

UCH-FC
Biotecnología
M971
C. 1



FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

Rol del ectodominio de glicoproteína Gn del virus Andes (Hantavirus) en la localización y funcionalidad de Glicoproteína Gc.

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

Vicente Muñoz Walther

Diciembre - 2016

Santiago – Chile

Dra. Nicole Tischler
Directora del Seminario de Título

Dra. Maria Rosa Bono
Patrocinante del Seminario de Título



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

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

VIECENTE MUÑOZ WALTHER

“Rol del ectodominio de glicoproteína Gn del virus Andes (Hantavirus) en la localización y funcionalidad de proteína Gc”

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

Dra. Nicole Tischler
Directora Seminario de Título

Una firma manuscrita en tinta azul que dice "N. Tischler" sobre una línea horizontal.

Dra. María Rosa Nono Merino
Profesora Patrocinante Seminario de Título

Una firma manuscrita en tinta azul que dice "María Rosa Nono Merino" sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Christian González Billault
Presidente

Una firma manuscrita en tinta azul que dice "Christian González Billault" sobre una línea horizontal.

Dr. Ricardo Soto Riffo
Integrante

Una línea horizontal para la firma de Ricardo Soto Riffo.



Este seminario de título fue financiado por proyecto FONDECYT 1140050.

Agradecimientos

Primero que nada, quiero agradecer a mi familia. A mis padres por traermé a este mundo, por darme todo el cariño que me han dado, por darme casa, comida, educación y todo lo que he necesitado durante mi vida. A mis hermanos por las risas y los buenos momentos del día a día que hacen que llegar a la casa después de cada día de trabajo sea algo entretenido y ameno. Muchas gracias familia, gracias por aguantarme mis mañas y mal humores producto del cansancio durante este periodo.

Quiero agradecer también a todos los amigos, del colegio y la universidad, que han estado conmigo durante mi vida. Gracias al Picho, al Tata, el Aperrao, el Pol, el Astu, la Aranza, el Toto, el Camilo y muchos más. Gracias por estar siempre ahí por mí y por siempre apañar a una chela cuando fue necesario.

Quiero agradecer también a la Consuelo, mi polola y compañera, por apoyarme tanto en las etapas finales del desarrollo de mi tesis y también por quererme y dejarse querer. Has estado conmigo en las buenas y en las malas y me has aguantado cuando he tenido que desaparecer para trabajar. Me has alegrado la vida de una forma que no me imaginaba posible, y por eso te agradezco muchísimo.

Por último, quiero agradecer a la gente de Hanta lab. Todos y cada uno de ellos han aportado y me han ayudado mucho de alguna forma u otra, y les estaré agradecido por siempre, pero tengo que recalcar en especial a algunas personas. A Nicole, mi tutora del seminario de título, por abrirme las puertas de su laboratorio, por corregir y ayudarme en mi trabajo hasta las últimas horas de la noche, por apoyarme y guiarme en momentos

en que no estuve muy firme o seguro de lo que hacía, y por enseñarme prácticamente todo lo que sé de virología, tanto dentro del laboratorio cómo en una sala de clases. A la Nati, por ser la primera en enseñarme sobre el trabajo de laboratorio y cultivo celular, por ser una gran amiga y una compañera de ñoñerías en el laboratorio. Al Nico, por estar siempre dispuesto a ayudar en lo que fuera, aunque estuviera ocupado con su trabajo, y por siempre estar ahí para escuchar y conversar sobre lo que sea, algún protocolo experimental, la última novedad de algo ñoño o la vida misma. Y a Eduardo, por ayudarme en algunos de los experimentos presentados en esta tesis y por siempre ser un buen amigo y alguien que inspira amor en la ciencia. Gracias también a Putú, Chanti, Meli, Barri, Rodri, Pía, Raúl y Diego por estar ahí cuando los necesité y por hacer la vida que pasé dentro del laboratorio más amena. Infinitas gracias.

Índice de contenidos

Agradecimientos.....	ii
I. Índice de figuras.....	vi
II. Lista de abreviaturas.....	vii
III. Resumen.....	viii
IV. Abstract.....	x
1. Introducción	1
1.1 Aspectos generales de los hantavirus.....	1
1.2 Glicoproteínas Gn y Gc de los hantavirus	3
1.2.1 Roles de Gn y Gc en la entrada de hantavirus a células.....	7
1.2.2 Rol de Gn en el tráfico celular de Gc	9
1.2.3 Roles de Gn y Gc en la yemación de los hantavirus	10
1.2.4 Gn cómo posible protector de la protonación de Gc	12
Hipótesis.....	14
El ectodominio de la glicoproteína Gn del virus Andes tiene diferentes roles en la entrada y el egreso celular del virus, entre estos la localización de Gc a membrana plasmática, el ensamblaje viral y protección de la activación de la fusión de membranas por Gc	14
Objetivos.....	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos.....	14
2. Materiales y metodología	15
2.1 Células y anticuerpos.....	15
2.2 Diseño de mutantes	15
2.3 Plásmidos	16
2.4 Expresión y localización a membrana plasmática de Gc y Gn silvestre y mutante	17
2.4.1 Detección mediante inmunofluorescencia.....	17

2.4.2 Separación de fracciones intracelular y de superficie mediante biotilación	18
2.4.3 Análisis de fracciones intracelular y de superficie.....	18
2.5 Producción de VLPs, usando GPC silvestre y nativo	19
2.6 Análisis de actividad fusogénica mediada por Gc en presencia de Gn silvestre o mutante.....	19
3. Resultados	21
3.1 Diseño de mutantes de ectodominio de Gn de ANDV.....	21
3.2 Expresión y localización de Gn silvestre y mutante	22
3.3 Expresión y localización de Gc, en presencia de Gn silvestre y mutante	27
3.4 Ensamblaje de Gc y Gn silvestre y mutante en VLPs	28
3.5 Actividad fusogénica	30
4. Discusión.....	33
4.1 Expresión y localización de Gn mutante.....	33
4.2 Expresión y localización de Gc al co-expresar con Gn mutante.....	35
4.3 Formación de partículas virales con Gn silvestre y mutante	36
4.4 Actividad fusogénica de Gc al expresarla con Gn silvestre y mutante	38
5. Conclusiones	40
6. Bibliografía	41

I. Índice de figuras

Figura 1: Esquema de la estructura de los hantavirus y precursor proteico GPC.	3
Figura 2: Estructura tetramérica de glicoproteínas de tulavirus	4
Figura 3: Vista lateral de proyección de hantavirus	5
Figura 4: (A) Estructura parcial de ectodominio de Gn de PUUV	6
Figura 5: Esquema de la entrada de los hantavirus a células.....	9
Figura 6: Comparación entre hantavirus y partículas semejantes a (hanta)virus (VLP).....	11
Figura 7: Esquema de GPC, representando la secuencia de Gn silvestre y mutantes junto a Gc.....	22
Figura 8: Expresión de Gc y Gn silvestre y mutantes	23
Figura 9: Detección de Gn mutante en membrana plasmática mediante ensayo de inmunofluorescencia indirecto	26
Figura 10: Expresión de Gc en presencia de Gn silvestre o mutante y detección de Gc en la membrana plasmática	27
Figura 11: Formación de VLPs en células transfectadas con GPC silvestre y mutantes de delección de Gn (A).....	28
Figura 12 Actividad de fusión por Gc y Gn silvestre y mutante	31
Figura 13: Cuantificación de fusión mediada por Gc y Gn silvestre y mutante	32
Figura 14: Representación esquemática bidimensional de las posibles estructuras de los distintos mutantes.....	35

II. Lista de abreviaturas

ANDV	Virus Andes
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNhs	ARN de hebra simple
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
GPC	Precursor proteico de Gc y Gn
HA	Hemaglutinina
HFRS	Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal
HPS	Síndrome Cardiopulmonar asociada a Hantavirus
HTNV	Virus Hantaan
MEM	Minimum Essential Medium
MINSAL	Ministerio de Salud
ORF	Marco de lectura abierto (Open Reading frame)
PUUV	Virus Puumala
RdRp	Polimerasa de ARN dependiente de ARN
RNC	Ribonucleocápsides
SNV	Virus Sin Nombre
TULV	Virus Tula
VLP	Partículas semejantes a Virus

III. Resumen

El virus Andes (ANDV) pertenece al género *Hantavirus* (familia *Bunyaviridae*), que se caracteriza por poseer una envoltura lipídica y un genoma tripartido de ARN de hebra simple de polaridad negativa. Este virus es patogénico para humanos, y es endémico en Chile y otros países de América del Sur.

En la envoltura de este virus se encuentran proyectadas dos glicoproteínas Gn y Gc, que son expresadas como glicoproteína precursora denominada GPC que es procesada proteolíticamente. En general, proteínas de envoltura viral son esenciales para mediar el ensamblaje del virus durante su salida de la célula como también para el proceso de la entrada de virus a células blanco. Para la glicoproteína Gc se ha descrito un rol en la fusión de membranas crucial durante el ingreso viral; sin embargo, aún no se conoce el rol de la glicoproteína Gn en estos procesos.

Para estudiar los roles de Gn durante el ingreso y egreso celular, se desarrollaron cinco mutantes de delección desde el extremo N-terminal del ectodominio de esta glicoproteína, manteniendo el resto de la secuencia del precursor GPC. En estos mutantes se sustituyó el péptido señal (SP) por el de la inmunoglobulina de cadena ligera kappa murina y se incorporó un tag N-terminal de hemaglutinina (HA). Estos mutantes abarcan entonces desde la sustitución del SP hasta delecciones de 90, 281, 374, o 440 aminoácidos, siendo estos los mutantes Δ SP, Δ 90, Δ 281, Δ 374 y Δ 440, respectivamente.

Se analizó primero la expresión y localización celular de los mutantes. Mientras que la glicoproteína Gc se detectó mediante *western blot* en el peso molecular esperado

a nivel intracelular para todos los mutantes, no se pudo detectar Gn mutante mediante esta metodología. Sin embargo, mediante inmunofluorescencia indirecta, Gn mutante fue detectada intracelularmente con excepción de $\Delta 440$. Cuando se analizó la presencia de estas proteínas en la superficie celular, se encontraron Gn mutante y Gc silvestre presentes, con la excepción nuevamente de Gn de la mutante $\Delta 440$.

Estos resultados refuerzan la idea que Gn tiene un rol en el tráfico intracelular de Gc ya que a pesar de que Gc se encontró expresado con el peso molecular esperado, en ausencia de una señal de expresión de Gn $\Delta 440$ no alcanzó la membrana plasmática.

Para analizar el rol de Gn en el ensamblaje viral se analizó la presencia de partículas semejantes a virus (VLPs) que se liberan al sobrenadante en condiciones de sobreexpresión de las glicoproteínas nativas. Se observó que sólo el mutante ΔSP permitió el ensamblaje en VLPs, indicando que la sustitución del SP y el tag de HA fueron bien tolerados, pero no así deleciones del ectodominio de Gn. Para obtener información sobre un posible rol de Gn en la actividad fusogénica de Gc, se analizó además la actividad fusogénica de los distintos mutantes. Utilizando un ensayo de fusión entre células, se encontró que únicamente la mutante ΔSP mantuvo actividad de fusión, a pesar de que glicoproteínas de $\Delta 90$, $\Delta 281$ y $\Delta 374$ se encontraron en la membrana plasmática de células. Estos resultados sugieren en conjunto, que Gn posee tanto un rol en la actividad de fusión de Gc como en el ensamblaje de Gn y Gc en partículas virales. Además, esta nueva información forma la base para identificar a futuro de qué manera Gn está involucrado en estos diferentes mecanismos.

IV. Abstract

Andes virus (ANDV) belongs to the *Hantavirus* genus (Family *Bunyaviridae*), which is characterized by a lipidic envelope and a single stranded RNA genome of negative polarity. This human pathogenic virus is endemic in Chile and other South American countries.

In the envelope of the virus two glycoproteins are anchored, which are expressed as a glycoprotein precursor (GPC) that is proteolytically processed into Gn and Gc. Generally, viral envelope proteins are essential in mediating the viral assembly during virus egress from the cell, as well as having crucial functions during the entry process into host cells. It has been described that the Gc glycoprotein is the viral membrane fusion protein active during viral entry; nonetheless, a role for Gn has not yet been defined, neither during viral cell entry nor during its exit.

To study the roles of Gn during viral entry and egress, five deletion mutants from the N-terminal end of this glycoprotein were developed, maintaining the rest of the protein precursor unchanged. In these mutants the signal peptide (SP) was replaced by that of the murine light chain of the kappa immunoglobulin, and a hemagglutinin (HA)-tag was added N-terminally. These mutants include the deletion of only the SP up to deletions of 90, 281, 374 and 440 aminoacids, termed respectively Δ SP, Δ 90, Δ 281, Δ 374 and Δ 440.

Cellular localization and expression of these mutants was first analyzed. While Gc was detected intracellularly through *western blot* assays in its expected molecular weight

for all mutants, Gn was not detected through this approach. Nonetheless, it was intracellularly detected through an indirect immunofluorescence assay for all mutants with the exception of Gn $\Delta 440$. When the presence of these proteins in the cell surface was studied, all Gn mutants and Gc were found, with the exception of Gn $\Delta 440$ and Gc expressed with this mutant. This result supports the idea that Gn has a role in intracellular trafficking of Gc, because despite Gc being found expressed intracellularly in its expected molecular weight, when Gn $\Delta 440$ was not expressed, Gc did not traffic to the cell membrane.

To analyze the role of Gn in viral assembly, the presence of virus-like particles (VLPs) was assessed. VLPs were released to the supernatant of cells overexpressing native GPC; however, among the Gn deletion mutants, only the mutant ΔSP allowed for the assembly of VLPs, indicating that the replacement of the signal peptide, or the addition of the HA-tag did not affect viral particles assembly, while any partial deletion of the Gn ectodomain did. To obtain information about a possible role of Gn in virus-cell membrane fusion, fusogenic activity of the different Gn mutants was assayed in presence of Gc. Using a cell-cell fusion assay, it was found that only ΔSP maintained a fusion activity, despite the fact that glycoproteins for $\Delta 90$, $\Delta 281$ and $\Delta 374$ mutants were present at the plasma membrane. Together, these results suggest that Gn has a role in Gc fusion activity and in the assembly of Gn and Gc in viral particles. Also, this new information sets the basis to identify in the future how Gn is involved in these different processes.

1. Introducción

1.1 Aspectos generales de los hantavirus

Los hantavirus, un género viral perteneciente a la familia *Bunyaviridae*, son virus envueltos de genoma de ARN de hebra simple de polaridad negativa con un genoma tri-segmentado (ARNhs(-)). Infecciones de humanos por hantavirus se caracterizan por ocasionar dos enfermedades: el síndrome cardiopulmonar asociado a hantavirus (HPS por sus siglas en inglés), que ocurre principalmente en América (Schmaljohn y Hjelle, 1997), y fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS por sus siglas en inglés), que ocurre en Eurasia (Krautkrämer y cols, 2012).

En Chile y Argentina se encuentra el virus Andes (ANDV), siendo el único caso de hantavirus dónde existe registro de transmisión entre humanos (Martinez y cols, 2005. Martínez-Valdenebito y cols, 2014). El virus persiste principalmente en el ratón colilargo (*Olygorizomys longicaudatus*) y otros roedores silvestres como *Abrothrix olivaceus*, *Abrothrix longpili*, *Akodon sanborni*, *Loxodontomys micropus* y *Phyllotis darwini* (Murua y cols, 2000, Pavletic y cols, 1999), infección que se transmite a humanos mediante la inhalación de aerosoles de feces de ratones infectados. La enfermedad produce infiltraciones de fluidos en el tejido pulmonar, lo que lleva además a edemas, fallas respiratorias y shock cardiogénico (Mertz y col, 2006). Se han confirmado 917 casos de infección por hantavirus desde 1995 hasta abril de 2016 (Informes MINSAL 2012, 2013, 2014, 2015 y 2016) con un índice de mortandad de 36%. En la actualidad no hay vacunas ni tratamientos efectivos para la enfermedad causada por ANDV (Hjelle y cols, 2002,

Schmaljohn, 2009), habiendo únicamente estrategias paliativas que buscan disminuir la sintomatología y mortandad de la enfermedad.

Al igual que otros hantavirus, ANDV posee al menos cuatro proteínas estructurales: una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp) codificada por el segmento genómico L, una nucleoproteína (N) codificada por el segmento genómico S, y las dos glicoproteínas de superficie Gn y Gc, codificadas por el segmento M como un precursor proteico (GPC) (Figura 1) que es procesado co-traduccionalmente (Lober y col, 2001) en la secuencia WAASA, formando proteínas de aproximadamente 634 y 487 aminoácidos respectivamente. Existen también otros ORFs en el genoma de hantavirus, uno de los cuáles codifica para una proteína no estructural (NSs) que sobrelapa con el ORF de la proteína N y se expresa por escaneo de fuga (*leaky scanning*) (Vera-Otarola y cols, 2012; Tischler y cols, 2003). Los segmentos de genoma viral se asocian a trímeros de N formando estructuras de "mango de sartén" o *panhandle* (Mir y Panganiban, 2004) y junto a su polimerasa RdRp forman las ribonucleocápsides (RNC), de las cuáles hay tres de distintos tamaños para cada partícula viral infecciosa. Las proteínas Gn y Gc forman proyecciones o "spikes" tetraméricos en la envoltura del virus, según lo observado en reconstrucciones de tomografías de criomicroscopias electrónicas de los virus Hantaan (HNTV) (Battisti y cols, 2011) y Tula (TULV) (Huiskonen y cols, 2010), ambos pertenecientes también al género de los hantavirus (Figura 1).

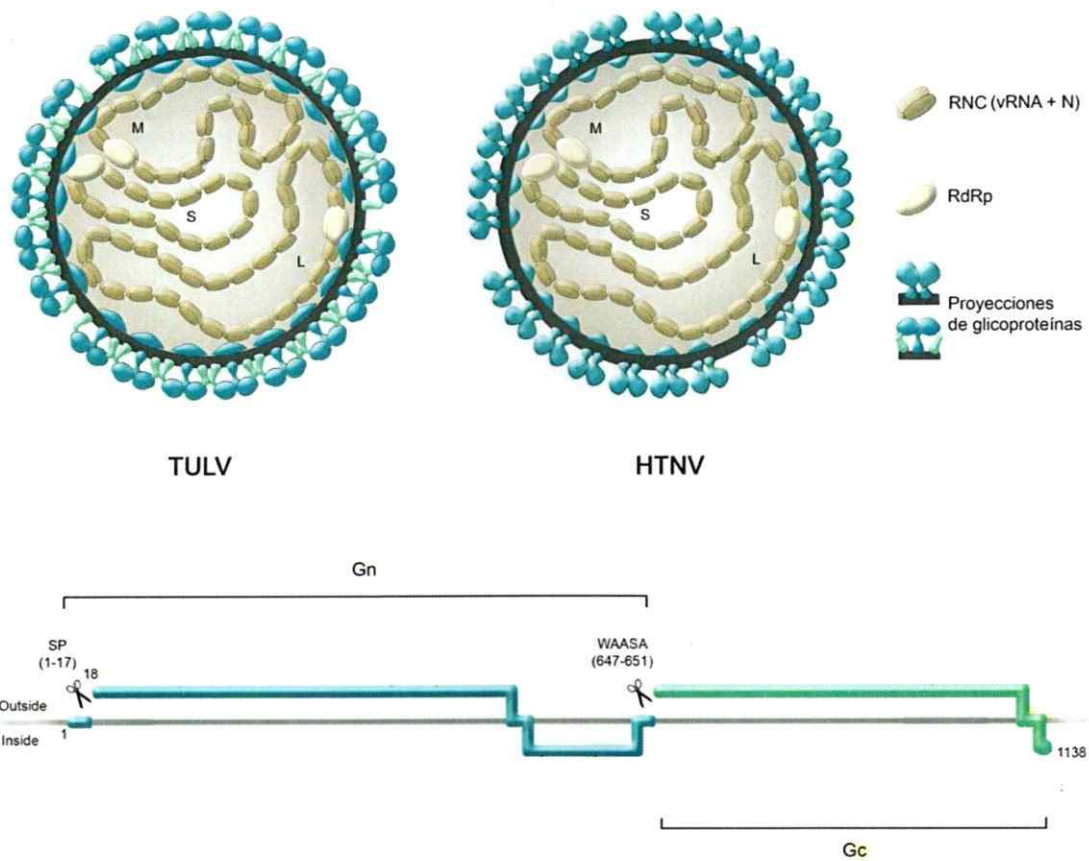


Figura 1: Esquema de la estructura de los hantavirus y precursor proteico GPC. (A) Los viriones contienen en su interior tres segmentos genómicos de ARN (L, M y S) asociados a nucleoproteínas y una polimerasa RdRp. Las glicoproteínas Gn y Gc se asocian formando proyecciones en la superficie lipídica del virus. En la figura se muestran las organizaciones de las glicoproteínas de superficie obtenidas en las reconstrucciones de criomicroscopías electrónicas de virus Tula (TULV) (Huiskenon y cols, 2010) y Hantaan (HNTV) (Battisti y cols, 2011). **(B)** Precursor proteico de Gn y Gc. Es procesado co-traduccionalmente en la región WAASA. (Imágenes) obtenida de Cifuentes-Muñoz y cols, 2014)

1.2 Glicoproteínas Gn y Gc de los hantavirus

Se ha descrito que las glicoproteínas de hantavirus interaccionan formando heterodímeros con estructuras tetraméricas que se proyectan hacia el exterior de las

partículas virales (Huiskonen y cols, 2010. Hepojoki y cols, 2010, Battisti y cols, 2011)
(Figura 2).

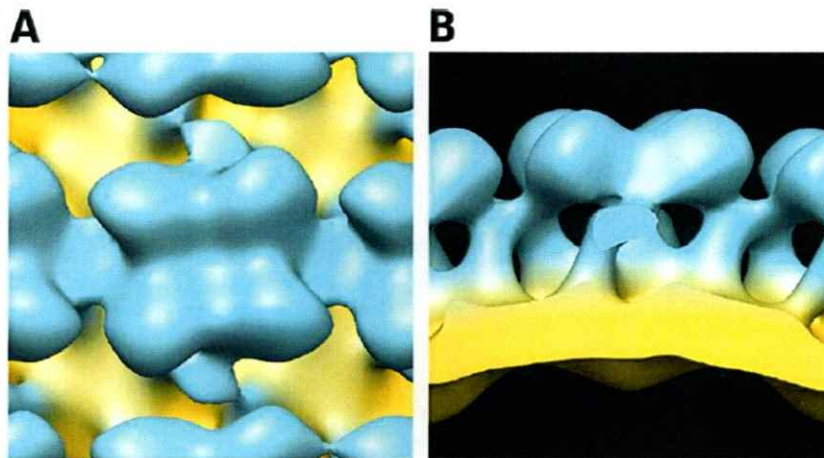


Figura 2: Estructura tetramérica de glicoproteínas de tulavirus. (A) Vista superior de proyecciones de virión de TULV. **(B)** Vista lateral de proyecciones. (Modificado desde Huiskonen y cols, 2010.)

Se han reportado dos tipos de “tallos” conectando las estructuras globulares distales de estas proyecciones. (1) Tallos periféricos elongados que se conectan de forma diagonal con la membrana del virión y proyecciones vecinas, y (2) tallos centrales localizados al centro de cada proyección (Figura 3). Durante el seminario de título, se publicó un artículo que propone que los tallos periféricos corresponden a Gc, debido a su similitud con proteínas de fusión de clase II y que las regiones globulares distales y los tallos centrales de las estructuras corresponden a los extremos N- y C-terminal del ectodominio de Gn (Li y cols, 2016).

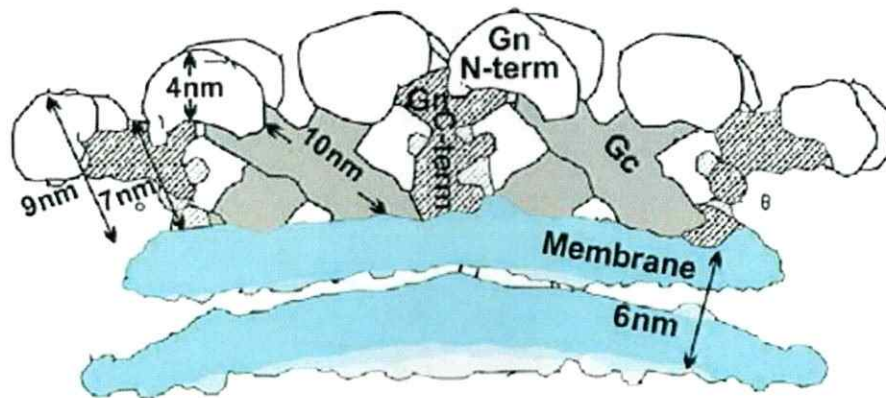


Figura 3: Vista lateral de proyección de hantavirus. Esquema de densidades de las proyecciones tetraméricas de hantavirus, y a cuál proteína corresponde cada una de las densidades (Li y cols, 2016)

Es posible que estas estructuras tetraméricas estén a su vez interactuando con otras proyecciones adyacentes, ya sea a través de sus ectodominios, regiones transmembrana o endodominios. Estas interacciones entre Gn y Gc, así como entre distintos tetrámeros, podrían ser fundamentales para una multitud de funciones relacionadas con el ciclo viral de hantavirus.

Durante el desarrollo del seminario de título, la estructura parcial del ectodominio de Gn de PUUV fue publicada (Li y cols, 2016), obtenida mediante de cristalografía de rayos X. Se cristalizó una forma soluble del ectodominio de Gn, abarcando el N-terminal de Gn hasta el residuo equivalente a E374 en ANDV (Figura 4).

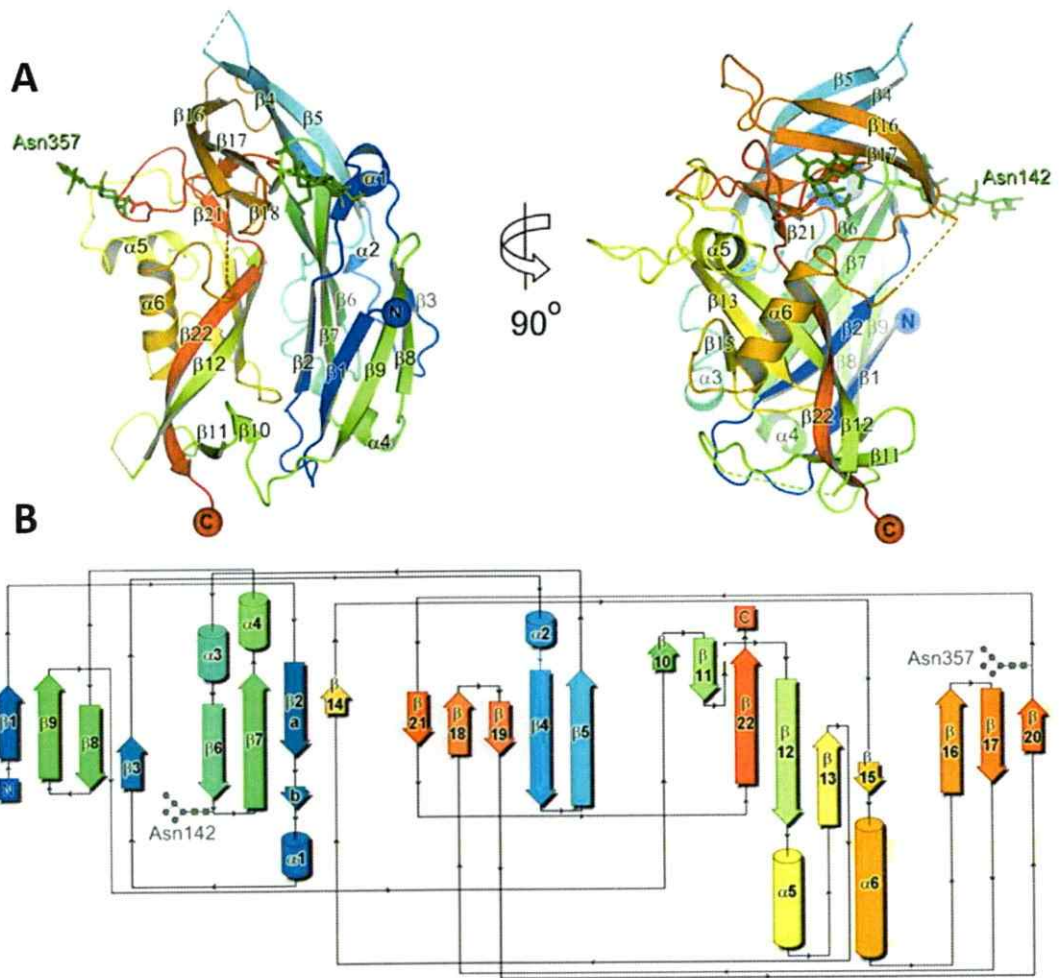


Figura 4: (A) Estructura parcial de ectodominio de Gn de PUUV, obtenida mediante cristalografía de rayos X. Helices- α son representadas como espirales, láminas- β son representadas como flechas. (B) Diagrama topológico de la estructura de ectodominio de Gn. Helices- α son representadas como cilindros, láminas- β son representadas como flechas. Tomado de Li y cols (2016).

1.2.1 Roles de Gn y Gc en la entrada de hantavirus a células

Es probable que las glicoproteínas de superficie tengan múltiples roles en los procesos de entrada y salida del virus, sin embargo, solo algunos de estos han sido efectivamente corroborados.

Un mecanismo fundamental para la entrada de virus es la unión de partículas virales a la membrana plasmática de células huésped (Figura 5). Las interacciones entre proteínas virales y receptores celulares que dan paso a la unión pueden ser relativamente inespecíficas o muy específicas. Las inespecíficas suelen deberse a propiedades bioquímicas generalizadas tales como fuerzas iónicas o a la presencia de factores celulares ubicuos, mientras que las específicas suelen requerir la presencia de receptores celulares específicos para un tejido o tipo celular (Jolly y Satentau, 2013). Las interacciones inespecíficas permiten la asociación, usualmente reversible, de partículas virales con la membrana plasmática de forma que estas se concentren alrededor de células, facilitando de esta forma la interacción con receptores más específicos (Jolly y Satentau, 2013). Las interacciones con receptores celulares más específicos pueden también tener el rol de iniciar un proceso de endocitosis, en cuyo caso se dice que son receptores de internalización. Estos receptores de internalización no tienen que necesariamente ser también factores de unión (Wickham y cols, 1993). Se han identificado varios receptores celulares candidatos para los hantavirus, entre los cuales se encuentran las subunidades $\beta 3$ y $\beta 1$ de integrinas (Gavrilovskaya, 1998), $\beta 2$ integrina (Raftery y cols, 2014), *Decay Accelerating Factor* (DAF) (Buranda y cols, 2014) y *Globular C1q Receptor* (gC1qR) (Choi y cols, 2008) entre otros, sin embargo, aún no se conoce cuál rol juegan en el proceso de entrada viral. Además, aún se desconoce cuál

de las glicoproteínas virales, o si ambas, tienen un rol en la unión del virus a células, ya sea específica o inespecífica.

Luego de la unión de viriones a células, los hantavirus son endocitados mediante un mecanismo dependiente (Jin M y cols, 2002) o independiente de clatrina (Ramanathan y cols, 2008), mediado inicialmente por los receptores de internalización. Una vez dentro de los endosomas, los hantavirus continúan con el proceso de fusión (Figura 5), mecanismo a través del cual la membrana de envoltura viral y la membrana plasmática de la célula huésped fusionan, permitiendo al virus hacer ingreso de sus ribonucleocápsides hacia el citoplasma de la célula.

Existe evidencia que sugiere que la glicoproteína Gc es una proteína de fusión clase II (Tischler y cols, 2005; Tischler y cols, 2011), y que es el bajo pH de los endosomas tardíos el que activa un cambio conformacional en estas proteínas, dando paso a la fusión (Acuña y cols, 2015). No se ha identificado aún algún rol de la proteína Gn en este proceso de fusión. Debido a que todo indica que Gc se trata de la proteína de fusión, Gn es un fuerte candidato para el mecanismo de unión, mencionado anteriormente.

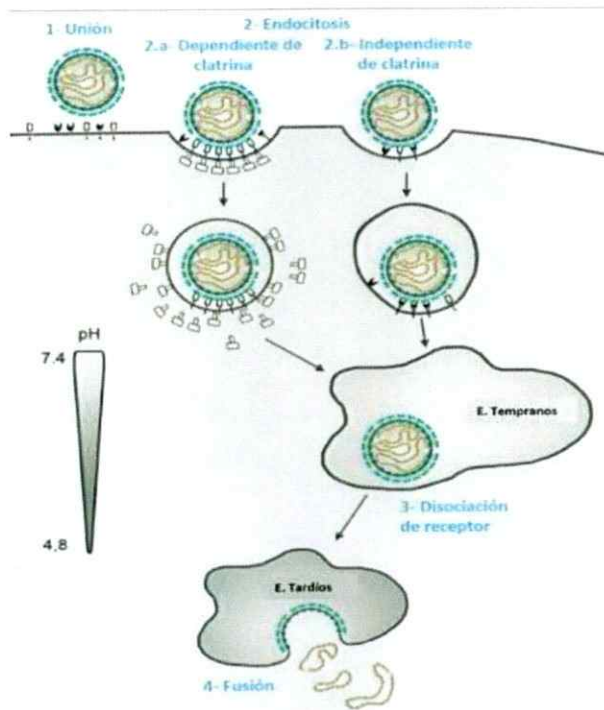


Figura 5: Esquema de la entrada de los hantavirus a células. (1) Unión de hantavirus a receptores de membrana plasmática, dando paso a la (2) endocitosis que puede ser dependiente o independiente de clatrina. El virus se desasocia de receptores (3), dando paso a la (4) fusión, activada por la acidificación de lo endosomas a medida que maduran.

1.2.2 Rol de Gn en el tráfico celular de Gc

La evidencia parece indicar que Gn es necesaria para el tráfico de Gc en otros bunyavirus. Para el virus Bunyamwera (BUNV) del genero *orthobunyaviridae*, se ha observado que la expresión de las glicoproteínas Gn y Gc por separado, resulta en que la primera localiza hacia el complejo de Golgi, mientras que la segunda es retenida en el retículo endoplásmico (Lappin y cols, 1994). Se ha observado un mecanismo similar para los tospovirus, genero también perteneciente a la familia *Bunyaviridae* (Kikkert y cols, 2001). La heteromultimerización de Gn y Gc pareciera ser un requisito para salir del

retículo endoplásmico (Ruusala y cols, 1992. Deyde y cols, 2005). Considerando esto, es probable que Gn tenga un rol fundamental en la localización de Gc.

1.2.3 Roles de Gn y Gc en la yemación de los hantavirus

El proceso de yemación viral requiere la evaginación y escisión de membrana permitiendo la separación del virus y la membrana, dando paso a la liberación de una partícula viral. Este proceso suele ser impulsado por alguna fuerza que induce curvatura de membrana, en general producida por una interacción entre proteínas virales y lípidos de membrana. Esta interacción suele ser llevada a cabo por proteínas de matriz o nucleocápside y/o glicoproteínas de membrana (Welsch y cols, 2007). En el caso de los bunyavirus no existen proteínas de matriz, por lo que interacciones entre las glicoproteínas de superficie debieran proveer toda la fuerza detrás de esta curvatura de membrana. Un estudio reciente muestra que células transfectadas con plásmidos que codifican para estas glicoproteínas de superficie (Gn y Gc) de ANDV y PUUV, producen partículas virales no infecciosas y carentes de material genético (VLP por sus siglas en inglés) (Acuña y cols, 2014) (Figura 6). El hecho de que las glicoproteínas de superficie se auto-ensamblen formando VLPs sin la presencia de otras proteínas virales sugiere que estas podrían ser suficientes en un contexto de infección para mediar la inducción de curvatura en membrana celular necesaria para dar inicio a la formación de partículas virales.

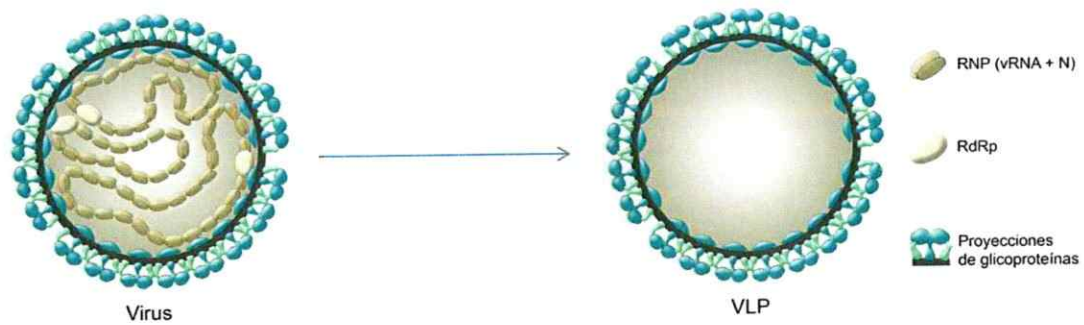


Figura 6: Comparación entre hantavirus y partículas semejantes a (hanta)virus (VLP) En células expresando el precursor proteico GPC hay formación de partículas semejantes a virus carentes de material genético viral y proteínas virales internas.

Entre otros miembros de la familia *Bunyaviridae*, el ensamblaje de partículas virales ocurre en el complejo de Golgi por su retención en este compartimiento (Ruusala y cols, 1992). (Schmaljohn y Nichol, 2007., Petteron y Melin, 1996) y es por ello que originalmente se ha asumido que este mecanismo podría ser similar para los hantavirus. Sin embargo, las glicoproteínas de ANDV, virus Hantaan (HTNV) y virus Sin Nombre (SNV) se han detectado en membrana plasmática en tiempos más tardíos, ya sea cuando estas células son infectadas con virus o cuando fueron transfectadas con plasmidios que codifican para las glicoproteínas (Cifuentes y cols, 2011. Ogino y cols, 2004. Spiropolou, 2003). Se ha sugerido además que la yemación de SNV ocurre principalmente en la membrana plasmática (Goldsmith y cols, 1995). Un reporte obtenido a partir de estudios *in vivo* de un aislado de hantavirus, HV114, indica la presencia de múltiples sitios de yemación, incluyendo el retículo endoplásmico (Xu y cols, 2007). De todas maneras, queda por determinar los sitios específicos de ensamblaje de los hantavirus en dependencia de diferentes células.

1.2.4 Gn cómo posible protector de la protonación de Gc

Existen diversos mecanismos a través de los cuáles se activa el mecanismo de fusión de las distintas proteínas de fusión de distintos virus. Estos mecanismos dependen de receptores celulares, pH, una combinación de ambos o de algún otro factor. Para el caso de ANDV, es el pH el único factor necesario para activar este mecanismo de fusión (Acuña y cols, 2015).

Cómo se mencionó anteriormente, no se sabe dónde ocurre la yemación de ANDV, pero independiente de dónde ocurra esta, es indispensable que las glicoproteínas viajen a través de la vía exocítica, ya sea insertadas en membranas de compartimientos de la vía secretoria o como partículas virales formadas. Las vesículas de la vía exocítica tienen V-ATPasas en sus membranas que permiten el paso de protones desde el medio intracelular hacia el interior de las vesículas. Estos protones acidifican el interior de las vesículas secretorias, llegando hasta pH 5.7 (Paroutis y cols, 2004). Considerando que a este pH las glicoproteínas de ANDV se activan de forma irreversible (Acuña et al., 2015), y que proteínas activadas carecen de actividad fusogénica, hace entendible por qué la infectividad de virus Tula disminuye alrededor de 100 veces cuando es tratado a pHs de entre 6.0 y 5.5. Debido a esto debe existir algún mecanismo, desconocido hasta ahora, que protege a la proteína de fusión Gc del bajo pH en la vía exocítica, previniendo de esta forma una activación prematura.

Existen otros virus en donde la fusión es también activada por bajo pH, y en los cuáles se conocen los mecanismos de protección frente a la acidez de la vía exocítica. Entre los alphavirus, virus envueltos de hebra de ARN simple de polaridad positiva, la glicoproteína E1 es una proteína de fusión clase II (Kielian, 2006), que es protegida frente

al bajo pH de la vía exocítica por la proteína E2, que es estabilizada a su vez por la proteína E3. En el caso de los flavivirus, también virus de hebra simple de ARN de hebra positiva, es la proteína pr la que protege a la proteína E de fusión, también perteneciente a la clase II (Kielian, 2006). Si se toma en consideración la similitud entre la glicoproteína Gc de los hantavirus, con las proteínas de clase II, entonces es posible que Gn cumpla el rol de protección de Gc durante la salida del virus.



Hipótesis

El ectodominio de la glicoproteína Gn del virus Andes tiene diferentes roles en la entrada y el egreso celular del virus, entre estos la localización de Gc a membrana plasmática, el ensamblaje viral y protección de la activación de la fusión de membranas por Gc .

Objetivos

Objetivo general

Estudiar qué roles cumple la glicoproteína Gn del virus Andes en la entrada y egreso del virus.

Objetivos específicos

1. Diseñar mutantes de delección de ectodominio de Gn en el contexto del precursor proteico GPC.
2. Estudiar expresión y localización a membrana plasmática de Gc junto a Gn silvestre y mutante.
3. Analizar el ensamblaje en VLPs de Gc junto a Gn silvestre o mutante.
4. Analizar la actividad fusogénica de células expresando Gc junto a Gn silvestre y mutante (*cell-cell fusion assay*).

2. Materiales y metodología

2.1 Células y anticuerpos

Células HEK 293FT (Invitrogen) fueron crecidas en medio DMEM (Gibco) suplementado al 10% con suero bovino fetal (Gibco). Células Vero E6 (línea celular derivada de aislados de células epiteliales de hígado de mono verde africano, ATCC CRL1586) fueron crecidas en medio MEM (Gibco) suplementado con piruvato (Gibco), aminoácidos esenciales (Gibco) y suero bovino fetal al 10% (Gibco). Los anticuerpos monoclonales anti-Gn 6B9/F5 (Cifuentes-Muñoz y cols, 2010) y anti-Gc 2H4/F6 (Godoy y cols, 2009) fueron previamente desarrollados en nuestro laboratorio. Se usaron también los anticuerpos comerciales anti- β -actina (Sigma-Aldrich) y anti-tag de HA (Abcam).

2.2 Diseño de mutantes

Estos mutantes de Gn consisten en deleciones de distintos tamaños desde el extremo N-terminal de la proteína Gn. Las deleciones fueron de 18 aa (péptido señal), 90 aa, 281 aa, 374 aa y 440 aa. Para preparar las deleciones de $\Delta 90$, $\Delta 281$ y $\Delta 440$ se buscó no interrumpir estructuras secundarias, para lo cuál se hicieron predicciones usando los algoritmos DPM, DSC, GOR4, HNNC, PHD, Predator, SIMPA96 y SOPM, utilizando el servicio en el sitio online de PBIL-IBCP (Combet y cols, 2000). La mutante $\Delta 374$ se diseñó posteriormente al resto de las mutantes, y se hizo en base a la estructura

obtenida por Li y colaboradores (2016). También se estimó el volumen de la zona globular distal y el tallo central de los tetrámeros de las proyecciones de las glicoproteínas, que probablemente corresponden a Gn (Figura 3 y 4), utilizando el programa UCSF Chimera (Pettersen y cols, 2004) y la densidad electrónica de las glicoproteínas obtenida por Hepojoki y cols, 2010 (Número de acceso de EMDB DataBank, EMD-1704). En todas las mutantes de delección del N-terminal de Gn, se adicionó un nuevo péptido señal de la inmunoglobulina de cadena ligera kappa de rató (*Mus musculus*) de secuencia METDTLLLWVLLLWVPGSTGD en su extremo N-terminal para reemplazar el péptido señal nativo que resultó removido. Ya que el anticuerpo 6B9/F5 para la proteína Gn fue desarrollado usando un polipéptido que abarca los 31 kDa desde el extremo N-terminal de Gn, se adicionó además del péptido de señal un tag derivado de la proteína HA de influenza, de secuencia aminoacídica YPYDVPDYA, para permitir la detección de Gn en caso de que este epítipo fuera eliminado por la delección.

2.3 Plásmidos

El plásmido pl.18/ANDV-GPC fue generado previamente en nuestro laboratorio (Cifuentes-Muñoz y cols, 2010). Este codifica GPC de ANDV bajo el promotor de citomegalovirus (CMV). Usando como base el plásmido pl.18/ANDV-GPC se desarrollaron cinco plasmidios codificantes para GPC con mutaciones en Gn mediante de novo síntesis de fragmentos codificantes para Gn y sub-clonamiento en el plasmidio pl.18/ANDV-GPC (Genscript). Los cinco plasmidios diseñados fueron nombrados Δ SP, Δ 90, Δ 281, Δ 373 y Δ 440. Estos plasmidios codificantes para Gn mutante se generaron

usando los servicios de síntesis *in vitro* y clonamiento de DNA de las empresas DNA2.0 ($\Delta 90$, $\Delta 281$ y $\Delta 440$) y Genscript (ΔSP y $\Delta 374$).

2.4 Expresión y localización a membrana plasmática de Gc y Gn silvestre y mutante

2.4.1 Detección mediante inmunofluorescencia

Para detectar a la proteína Gn mutante en células adherentes se utilizó inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-HA-tag. Para esto se sembraron $2,6 \times 10^4$ células Vero E6 en portaobjetos de 16 pocillos (*lab-tek chamber slide*, NUNC, ThermoScientific) y 24 h después fueron transfectadas con los distintos plasmidios codificantes para GPC mutante usando lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific). 24 h post-transfección las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4%, y algunas de estas fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,1% para detectar proteínas intracelularmente. Posteriormente, las células fueron incubadas con el anticuerpo anti-HA-tag a una dilución de 1:200 en SBF al 2% por 2 h a temperatura ambiente. Se lavó con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina G (IgG) de ratón conjugado a Alexa Fluor 555 (Molecular Probes) a una dilución 1:500. Finalmente se marcaron los núcleos con DAPI (Molecular Probes) y se montó con DABCO y un cubreobjetos.

2.4.2 Separación de fracciones intracelular y de superficie mediante biotilación

Se sembraron $3,8 \times 10^6$ células HEK 293FT en placas de 100 mm de diámetro y 24 horas después se transfectaron con el método de fosfato de calcio (Soneoka y cols, 1995) con 8 μg de distintos plasmidios codificantes para GPC, silvestre o mutantes. A las 48 h post-transfección se procedió a hacer una separación entre proteínas de la superficie de la membrana plasmática y proteínas intracelulares mediante el kit *Cell Surface Protein Isolation Kit* (Pierce) el cual se basa en la biotilación de las proteínas de superficie y su purificación del resto de las proteínas usando la resina Neutravidina que posee alta afinidad a la biotina, permitiendo la separación de la fracción intracelular (eludida de la columna) y la fracción de superficie (retenida en la columna). Se procedió según las instrucciones del fabricante.

2.4.3 Análisis de fracciones intracelular y de superficie

Las fracciones intracelulares y de superficie separadas fueron analizadas mediante *western blot*. Para detectar Gc se utilizó el anticuerpo 2H4/F6 (1:2000), mientras que para detectar Gn se utilizaron los anticuerpos 6B9/F5 (1:2000) y anti-HA-tag (1:1000). Como control de carga, y para corroborar que solo la fracción intracelular y no la de superficie contenía proteínas intracelulares, se utilizó el anticuerpo anti- β -actina (1:5000) de Sigma-Aldrich.

2.5 Producción de VLPs, usando GPC silvestre y nativo

Para la producción de VLPs se utilizó el protocolo establecido por Acuña et al., 2014. Para ello se sembraron células HEK 293FT que se transfectaron con el método de fosfato de calcio (Soneoka y cols, 1995). A las 48 h post-transfección se recolectó el sobrenadante de las células y se prepararon los lisados celulares. Se concentraron las partículas mediante ultra-centrifugación a 134.000 g (28.000 rpm), y se analizó la presencia de VLPs mediante *western blot* (ver arriba).

2.6 Análisis de actividad fusogénica mediada por Gc en presencia de Gn silvestre o mutante.

La actividad de fusión de Gc en presencia de Gn silvestre o mutante fue medida con el ensayo de fusión célula-célula adaptado previamente por Cifuentes-Muñoz y col. (2011). Este ensayo está basado en la formación de células multinucleadas denominadas sincicios. Estas se forman mediante la fusión de las membranas plasmáticas entre células vecinas promovida por la proteína de fusión viral Gc anclada en la superficie celular y activada por exposición a bajo pH.

Para ello, se sembraron $2,6 \times 10^4$ células Vero E6 en portaobjetos de 16 pocillos (*lab-tek chamber slide*, NUNC, ThermoScientific) que se transfectaron con los plásmidos que codifican las proteínas GPC silvestre y mutantes usando lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific). 24 h post-transfección se gatilló la activación de la proteína de fusión incubando las células con medio MEM a pH 5,5 por 5 min a 37°C. 3 h después de la exposición a bajo pH, se incubó con 1 μ M de CMFDA (Molecular Probes) en DMEM por 1 h a 37°C y se fijaron las células con paraformaldehído al 4%. Luego se permeabilizó

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

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

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

3. Resultados

3.1 Diseño de mutantes de ectodominio de Gn de ANDV

Se diseñaron cinco mutantes de delección para el ectodominio de Gn; Δ SP, Δ 90, Δ 281, Δ 374 y Δ 440, comenzando Gn en los residuos M19, D91, G282, K375 y Q441, respectivamente, tomando como referencia la secuencia encontrada en la base de datos de NCBI usando el código de acceso AY228238 (Tischler et al., 2003). En todos los casos se adicionó un péptido señal derivado de la inmunoglobulina kappa murina, cómo reemplazo por el péptido señal delecionado. También se adicionó un HA-tag para poder detectar la proteína, ya que el epítipo del anticuerpo usado (6B9/F5) para detectar Gn se encuentra en la región N-terminal de Gn (Figura 7)

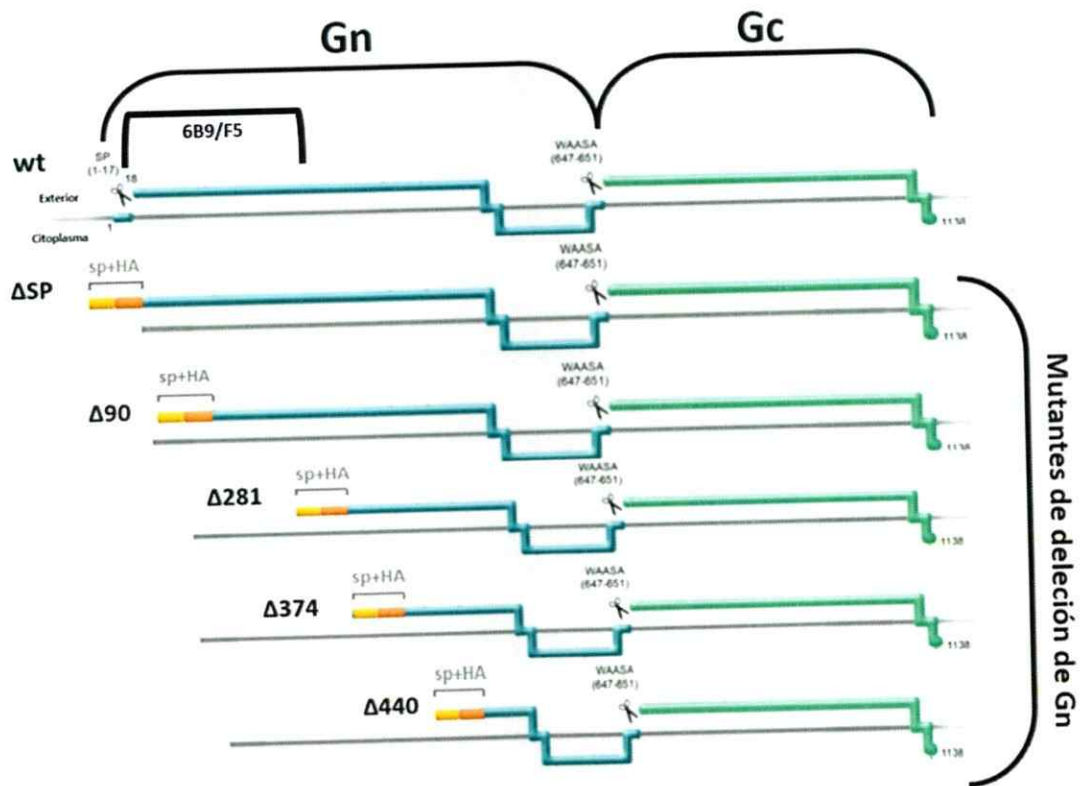


Figura 7: Esquema de GPC, representando la secuencia de Gn silvestre y mutantes junto a Gc: Se indica el sitio de procesamiento proteolítico WAASA, donde GPC es cortado para formar Gn y Gc. De colores amarillo y naranja se representan el péptido señal (sp) derivado de la inmunoglobulina kappa murina, y el HA-tag, respectivamente. Además, se indica la región del inmunógeno de Gn utilizado para la obtención del anticuerpo monoclonal 6B9/F5 (Godoy et al., 2009).

3.2 Expresión y localización de Gn silvestre y mutante

Para evaluar la expresión de Gn de los distintos mutantes se transfectaron células con los distintos plasmidios codificantes para las glicoproteínas silvestre o mutantes y a las 48 h post-transfección se lisaron las células y fueron evaluados mediante ensayo de *western blot* (Figura 8).

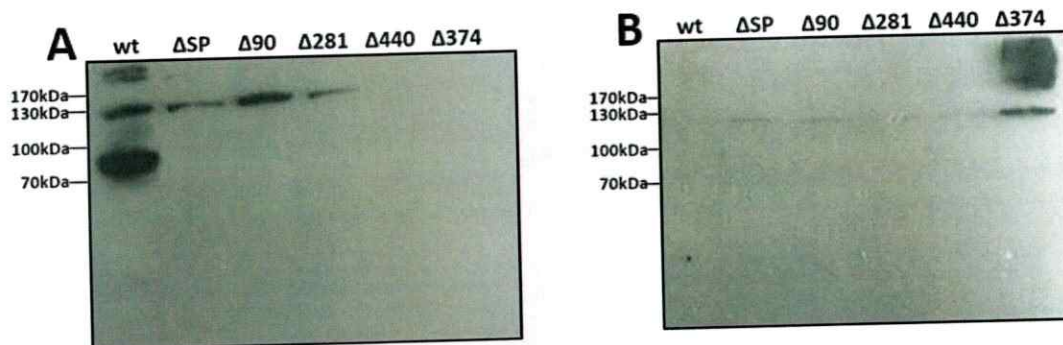


Figura 8: Expresión de Gc y Gn silvestre y mutantes. Análisis mediante *western blot* de lisados celulares. Se detectó Gn utilizando el anticuerpo anti Gn 6B9/F5 (A) y anti-HA-tag (B).

Se esperaba detectar Gn de la mutante Δ SP en el peso molecular aproximado de 70kDa de la proteína silvestre, sin embargo se puede observar que el monómero de Gn de peso molecular cercano a 70kDa fue detectado únicamente con Gn silvestre al utilizar el anticuerpo monoclonal 6B9/F5 (Figura 8A). Tampoco se detectaron las mutantes Δ 90, Δ 281, Δ 374 y Δ 440 en los pesos moleculares esperados correspondientes según su deleción a 61 kDa, 38 kDa, 26kDa y 20kDa aproximadamente. En cambio, se detectó al igual que en Gn silvestre, una banda de menor intensidad de aproximadamente 130 kDa para las mutantes Δ SP, Δ 90, Δ 281 y Gn silvestre usando el anticuerpo monoclonal 6B9/F5. Este anticuerpo se desarrolló utilizando un fragmento del N-terminal de Gn de aproximadamente 31 kDa, o cerca de 260 aminoácidos. Por lo tanto, la detección de esta banda con la mutante Δ 281, que no comparte secuencias con el fragmento utilizado en

la producción de 6B9/F5, indica que esta banda corresponde a inespecificidad del anticuerpo. Esto además coincide con el peso molecular constante de aproximadamente 130 kDa de esta banda para los mutantes independientemente del tamaño de las deleciones de las mutantes. Por lo tanto, la presencia de esta banda no permite una interpretación sobre la expresión de Gn. Por ello, se usó el anticuerpo monoclonal contra el HA-tag que detectó también una tenue banda de aproximadamente 130 kDa para todos los mutantes independiente de su peso molecular (Figura 8B). Por la ausencia de reactividad específica del anti-HA por western blot, se procedió a analizar si el anti-HA tag reconoce Gn en condiciones nativas. Para ello se utilizó en forma alternativa un ensayo de inmunofluorescencia indirecta para observar Gn intracelularmente y en la superficie de las células (Figura 9). Para esto se transfectaron células Vero E6 y 48 h después, se fijaron y se marcaron núcleos (DAPI, azul) y glicoproteína Gn (anti-HA y anti-IgG-Alexa 555, rojo). No se utilizó el anticuerpo anti-Gn 6B9/F5 para la detección de Gn ya que este anticuerpo sólo reconoce Gn solo intracelularmente (datos obtenidos previamente en el laboratorio), además de que algunas de las mutantes potencialmente carecen del epítipo de este anticuerpo. Se prepararon células transfectadas permeabilizadas y no permeabilizadas, con tal de marcar proteínas intracelulares o sólo de superficie. La glicoproteína Gn con el tag de HA fue detectada mediante inmunofluorescencia intracelularmente para todas las mutantes de deleción, con excepción de la mutante $\Delta 440$ (Figura 9). Cuando se analizaron las células no permeabilizadas, donde solo se marcan proteínas de superficie, se pudo observar Gn para todas las mutantes con excepción de la $\Delta 440$. La falta de Gn intracelularmente para la mutante $\Delta 440$ podría indicar que deleciones de 440 aminoácidos o más causan problemas de plegamiento de la proteína y esta es degradada rápidamente. Estos resultados indican que por lo menos para las mutantes ΔSP , $\Delta 90$, $\Delta 281$ y $\Delta 374$, la

glicoproteína Gn está siendo expresada y traficada a membrana plasmática, a pesar de que no se pudo detectar mediante ensayo de *western blot*. Esto indica que falta de detección de Gn mutantes podría estar relacionado con el plegamiento o agregamiento de Gn en un ambiente extra-celular, es decir, después de que las células sean lisadas.

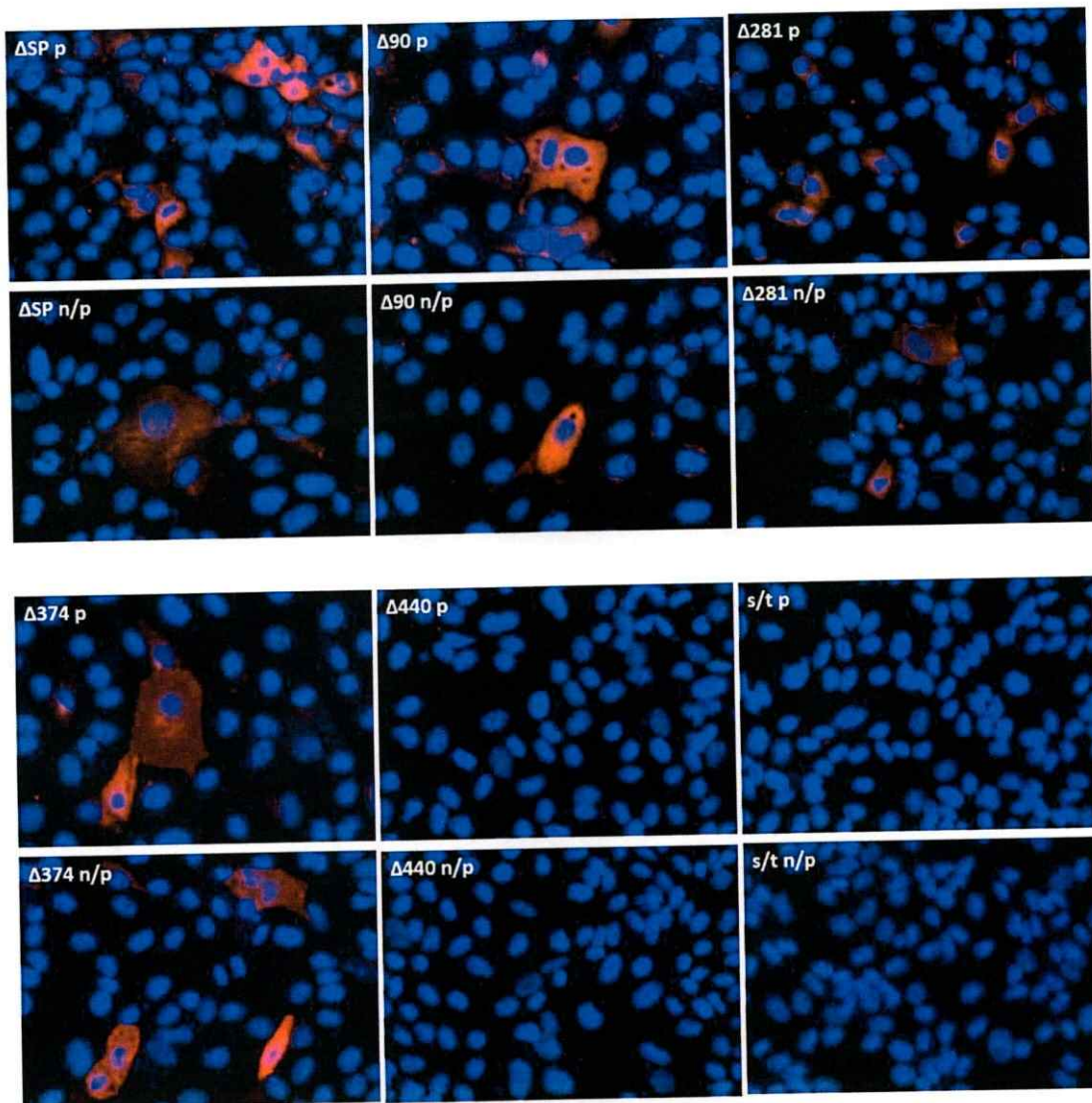


Figura 9: Detección de Gn mutante en membrana plasmática mediante ensayo de inmunofluorescencia indirecto. Células transfectadas con los mutantes Δ SP, Δ 90, Δ 281, Δ 374, Δ 440 y no transfectadas (s/t) fueron marcadas con anticuerpo anti-HA no permeabilizadas (n/p) y permeabilizadas (p). Núcleo, DAPI (azul) y Gn-HA, Alexa-555 (rojo). Magnificación 200X.

3.3 Expresión y localización de Gc, en presencia de Gn silvestre y mutante

Se buscó determinar si Gc es expresada y si localiza a membrana plasmática al expresarse con las distintas mutantes de delección de Gn. Para ello, 48 hrs post-transfección se biotinilaron las proteínas de superficie celular y se separaron de las proteínas intracelulares utilizando una resina de neutravidina, un derivado de la proteína avidina que posee una alta afinidad por biotina. Luego de la separación, se verificó la presencia de β -actina y Gc en cada fracción (Figura 10) mediante *western blot*.

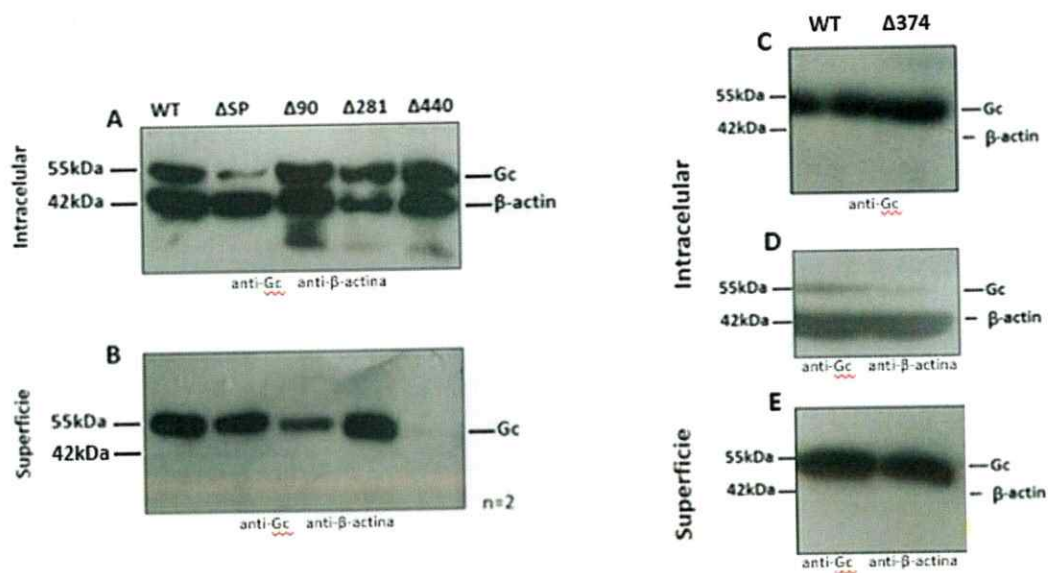


Figura 10: Expresión de Gc en presencia de Gn silvestre o mutante y detección de Gc en la membrana plasmática

A) Detección de Gc en fase intracelular de células transfectadas con GPC silvestre y los mutantes, Δ SP, Δ 90, Δ 281 y Δ 440. **B)** Detección de Gc en fase de membrana celular de GPC silvestre, Δ SP, Δ 90, Δ 281 y Δ 440. **C)** Detección intracelular de Gc silvestre y Δ 374. **D)** Detección intracelular de β -actina. **E)** Detección de Gc silvestre y Δ 374 en fase de superficie. Se utilizó β -actina como un control de carga y como control negativo de presencia de proteínas intracelulares.

La glicoproteína Gc se logró detectar en la fase intracelular para todas las mutantes de delección de Gn, así como cuando se expresa GPC silvestre en el peso molecular esperado de alrededor de 55 kDa. Respecto a la localización de Gc a membrana plasmática se puede observar que Gc al co-expresarse con Gn silvestre y todas las mutantes de Gn, con excepción de la mutante $\Delta 440$. Esto parece indicar una posible dependencia de Gc sobre la delección de más de 374 aminoácidos del ectodominio de Gn en el tráfico por la ruta secretoria.

3.4 Ensamblaje de Gc y Gn silvestre y mutante en VLPs

Se analizó si las glicoproteínas de ANDV forman VLPs cuando se expresa Gc junto a delección en el ectodominio de Gn. Para ello, se recolectaron sobrenadantes de células transfectadas con GPC silvestre o los distintos mutantes de Gn a las 48 h post-transfección. Se determinó mediante *western blot* la presencia de VLPs en los sobrenadantes y lisados celulares (Figura 11).



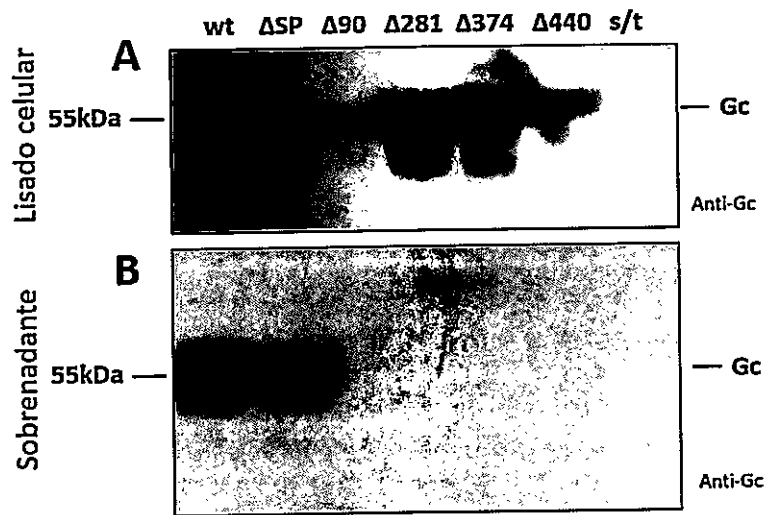


Figura 11: Formación de VLPs en células transfectadas con GPC silvestre y mutantes de delección de Gn (A) Lisado de células transfectadas con GPC nativo con cada uno de los mutantes. Se puede observar la presencia de Gc en todos los mutantes. **(B)** Sobrenadante obtenido de las mismas células mostradas en (A). Sobrenadante cargado obtenido a las 48 h post-transfección.

En la figura se puede observar que células transfectadas con GPC silvestre y con el mutante Δ SP producen VLPs, mientras que el resto de los mutantes de delección no producen glicoproteínas que se ensamblan en partículas virales. La presencia de VLPs en sobrenadantes de células transfectadas con Δ SP indica que la falta de ensamblaje de partículas virales en el caso del resto de las proteínas mutantes, no está relacionado con la presencia del tag de HA ni el cambio del péptido de señal de Gn. El hecho de que las glicoproteínas mutantes, con excepción de Δ 440, localicen a membrana plasmática (Figuras 8 y 9), pero sin embargo no permitan la formación de VLPs pareciera indicar que existe algún tipo de función del ectodominio de Gn directamente relacionado con la formación partículas virales, ya que no parecen haber defectos en el tráfico o plegamiento de las proteínas.

3.5 Actividad fusogénica

Ya que Gn y Gc de ANDV localizan a membrana plasmática para todos los mutantes con excepción de $\Delta 440$, se analizó la actividad fusogénica de estas, evaluando si pueden inducir la fusión de membranas plasmáticas al exponerlas al bajo pH.

Para ello, se procedió a medir la actividad fusogénica de Gc-Gn silvestre y de cada mutante con un ensayo de fusión célula-célula basado en la formación de células multinucleadas, o sincicios. Esto fue identificado utilizando tres fluoróforos, marcando el citoplasma celular (CMFDA, verde), el núcleo de las células (DAPI, azul) y Gc (anti-Gc, anti-IgG-Alexa 555, rojo) (Cifuentes-Muñoz y cols, 2011).

Células Vero E6 fueron transfectadas y 24 h post-transfección fueron expuestas a bajo pH con el fin de activar la proteína de fusión Gc. Posteriormente fueron fijadas y permeabilizadas, con tal de permitir el paso de anticuerpos a través de la membrana plasmática. La identificación de los sincicios fue llevada a cabo por microscopia de epifluorescencia (Figura 12).

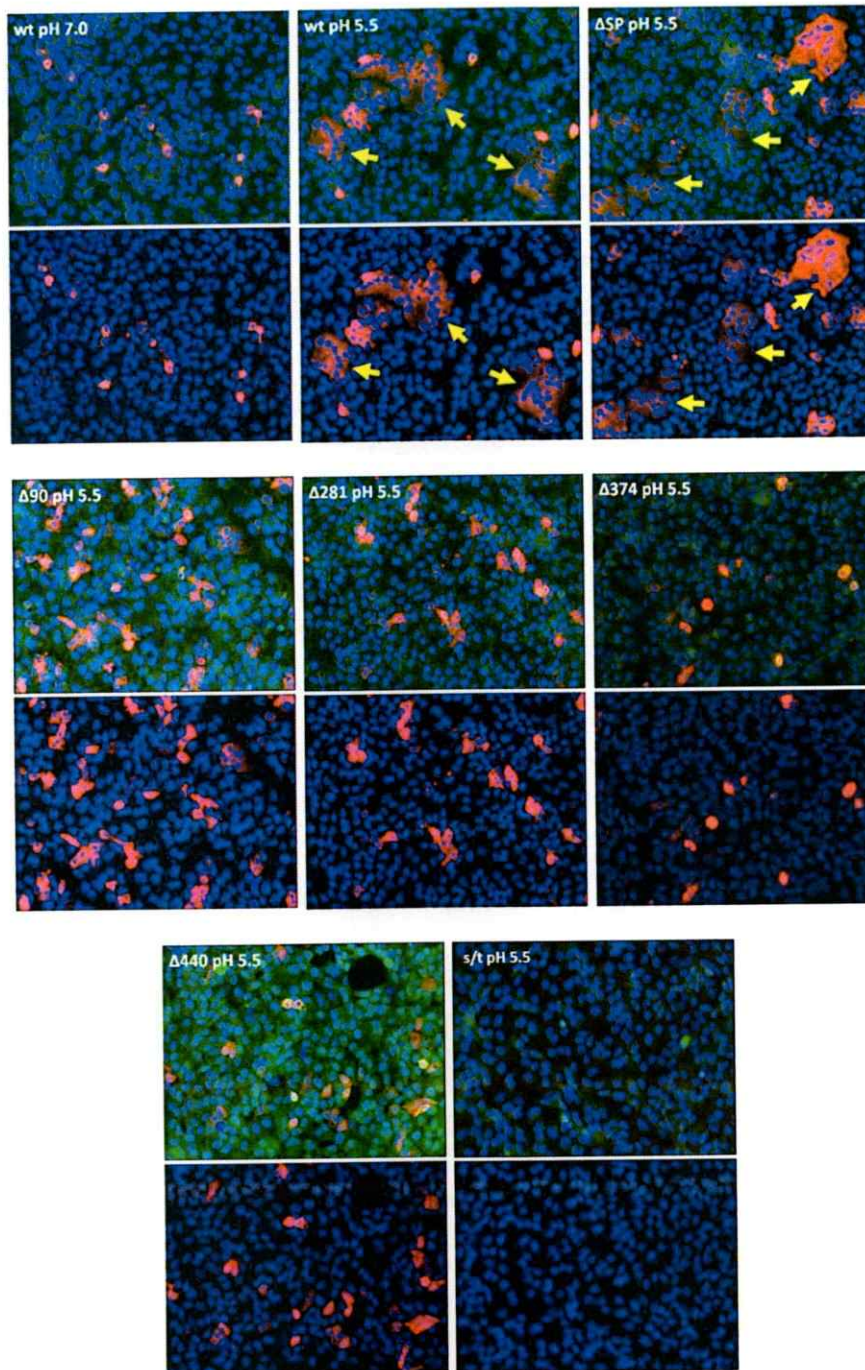


Figura 12 Actividad de fusión por Gc y Gn silvestre y mutante. Células Vero E6 expresando Gn silvestre o mutantes fueron expuestas a bajo pH y se analizó la formación de sincicios (flechas amarillas) mediante microscopía de fluorescencia. Citoplasma, CMFDA (verde); núcleo, DAPI (azul) y Gc, alexa-555 (rojo). Sincicio indicados con flechas amarillas. Imágenes en duplicado, con y sin marcaje de citoplasma. Magnificación 200X.

Se pudo observar a través del ensayo que sólo el mutante Δ SP forma sincicios al exponerse a bajo pH, a pesar de que Gc y Gn de los mutantes Δ 90, Δ 281 y Δ 374 localizan a la membrana plasmática. Esto se ve reflejado en la cuantificación de la actividad de fusión, en dónde se puede ver que Δ 90, Δ 281, Δ 374 y Δ 440 no tienen actividad de fusión más allá de lo esperado cómo error basal producido por el conteo de células binucleadas producto de división celular. (Figura 13)

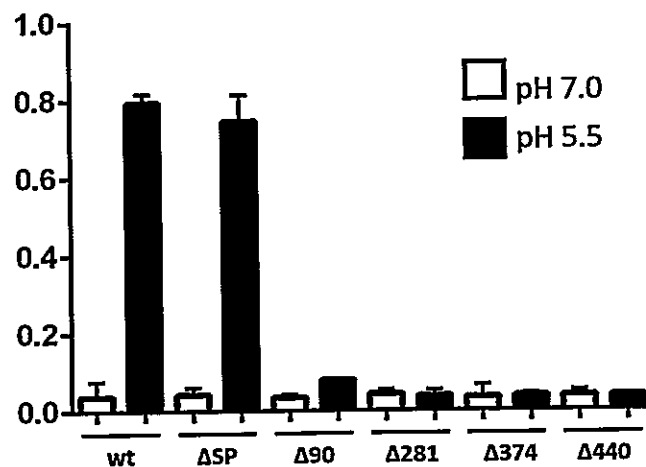


Figura 13: Cuantificación de fusión mediada por Gc y Gn silvestre y mutante. Se contó el número de células y núcleos en al menos tres campos de microscopía para cada muestra a cada pH analizado. El índice de fusión se calculó con la fórmula $[1 - n^\circ \text{ de células} / n^\circ \text{ de núcleos}]$ y se graficó como porcentaje, correspondiendo el índice de fusión de Gc silvestre al 100%.

Estos resultados sugieren que, aunque deleciones considerables de Gn no impiden la localización de Gc a la membrana plasmática, inactivan el proceso de fusión.

4. Discusión

Las glicoproteínas de hantavirus cumplen diversos roles en el ciclo replicativo viral. Estas funciones van desde la unión de viriones a células, entrada del virus a la célula, tráfico por la vía secretoria y ensamblaje de las partículas virales, por decir algunos. Sin embargo, aún no se conoce cómo las glicoproteínas participan en muchos de estos procesos, siendo estos fundamentales para el ciclo infeccioso del virus. Entender cómo ocurren estos mecanismos, y cómo participan estas glicoproteínas en ellos es esencial para tener una mayor comprensión del virus, ya sea con el fin de buscar terapias o vacunas para las enfermedades que causa; el desarrollo de nuevas biotecnologías relacionadas con la maquinaria viral; o el entendimiento detrás de los mecanismos de entrada y salida de los virus.

En este seminario de título se buscó entender en mayor medida los roles que cumple el ectodominio de la glicoproteína Gn, en particular que funciones tiene en los procesos de fusión, localización a membrana plasmática y formación de partículas virales. Esto se hizo mediante deleciones del SP, 90, 281, 374 y 440 aminoácidos desde el extremo N-terminal de los aproximadamente 634 aminoácidos totales de Gn.

4.1 Expresión y localización de Gn mutante

Debido a las dificultades para detectar Gn en *western blot* se utilizó inmunofluorescencia para estudiar la expresión y localización de esta proteína. Mediante esta aproximación se pudo determinar que la proteína Gn para las mutantes Δ SP, Δ 90, Δ 281 y Δ 374 se acumula intracelularmente y localiza a membrana plasmática, a pesar

de que no pudo detectarse mediante *western blot* para los pesos moleculares esperados. La causa detrás de esta diferencia aún no es conocida, pero se relaciona probablemente con las condiciones más nativas del ensayo de inmunofluorescencia.

Se determinó que Gn de la mutante $\Delta 440$ no localiza a membrana plasmática ni se acumula intracelularmente. Esto podría indicar que deleciones de 440 aminoácidos producen problemas de plegamiento de Gn y por ende su degradación proteosomal por autofagia.

Tomando en cuenta la estructura parcial del ectodominio de Gn obtenida por Li y colaboradores (2016) (Figura 4B), se puede observar que las mutantes $\Delta 90$ (corte entre hojas $\beta 4$ y $\beta 5$) y $\Delta 281$ (corte entre hélice $\alpha 5$ y hoja $\beta 16$) interrumpen estructuras secundarias de la proteína. El diseño de las mutantes (con la excepción de $\Delta 374$) se hizo con anterioridad a la publicación de esta estructura, por lo que no se conocían con detalle estas estructuras secundarias. Para la mutantes $\Delta 374$, la deleción comprende la estructura parcial obtenida por Li y colaboradores en su entereza, mientras que en $\Delta 440$ se deleccionó esta estructura y cerca de 65 residuos más, los que presuntamente podrían ser parte del "tallo central" de Gn. Si se asume que la estructura parcial de Gn obtenida por Li y colaboradores corresponde a un dominio proteico de la proteína, entonces es posible que la mutante $\Delta 374$ sea la mutante en la que se ven interrumpidas en menor medida estructuras secundarias. Esto podría indicar que los problemas de detección de Gn mediante *western blot* no se debe a plegamientos aberrantes producto de interrupción de estructuras secundarias, sino que la causa sería otra. Las estructuras que posiblemente resultan de las mutantes de deleción de Gn se pueden observar representadas en la Figura 14.

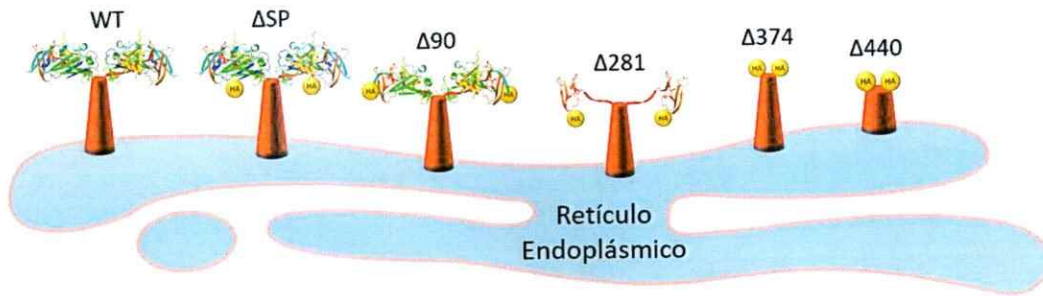


Figura 14: Representación esquemática bidimensional de las posibles estructuras de los distintos mutantes. Cada proyección representa un tetrámero de ectodominios de Gn, pero que para mayor visibilidad sólo se representaron aquí mediante dímeros en cada representación. Esferas amarillas representan el HA-tag. El cilindro rojo representa la región pre-transmembrana o tallo central de un tetrámero de Gn.

4.2 Expresión y localización de Gc al co-expresar con Gn mutante

En el caso de la proteína Gc, fue posible detectarla mediante ensayo de *western blot* dentro de los pesos moleculares esperados al co-expresarse con los diferentes mutantes de Gn. Esta localizó a membrana plasmática para todos los mutantes de delección, con la excepción de la mutante $\Delta 440$, en la cual Gc fue detectada intracelularmente, pero no en la superficie de células transfectadas.

Cómo antecedente se ha descrito que interacciones entre Gn y Gc son necesarias para el tráfico de estas glicoproteínas (Lappin y cols, 1994. Ruusala y cols, 1992. Deyde y cols, 2005), por lo que es esperable que la carencia de estas interacciones dem cómo resultado interrupciones en el tráfico. Si la mutante $\Delta 440$ es degradada no se analizó, sin embargo la presencia de Gc, que se expresa en conjunto con esta mutante de Gn, indica que ambas proteínas fueron sintetizadas como precursora.

Las glicoproteínas Gn y Gc forman proyecciones hetero-oligómeros de simetría aparentemente tetramérica (Huisken y cols, 2010. Hepojoki y cols, 2010, Battisti y cols, 2011), en las cuáles se puede distinguir un tallo periférico que podría corresponder a Gc (Li y cols, 2016) (Figura 3). Este tallo periférico pareciera insertarse en la región entre el dominio globular distal de Gn y su tallo central. Esto posiblemente indicaría que existe una interacción entre esta región de Gn y alguna de las horquillas de fusión de Gc (Guardado-Calvo et al., in press). Esta región de Gn, aproximadamente en la posición T380, aún permanece en todos los mutantes, con la excepción de $\Delta 440$. Por ello, el hecho que todos los mutantes de Gn, excepto $\Delta 440$, trafican a membrana plasmática apoyan este posible modelo de interacción de Gn y Gc. Más experimentos en dónde se hagan mutaciones específicas del *loop* de fusión de Gc o de la posible región próxima de Gn serían necesarios para probar este modelo de interacción más específicamente.

4.3 Formación de partículas virales con Gn silvestre y mutante

Se evaluó si las proteínas mutantes se ensamblan en VLPs, para estudiar cómo participa el ectodominio de Gn en los procesos relacionados con la formación de partículas virales. Debido a que sólo el mutante ΔSP permitió su ensamblaje en VLPs, se puede descartar el péptido señal utilizado y al HA-tag como los causantes de la falta de producción de VLPs. Se ha descrito en la literatura que en flavivirus (Allison y cols, 2005) y coronavirus (Vennema y cols, 1996), la curvatura de membrana necesaria para la formación de partículas virales es generada por interacciones laterales de las proyecciones en la superficie viral, las cuales generan una curvatura positiva en la



membrana suficiente para generar la yemación de partículas virales (Welsch y cols, 2007).

Un mecanismo similar podría ocurrir en los hantavirus, ya que de forma similar a flavivirus y coronavirus, la introducción de la curvatura para la formación de partículas virales parece depender exclusivamente de la acción de las glicoproteínas (Acuña y cols, 2014). Es posible que una interacción entre las distintas proyecciones tetraméricas sea necesaria, interacciones que podrían verse interrumpidas con deleciones parciales de Gn.

Existe otra explicación posible de la falta de ensamblaje de partículas virales para los mutantes $\Delta 90$, $\Delta 281$ y $\Delta 374$. Se ha descrito que en mutaciones que exponen el péptido de fusión de flavivirus (Zheng y cols, 2010) y alphavirus (Uchime y cols, 2013) a pHs ácidos durante la vía secretoria, es bloqueado el tráfico de glicoproteína de virus a membrana plasmática y también la formación de partículas virales. Esto se debe a una activación prematura del mecanismo de fusión, que tanto para los alpha-, flavi- y hantavirus induce una trimerización irreversible de Gc (Zheng y cols 2010; Uchime y cols 2013, Acuña y cols, 2015). Es posible por lo tanto que las deleciones de Gn $\Delta 90$, $\Delta 281$ y $\Delta 374$ generen una pre-activación debido a la exposición a bajo pH de Gc, induciendo un re-arreglo conformacional y des-ensamblaje de los complejos Gn/Gc, que serían necesarios para la formación de VLPs. Si este fuese el caso, la activación prematura debido a la acidificación de la vía exocítica no sería suficiente para impedir el tráfico hacia la membrana plasmática, pero si para impedir la formación de VLPs Si esto es correcto indicaría que la generación de una curvatura de membrana suficiente para la yemación es dependiente no solo de la presencia de Gn y Gc en la membrana, si no de su conformación y estado oligomérico. Esto estaría de acuerdo con el modelo planteado

por Welsch y cols que indica que la yemación es dependiente de una suma de "fuerzas" de las proteínas involucradas y que por lo tanto es dependiente de su organización y orientación respecto a la membrana.

4.4 Actividad fusogénica de Gc al expresarla con Gn silvestre y mutante

Se midió la actividad fusogénica de las glicoproteínas mutantes y silvestre a través de un ensayo de fusión celular. A pesar de que los mutantes Δ SP, Δ 90, Δ 281 y Δ 374 se encontraron en membrana plasmática, sólo la mutante Δ SP mostró actividad de fusión (Figura 12), con niveles cercanos a lo de GPC silvestre (Figura 13). Estos resultados refuerzan la idea que la pre-activación de Gc inhibiría la formación de partículas virales, y en este caso, también la actividad fusogénica de las glicoproteínas. Debido a que la activación de Gc por pH ácido que re-arregla las proyecciones tetraméricas para formar los trímeros post-fusión es irreversible (Acuña y cols, 2015), entonces es consistente que glicoproteínas que pasan por este proceso en la vía exocítica no sean ensambladas en partículas virales ni tengan actividad de fusión.

En un futuro sería importante determinar por qué motivo las mutantes Δ 90, Δ 281 y Δ 374 no forman partículas virales ni tienen actividad de fusión. Una forma de estudiar la posibilidad de la pre-activación de Gc debido a la acidificación en la vía exocítica sería utilizando drogas inhibitorias de la V-ATPasas responsables de esta disminución de pH, como se ha hecho en estudios con alphavirus (Uchime y cols, 2013), tales como bafilomicina A1 (Yoshimori y cols, 1991) y cloruro de amonio (Neblock y cols, 1992), con

el fin de determinar si ocurre una recuperación de fenotipo normal. Otra forma de estudiar si la proteína Gc que localiza a membrana plasmática en el caso de los mutantes $\Delta 90$, $\Delta 281$ y $\Delta 374$ ha sido pre-activada, sería mediante un ensayo de biotinylation de células previamente expuestas a tripsina. Se ha descrito que a diferencia de la conformación de Gc pre-fusión, el trímero post-fusión de Gc es resistente a tripsina (Acuña y cols, 2015), de forma que tratando células transfectadas con una solución con tripsina revelaría si Gc se encuentra acumulada en la membrana plasmática en un estado post-fusión o no.

5. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- El péptido señal de Ig kappa murina y el tag de HA en el extremo N-terminal utilizados en las mutantes de delección de Gn no afectan la expresión, localización, ensamblaje en VLPs ni el índice de fusión de las glicoproteínas.
- Delecciones de 440 residuos en Gn de ANDV detienen la localización hacia membrana plasmática de las glicoproteínas y Gn se vuelve indetectable mediante los ensayos utilizados.
- En todos los casos estudiados, es decir delecciones de hasta 440 aminoácidos del extremo N-terminal de Gn, Gc es detectada intracelularmente.
- Delecciones de 90 aminoácidos o más desde el extremo N-terminal de Gn detienen el ensamblaje de partículas virales.
- Delecciones de 90 aminoácidos o más desde el extremo N-terminal de Gn inhiben la actividad de fusión de las glicoproteínas de ANDV

En su conjunto, estos resultados indican que el ectodominio de Gn de ANDV tiene diversos roles en la entrada y la salida del virus, y forman las bases para entender en futuros estudios cómo Gn está involucrada en estos mecanismos.

6. Bibliografía

- Acuña, R., Cifuentes-Muñoz, N., Márquez, C. L., Bulling, M., Klingström, J., Mancini, R., Lozach, P.Y., Tischler, N. D. (2014). Hantavirus Gn and Gc glycoproteins self-assemble into virus-like particles. *Journal of Virology*, 88(4), 2344–8.
- Acuña, R., Bignon, E. A., Mancini, R., Lozach, P. Y., & Tischler, N. D. (2015). Acidification triggers Andes hantavirus membrane fusion and rearrangement of Gc into a stable post-fusion homotrimer. *Journal of General Virology*, 96(11), 3192–3197
- Allison, S. L., Schalich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W., Kunz, C., & Heinz, F. X. (1995). Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *Journal of Virology*, 69(2), 695–700.
- Battisti, A. J., Chu, Y.-K., Chipman, P. R., Kaufmann, B., Jonsson, C. B., & Rossmann, M. G. (2011). Structural studies of Hantaan virus. *Journal of Virology*, 85(2), 835–41.
- Buranda, T., Swanson, S., Bondu, V., Schaefer, L., Maclean, J., Mo, Z., Wycoff, K., Belle A., Hjelle, B. (2014). Equilibrium and kinetics of Sin Nombre hantavirus binding at DAF/CD55 functionalized bead surfaces. *Viruses*, 6(3), 1091–111.
- Choi, Y., Kwon, Y.-C., Kim, S.-I., Park, J.-M., Lee, K.-H., & Ahn, B.-Y. (2008). A hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome requires gC1qR/p32 for efficient cell binding and infection. *Virology*, 381(2), 178–83.
- Cifuentes-Muñoz, N., Barriga, G. P., Valenzuela, P. D. T., & Tischler, N. D. (2011). Aromatic and polar residues spanning the candidate fusion peptide of the Andes virus Gc protein are essential for membrane fusion and infection. *The Journal of General Virology*, 92(Pt 3), 552–63.
- Combet C., Blanchet C., Geourjon C. & Deléage G. (2000). NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *TIBS*, 25(3):147-150. https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_seccons.html
- Deyde, V. M., Rizvanov, A. a, Chase, J., Otteson, E. W., & St Jeor, S. C. (2005). Interactions and trafficking of Andes and Sin Nombre Hantavirus glycoproteins G1 and G2. *Virology*, 331(2), 307–15.
- Gavrilovskaya, I. N., Shepley, M., Shaw, R., Ginsberg, M. H., & Mackow, E. R. (1998). beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 7074–9.
- Geimonen, E., Fernandez, I., Gavrilovskaya, I. N., & Mackow, E. R. (2003). Tyrosine residues direct the ubiquitination and degradation of the NY-1 hantavirus G1 cytoplasmic tail. *Journal of Virology*, 77(20), 10760–10868.

- Goldsmith, C. S., Elliott, L. H., Peters, C. J., & Zaki, S. R. (1995). Ultrastructural characteristics of Sin Nombre virus, causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. *Archives of Virology*, 140(12), 2107–2122.
- Hepojoki, J., Strandin, T., Vaheri, A., & Lankinen, H. (2010). Interactions and oligomerization of hantavirus glycoproteins. *Journal of Virology*, 84(1)
- Hjelle, B. (2002). Vaccines against hantaviruses. *Expert Review of Vaccines*, 1(3), 373–84
- Huiskonen, J. T., Hepojoki, J., Laurinmäki, P., Vaheri, A., Lankinen, H., Butcher, S. J., & Grünewald, K. (2010). Electron cryotomography of Tula hantavirus suggests a unique assembly paradigm for enveloped viruses. *Journal of Virology*, 84(10), 4889–4897.
- Hussein, I. T. M., Cheng, E., Ganaie, S. S., Werle, M. J., Sheema, S., Haque, A., & Mir, M. a. (2012). Autophagic clearance of Sin Nombre hantavirus glycoprotein Gn promotes virus replication in cells. *Journal of Virology*, 86(14), 7520–9.
- Jin, M., Park, J., Lee, S., Park, B., Shin, J., Song, K.-J., Ahn T.-I., Hwang S.-Y., Ahn B.-Y., Ahn, K. (2002). Hantaan Virus Enters Cells by Clathrin-Dependent Receptor-Mediated Endocytosis. *Virology*, 294(1), 60–69.
- Jolly, C. L., & Sattentau, Q. J. (2013). Attachment factors. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 790, pp. 1–23).
- Kaur, J., & Bachhawat, A. K. (2009). A modified Western blot protocol for enhanced sensitivity in the detection of a membrane protein. *Analytical Biochemistry*, 384(2), 348–349.
- Kielian, M., & Rey, F. a. (2006). Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(1), 67–76.
- Kikkert, M., Verschoor, A. D., Kormelink, R., Rottier, P., & Goldbach, R. W. (2001). Tomato Spotted Wilt Virus Glycoproteins Exhibit Trafficking and Localization Signals That Are Functional in Mammalian Cells. *Journal of Virology*, 75(2), 1004–1012.
- Krautkramer, E., Zeier, M., & Plyusnin, A. (2012). Hantavirus infection: an emerging infectious disease causing acute renal failure. *Kidney International*, 83(1), 23–27.
- Lappin, D. F., Nakitare, G. W., Palfreyman, J. W., & Elliott, R. M. (1994). Localization of Bunyamwera bunyavirus G1 glycoprotein to the Golgi requires association with G2 but not with NSm. *Journal of General Virology*, 75(1994), 3441–3451.
- Li, S., Rissanen, I., Zeltina, A., Pybus, O. G., Huiskonen, J. T., Hepojoki, J., Raghvani, J., Harlos, K., Bowden, T. A. (2016). Report A Molecular-Level Account of the Antigenic Report A Molecular-Level Account of the Antigenic Hantaviral Surface. *Cell Reports*, (15), 1–9.
- Lober, C., Anheier, B., Lindow, S., Klenk, H. D., & Feldmann, H. (2001). The Hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA. *Virology*, 289(2), 224–9.

- Martinez, V. P., Bellomo, C., San Juan, J., Pinna, D., Forlenza, R., Elder, M., & Padula, P. J. (2005). Person-to-person transmission of Andes virus. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1848–1853.
- Martinez-Valdebenito, C., Calvo, M., Vial, C., Mansilla, R., Marco, C., Palma, R. E., Vial P.A., Valdivieso F., Mertz G., Ferrés, M. (2014). Person-to-person household and nosocomial transmission of andes hantavirus, Southern Chile, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, 20(10), 1629–1636.
- Mertz, G. J., Hjelle, B., Crowley, M., Iwamoto, G., Tomicic, V., y Vial, P. a. (2006). Diagnosis and treatment of new world hantavirus infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19(5), 437–42.
- Mir, M. A., & Panganiban, A. T. (2004). Trimeric hantavirus nucleocapsid protein binds specifically to the viral RNA panhandle. *Journal of Virology*, 78(15), 8281–8.
- Murua, R. (1999). Hantavirus en Chile : los mastozoólogos como un grupo ocupacional de riesgo epidemiológico. *Revista Chilena de Historia Natural*, 72, 7–12.
- Neblock, D. S., & Berg, R. A. (1982). Lysosomotropic agents ammonium chloride and chloroquine inhibit both the synthesis and secretion of procollagen by freshly isolated embryonic chick tendon cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 105(3), 902–908.
- Ogino, M., Yoshimatsu, K., Ebihara, H., Lee, B., Okumura, M., Arikawa, J., & Araki, K. (2004). Cell Fusion Activities of Hantaan Virus Envelope Glycoproteins Cell Fusion Activities of Hantaan Virus Envelope Glycoproteins. *Journal of Virology*, 78(19), 10776–10782.
- Pavletic B., C. (2000). Hantavirus: Su distribución geográfica entre los roedores silvestres de Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 17(3), 186–196.
- Petterson EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004 Oct;25(13):1605-12.
- Petterson, R., Melin, L. Synthesis, assembly and intracellular transport of bunyaviridae membrane proteins. In *The Bunyaviridae*; Elliott, R.M., Ed.; Plenum Press: New York, NY, USA, 1996; pp. 159–188.
- Ramanathan, H. N., & Jonsson, C. B. (2008). New and Old World hantaviruses differentially utilize host cytoskeletal components during their life cycles. *Virology*, 374(1), 138–150.
- Ruusala, A., Persson, R., Schmaljohn, C. S., & Petterson, R. F. (1992). Coexpression of the membrane glycoproteins G1 and G2 of Hantaan virus is required for targeting to the Golgi complex. *Virology*, 186(1), 53–64.
- Schmaljohn, C., Hjelle, B. (1997). Hantaviruses: a global disease problem. *Emerging Infectious Diseases*, 3(2), 95–104.
- Schmaljohn, C.S., Nichol, S.T. Bunyaviridae. In *Fields Virology*, 5th ed.; Knipe, D.M., Howley, P.M., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA (2007) *Fields Virology*; pp. 1741–1789.

- Schmaljohn, C. (2009). Vaccines for hantaviruses. *Vaccine*, 27(SUPPL. 4), 61–64.
- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M., & Kingsman, A. J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Research*, 23(4), 628–33.
- Spiropoulou, C.F., Goldsmith, C.S., Shoemaker, T.R., Peters, C.J., & Compans, R.W. (2003). Sin nombre virus glycoprotein trafficking. *Virology*, 308(1), 48–63.
- Tischler, N. D., Fernandez, J., Muller, I., Martinez, R., Galeno, H., Villagra, E., Mora, J., Ramirez, E., Roseblatt, M., Valenzuela, P. D. T. (2003). Complete sequence of the genome of the human isolate of Andes virus CHI-7913: comparative sequence and protein structure analysis. *Biological Research*, 36(2), 201–210.
- Tischler, N. D., Gonzales, A., Perez-Acle, T., Roseblatt, M., & Valenzuela, P. D. T. (2005). Hantavirus Gc glycoprotein: Evidence for a class II fusion protein. *Journal of General Virology*, 86(11), 2937–2947.
- Uchime, O., Fields, W., & Kielian, M. (2013). The role of E3 in pH protection during alphavirus assembly and exit. *Journal of Virology*, 87(18), 10255–62.
- Vennema, H., Godeke, G. J., Rossen, J. W., Voorhout, W. F., Horzinek, M. C., Opstelten, D. J., & Rottier, P. J. (1996). Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. *The EMBO Journal*, 15(8), 2020–2028.
- Vera-Otarola, J., Solis, L., Soto-Rifo, R., Ricci, E. P., Pino, K., Tischler, N. D., Ohlmann, T., Darlix J.-L., López-Lastra, M. (2012). The Andes hantavirus NSs protein is expressed from the viral small mRNA by a leaky scanning mechanism. *Journal of Virology*, 86(4), 2176–87.
- Wang, H., Strandin, T., Hepojoki, J., Lankinen, H., & Vaheri, A. (2009). Degradation and aggregates formation of the Gn tail of the apathogenic Tula hantavirus. *Journal of General Virology*, 90(12), 2995–3001.
- Welsch, S., Müller, B., Krä, & Usslich, H. G. (2007). More than one door - Budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS Letters*, 581(11), 2089–2097.
- Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresh, D. A., & Nemerow, G. R. (1993). Integrins α 5 β 3 and α 5 β 1 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*, 73(2), 309–319.
- Xu, F., Yang, Z., Wang, L., Lee, Y.-L., Yang, C.-C., Xiao, S.-Y., Xiao, H., Wen, L. (2007). Morphological characterization of hantavirus HV114 by electron microscopy. *Intervirology*, 50(3), 166–72.
- Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M., & Tashiro, Y. (1991). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17707–17712.
- Zheng, A., Umashankar, M., & Kielian, M. (2010). In Vitro and In vivo studies identify important features of dengue virus pr-E protein interactions. *PLoS Pathogens*, 6(10).