida	4,2	4,9	0
% residuos en otras regiones	0	1,2	0
ANOLEA			
% residuos con energía positiva	40	61,5	41,8
suma de energías positivas (e/kT)	69,5	56,8	15,6
Verify3D			
% residuos puntaje positivo	92,6	79,5	N.D.
% residuos puntaje negativo	7,4	20,5	N.D.

Tabla S3. Análisis comparativo de los modelos tridimensionales obtenidos mediante diferentes métodos. Se comparan los resultados obtenidos para la reconstrucción de la región troncal de DENV E con el promedio de los resultados para los modelos de ANDV Gc obtenidos mediante modelamiento por comparación o *Threading*. Se analizaron los ángulos de Ramachandran con RAMPAGE, la energía de los residuos con ANOLEA y la estereoquímica de los residuos con *Verify3D*. No fue posible analizar los modelos de *Threading* con *Verify3D* puesto que la secuencia era demasiado corta.

A	0% TFE		10% TFE		30% TFE		50% TFE		70% TFE	
	Promedio	D.E.								
Hélice α total	0,598	0,067	0,663	0,051	0,662	0,04	0,701	0,059	0,721	0,035
Hoja β total	0,133	0,054	0,089	0,035	0,159	0,021	0,07	0,028	0,069	0,031
Vueltas	0,108	0,07	0,123	0,049	0,079	0,038	0,106	0,045	0,089	0,034
Desestructurado	0,161	0,117	0,136	0,112	0,098	0,021	0,151	0,108	0,17	0,087

B	0% TFE		10% TFE		30% TFE		50% TFE		70% TFE	
	Promedio	D.E.								
Hélice α total	0,693	0,118	0,697	0,08	0,746	0,064	0,909	0,08	0,91	0,167
Hoja β total	0,125	0,131	0,095	0,064	0,053	0,046	0,003	0,002	0,008	0,005
Vueltas	0,073	0,03	0,061	0,057	0,069	0,019	0,001	0,032	0,002	0,045
Desestructurado	0,137	0,068	0,107	0,064	0,161	0,005	0,001	0,081	0,003	0,11

C	0% TFE		10% TFE		30% TFE		50% TFE		70% TFE	
	Promedio	D.E.								
Hélice α total	0,66	0,062	0,683	0,098	0,728	0,067	0,782	0,181	0,81	0,187
Hoja β total	0,1	0,051	0,1	0,048	0,075	0,041	0,073	0,043	0,061	0,038
Vueltas	0,083	0,038	0,058	0,039	0,046	0,037	0,059	0,056	0,059	0,051
Desestructurado	0,139	0,072	0,143	0,073	0,093	0,071	0,098	0,075	0,099	0,075

Tabla S4. Deconvolución de espectros de microísmo circular para péptidos de ANDV Gc. (A) GcSt H1. (B) GcSt H2. (C) GcSt. Los valores corresponden a los resultados obtenidos por los algoritmos CONTIN/LL, CDSSTR y SELCON 3 usando diferentes bases de datos. D.E. = Desviación Estándar.

Fracción	Índice de refracción	Densidad (g/cm ³)
1	1,347	1,034
2	1,3492	1,0423
3	1,3523	1,0507
4	1,3579	1,0635
5	1,3614	1,0765
6	1,3655	1,0854
7	1,36	1,0854
8	1,366	1,0854
9	1,3669	1,0899
10	1,3672	1,0899
11	1,3672	1,0899
12	1,3672	1,0899
13	1,3672	1,0899
14	1,3676	1,0899
15	1,2368	1,0899
16	1,3674	1,0899
17	1,3674	1,0899
18	1,3675	1,0899
19	1,3675	1,0899
20	1,369	1,0944
21	1,3737	1,1082
22	1,378	1,122
23	1,382	1,1318

Tabla S5. Densidades de las fracciones obtenidas posterior a la ultracentrifugación. Se preparó un gradiente sin muestra y se ultracentrifugó igual que los gradientes con muestras. A cada una de las fracciones obtenidas se midió el índice de refracción. Usando valores tabulados se determinó la densidad de la fracción

Fracción	GcSt H1	GcSt H2	GcSt	N1
1	745	588	628	678
2	478	355	535	352
3	267	286	288	198
4	112	252	142	109
5	86	121	61	32
6	30	51	26	11
7	8	36	12	4
8	6	20	3	3
9	5	17	4	-1
10	-4	16	4	5
11	1	5	-2	-1
12	5	9	0	0
13	-1	13	3	-1
14	-1	11	0	0
15	-1	8	-3	0
16	2	10	2	-1
17	-2	5	2	-1
18	5	6	1	0
19	3	5	1	0
20	1	3	1	0
21	3	5	0	-2
22	7	-5	-4	-1
23	2	12	7	-3

Tabla S6. Fluorescencia de liposomas marcados con DPH contenidos en fracciones obtenidas posterior a ultracentrifugación. A cada una de las fracciones obtenidas se midió la intensidad de fluorescencia a 427 nm (máximo de emisión de DPH) para determinar en cuales fracciones se localizaban los liposomas. A cada medición se restó el valor obtenido de la muestra sin liposomas. Las preparaciones de liposomas difieren en todos los casos, por lo que no deben hacerse comparaciones entre los diferentes péptidos.

BIBLIOGRAFIA

- Allison, S., Stiasny, K., Stadler, K., Mandl, C. y Heinz, F.** 1999. Mapping of Functional Elements in the Stem-Anchor Region of Tick-Borne Encephalitis Virus Envelope Protein E. *J. Virol.* **73**: 5605–5612.
- Arikawa, J., Takashima, I. y Hashimoto, N.** 1985. Cell fusion by haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) viruses and its application for titration of virus infectivity and neutralizing antibody. *Arch Virol.* **86**: 303-313.
- Blanco, F.J., Rivas G. y Serrano, L.** 1994. A short linear peptide that folds into a native beta-hairpin in aqueous solution. *Nat. Struct. Bio.* **9**: 584-590.
- Bowie, J.U., Luthy, R. y Eisenberg, D.** 1991. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimension structure. *Science.* **5016**: 164-70.
- Chernomodik, L. y Kozlov, M.** 2003. Protein-Lipid Interplay in Fusion and Fission of Biological Membranes. *Annual Rev. Biochem.* **72**: 175-207.
- Chernomodik, L., Zimmerberg, J. y Kozlov, M.** 2006. Membrane of the world unite! *J. Cell Biol.* **175**: 201-207.
- Epand, R.** 2003. Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim. Biophys. Acta.* **1614**: 116-121.
- Gallo, S., Finnegan, C., Viard, M., Raviv, Y., Dimitrov, A., Rawat, S., Puri, A., Durell, S. y Blumenthal, R.** 2003. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim. Biophys. Acta.* **1614**: 36– 50.
- Gavrilovskaya, I., Shepley, M., Shaw, R., Ginsber, M. y Mackow, E.** 1998. β 3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 7074-7079.
- Guillén, J., Pérez-Berná, A., Moreno, M. y Villalain, J.** 2005. Identification of the Membrane-Active Regions of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Membrane Glycoprotein Using a 16/18-Mer Peptide Scan. *J. Virol.* **79**: 1743–1752.
- Hope, M., Bally, M., Webb, G. y Cullis, P.** 1985. Production of large unilemellar vesicles by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta.* **812**: 55-65.
- Hrobowski, Y., Garry, R. y Michael, S.** 2005. Peptide inhibitors of dengue virus and West Nile virus infectivity. *Virology. J.* **2**: 49.
- Jardetzky, T. y Lamb, R.** 2004. A class act. *Nature.* **427**: 307-308
- Jin, M. Park, L. Lee, S., Shin, J, Song, K.J., Ahn, T.I., Hwang, S.Y., Ahn, B.Y. y Ahn, L.** 2002. Hantaan virus enters cells by a clathrin-dependent receptor mediated endocytosis. *Virology.* **294**: 60-69.

- Jeetendra, E., Ghosh, K., Odell, D., Li, J., Ghosh, H. y Whitt, M.** 2003. The Membrane-Proximal Region of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G Ectodomain Is Critical for Fusion and Virus Infectivity. *J. Virol.* **77**: 12807–12818
- Jeetendra, E., Robinson, C., Albritton, L. y Whitt, M.** 2000. The Membrane-Proximal Domain of Vesicular Stomatitis Virus G Protein Functions as a Membrane Fusion Potentiator and Can Induce Hemifusion. *J. Virol.* **76**: 12300-12311.
- Jimenez, M.A., Evangelio, J., Aranda, C., Lopez-Brauet, A., Andreu, D., Rico, M., Lagos, R., Andreu, J y Monasterio, O.** 1999. Helicity of α (404-451) and β (394-445) tubulin C-terminal recombinant peptides. *Prot. Sci.* **8**: 788-799.
- Kelkar, D. y Chattopadhyay, A.** 2006. Membrane interfacial localization of aromatic amino acids and membrane protein function. *J. Biosci.* **31**: 297–302.
- Kielian, M.** 2006. Class II virus membrane proteins. *Virology.* **344**: 38-47
- Kielian, M. y Rey, F.** 2005. Virus membrane-fusion proteins: More than one way to make a hairpin. *Nat. Rev. Microb.* **4**: 67-76.
- Levis, S., Morzunov, S.P., Rowe, J.E., Enria, D., Pini, N., Calderon, G., Sabattini, M. y St Jeor, S.C.** 1998. Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. *J Infect Dis.* **177**: 529-38.
- Liao, M. y Kielian, M.** 2005. Domain III from class II fusion protein functions as a dominant-negative inhibitor of virus membrane fusion. *J. Cell Biol.* **171**: 111-120.
- Liao, M. y Kielian, M.** 2006. Functions of the Stem Region of the Semliki Forest Virus Fusion Protein during Virus Fusion and Assembly. *J. Virol.* **80**: 11362-11369.
- Lorizate, M., Huarte, N., Saéz-Ciri3n, A y Nieva, J.** 2008. Interfacial pre-transmembrane domains in viral protein promoting membrane fusion and fission. *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**: 1624-1639.
- Matthews, T., Salgo, M., Greenberg, M., Chung, J., DeMasi, R. y Bolognesi, D.** 2004. Enfuvirtide: The first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat. Rev.* **3**: 215- 225.
- Melo, F. y Feytmans, E.** 1998. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *J. Mol. Biol.* **5**: 1141-52.
- Mertz, G.J., Miedzinski, L., Goade, D., Pavia, A.T., Hjelle, B., Hansbarger, C.O., Levy, H., Koster, F.T., Baum, K., Lindemulder, A., Wang, W., Riser, L., Fernandez, H., Whitley, R.J.** (2004). Collaborative Antiviral Study Group. Placebo-controlled and double-blind trial of intravenous ribavirin for the treatment of hantavirus cardiopulmonary syndrome in North America. *Clin. Infect. Dis.* **39**: 1307-1313.
- Mishra, V., Palgunachari, M., Segrest, J. y Anantharamaiah, G.** 1994. Interactions of Synthetic Peptide Analogs of the Class A Amphipathic Helix with Lipids: Evidence for the Snorkel Hypothesis *J. Biol. Chem.* **269**: 7185-7191.

- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. y Harrison, S.** 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. **427**: 313- 318.
- Moreno, M., Giudici, M. y Villalaín, J.** 2006. The membranotropic regions of the endo and ectodomains of HIV gp41 envelope glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*. **1758**: 111– 123.
- Muñoz, V., Blanco, F. y Serrano, L.** 1995. The distribution of α -helix propensity along the polypeptide chain is not conserved in proteins of the same family. *Prot. Sci.* **4**: 1577-1586.
- Odell, D., Wanas, E., Yan, J. y Ghosh, H.** 1997. Influence of Membrane Anchoring and Cytoplasmic Domains on the Fusogenic Activity of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *J. Virol.* **71**: 7996–8000.
- Pensiero, M.N., Sharefkin, J.B., Dieffenbach, C.W. y Hay, J.** 1992. Hantaan virus infection of human endothelial cells. *J. Virol.* **66**: 5929-5936.
- Plassmeyer, M., Soldan, S., Stachelek, K., Martin-García, J. y González-Scarano, F.** 2005. California serogroup Gc (G1) glycoprotein is the principal determinant of pH-dependent cell fusion and entry. *Virology*. **338**: 121-132.
- Robinson, C. y Whitt, M.** 2002. The Membrane-Proximal Stem Region of Vesicular Stomatitis Virus G Protein Confers Efficient Virus Assembly. *J. Virol.* **76**: 2239-2246.
- Roccatano, D., Colombo, G., Fiorini, M. y Mark, A.** 2002. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilizes secondary-structure formation in peptides: A molecular dynamics study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**: 12179-12184.
- Rost, B. & Sander, C.** 1993. Prediction of Protein Secondary Structure at Better than 70% Accuracy. *J. Mol. Biol.* **232**: 584-599.
- Sáez-Cirión, A., Arrondo, J., Gómara, M., Lorizate, M., Iloro, I., Melykan, G. y Nieva, J.** 2003. Structural and Functional Roles of HIV-1 gp41 Pretransmembrane Sequence Segmentation. *Biophys. J.* **85**: 3769–3780.
- Salzwedel, K. West, J. y Hunter, E.** 1999. A Conserved Tryptophan-Rich Motif in the Membrane-Proximal Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Ectodomain Is Important for Env-Mediated Fusion and Virus Infectivity. *J. Virol.* **73**: 2469–2480.
- Savitzky A. & Golay, M.** 1964. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal. Chem.* **36**: 1627- 1639.
- Schilibi, D., Montelaro, R. y Vogel, H.** 2001. The Membrane-Proximal Tryptophan-Rich Region of the HIV Glycoprotein, gp41, Forms a Well-Defined Helix in Dodecylphosphocholine Micelles. *Biochem.* **40**: 9570-9578
- Segrest, J., De Loof, H., Dohlman, JG., Brouillette, CG. y Anantharamaiah, GM.** 1990. Amphipathic helix motif: classes and properties. *Proteins*. **8**:103–17.
- Spassov, V., Yan, L. y Flook, P.** 2007. The dominant role of side-chain backbone interactions in structural realization of amino acid code. ChiRotor: A side-chain prediction algorithm based on side-chain backbone interactions. *Prot Science.* **16**: 494–506.

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

Suárez, T., Nir, S., Goñi, F., Saéz-Ciri3n, A. y Nieva, J. 2000. The pre-transmembrane region of the human immunodeficiency virus type-1 glycoprotein: a novel fusogenic sequence. *FEBS Letters.* **477**: 145-149.

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

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

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

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

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

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

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

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