

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

***CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y
FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA F DEL MNVH***

Director: José Antonio Melero

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
QUE PRESENTA LORENA SOLEDAD VER.**

MARZO 2008

Summary

The human metapneumovirus (HMPV) was first described in 2001 when it was classified as the first mammalian member of the *Paramyxoviridae* family, subfamily *Pneumovirinae*, genus *Metapneumovirus*. Analysis of sequences of the surface glycoprotein genes of several HMPV isolates revealed the existence of two main genetic virus lineages (A, B), each divided into at least two sublineages (A1, A2, B1, B2).

One of the major HMPV glycoproteins is the fusion (F) protein, which is relatively conserved among HMPV strains, and shares structural features with other paramyxovirus F proteins. These proteins are class I viral fusion proteins that are synthesized as inactive precursors that must be cleaved to yield fusion-competent disulfide-linked chains. They mediate fusion of the viral and cell membranes to facilitate virus entry into the cell and, in addition, they commonly promote cell-cell fusion, leading to syncytia formation. Membrane fusion promoted by paramyxovirus F proteins occurs at the cell surface and usually at neutral pH.

In the present study we have cloned, expressed and purified a soluble form of the HMPV F protein. The three dimensional (3D) structure of the ectodomain of the F protein was determined by electron microscopy of single molecules and subsequent 3D reconstruction at a resolution of ~ 14 Å.

It has been recently suggested that membrane fusion promoted by the human metapneumovirus (HMPV) fusion (F) protein requires low pH (Schowalter, et. al., 2007). We demonstrate that low pH dependency for fusion was associated to a glycine at amino acid position 294 in F proteins of some lineage A strains (sublineages A1 and A2) but not in lineage B proteins. Since 294G was only observed in 4% of HMPV sequences in public databases, we conclude that the low pH requirement of HMPV F protein is a rare and strain dependent phenomenon. Other amino acid changes selected in the F protein of a sublineage B2 strain after repeated passage in vitro also influenced F-mediated membrane fusion, independently of pH. We hypothesize that adaptation of HMPV to cell cultures may select for F sequences with more fusogenic phenotypes, either pH-dependent or pH-independent.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. Clasificación y analogía con otros virus.....	1
I.2. Características de la enfermedad.....	2
I.2.1. Epidemiología.....	2
I.2.2. Manifestaciones clínicas y diagnóstico.....	3
I.2.3. Tratamiento y prevención del MNVH.....	4
I.3. Biología Molecular del MNVH.....	6
I.3.1. Genoma viral.....	6
I.3.2. Variabilidad genética y antigénica del MNVH.....	9
I.3.3. Proteína Virales.....	11
I.4. La glicoproteína F del MNVH.....	15
I.5. Proceso de fusión de membranas.....	19
I.5.2. Modelo del proceso de fusión de membranas mediado por paramixovirus.....	23
I.6. Técnicas para el estudio estructural de proteínas.....	25
I.6.1. Técnicas de microscopía electrónica.....	26
I.6.2. El microscopio electrónico.....	27
I.6.3. Procesamiento de imagen y reconstrucción tridimensional.....	28
II. OBJETIVOS.....	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
III.1. MATERIALES.....	33
III.1.1. Material Biológico.....	33
III.1.1.1. Líneas celulares.....	33
III.1.1.2. Virus	33
III.1.1.3. Bacterias y plásmidos.....	34
III.1.1.4. Animales.....	35
III.1.1.5. Anticuerpos.....	35
III.1.1.6. Oligonucleótidos.....	35
III.1.1.7. Enzimas.....	36
III.1.1.8. Oligopéptidos.....	36

III.1.2. Medios de cultivo	37
III.1.2.1. Células eucariotas.....	37
III.1.2.2. Bacterias.....	37
III.1.3. Reactivos	37
III.2. MÉTODOS	38
III.2.1. Manipulación de células, virus y animales	38
III.2.1.1. Cultivo de células eucariotas.....	38
III.2.1.2. Crecimiento del MNVH.....	38
III.2.1.3. Titulación de MNVH por tinción inmunohistoquímica.....	39
III.2.1.4. Ensayo de Neutralización de MNVH.....	39
III.2.1.5. Crecimiento del virus vaccinia.....	40
III.2.1.6. Titulación del virus vaccinia por plaqueo en agar.....	40
III.2.1.7. Construcción de virus vaccinia recombinantes.....	40
III.2.2. Clonaje y expresión de la proteína F del MNVH	41
III.2.2.1. Cultivo de bacterias y preparación de células competente.....	41
III.2.2.2. Extracción de RNA total (Método del Trizol).....	41
III.2.2.3. Amplificación del gen de la proteína F por RT-PCR.....	42
III.2.2.4. Ligación y transformación de bacterias competentes.....	43
III.2.2.5. Selección de bacterias transformadas y secuenciación de las colonias positiva.....	43
III.2.2.6. Corrección de secuencia y producción de mutantes de la proteína F.....	44
III.2.2.7. Subclonaje del gen que codifica para la proteína F del MNVH en el plásmido pCaggs.....	44
III.2.2.8. Ensayo de fusión de membranas	45
III.2.3. Purificación de la proteína F del MNVH	46
III.2.3.1. Cromatografía de intercambio aniónico.....	46
III.2.3.2. Cromatografía de afinidad de iones metálicos (IMAC).....	46
III.2.3.3. Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel.....	47

III.2.4. Obtención de sueros policlonales en conejos New Zealand.....	47
III.2.4.1. Sueros policlonales frente a péptidos sintéticos con secuencia de la proteína F del MNVH.....	47
III.2.4.2. Sueros anti-virus vaccinia recombinantes vvF y vvF ^{TM-}	48
III.2.4.3. Sueros anti-proteína F ^{TM-} 6His purificada.....	48
III.2.5. Métodos de análisis de proteínas.....	48
III.2.5.1. ELISA.....	48
III.2.5.2. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección de proteínas (Western Blot).....	49
III.2.5.3. Inmunofluorescencia.....	49
III.2.5.4. Microscopía electrónica.....	50
III.2.6. Estudios bioinformáticos.....	50
III.2.6.1. Alineamiento de secuencias	50
III.2.6.2. Perfil de hidrofobicidad de la proteína F.....	50
III.2.6.3. Determinación del punto isoelectrico teórico de la proteína F de MNVH	50
IV. RESULTADOS	51
IV.1. Crecimiento y titulación del MNVH en cultivos celulares	51
IV.1.A. Selección de la línea celular y de las condiciones para crecer el MNVH en cultivos celulares.....	51
IV.1.B. Ensayo de formación de focos infecciosos por el MNVH.....	53
IV.2. Clonaje, expresión y purificación de la proteína F del MNVH	54
IV.2.A. Purificación por cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel.....	57
IV.2.B. Purificación por cromatografía de afinidad por iones metálicos y filtración en gel.....	60
IV.3. Caracterización estructural y funcional de la proteína F del MNVH	62
IV.3.A. Observación al microscopio electrónico de la proteína F ^{TM-} 6His purificada.....	62

IV.3.A.1. Procesamiento de imágenes y reconstrucción de un volumen 3D del ectodominio de la proteína F del MNVH.	63
IV.3.B. Modelo informático de la estructura tridimensional de la proteína F del MNVH.....	66
IV.3.C. Análisis comparativo entre el modelo informático de la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína, y el volumen 3D generado a partir del procesamiento de imágenes tomadas por microscopía electrónica (“ <i>Docking</i> ”)	68
IV.3.D. Ensayo funcional de la proteína F del MNVH.....	70
IV.3.E. Análisis de la funcionalidad de la proteína F del MNVH y su dependencia del pH.....	72
IV.4. Obtención de reactivos inmunoquímicos frente a la proteína F del MNVH	75
IV.4.A. <i>Pool</i> de sueros humanos	75
IV.4.B. Sueros policlonales dirigidos frente a péptidos sintéticos.....	76
IV.4.B.1 ELISA.....	78
IV.4.B.2 Western blot.....	79
IV.4.C. Sueros policlonales dirigidos frente a virus vaccinia recombinantes	81
IV.4.C.1 ELISA.....	81
IV.4.C.2 Western blot.....	82
IV.4.C.3 Inmunofluorescencia.....	83
IV.4.C.4 Neutralización.....	84
IV.4.D. Sueros policlonales dirigidos frente a proteína purificada	85
IV.4.D.1 ELISA.....	85
IV.4.D.2 Western blot.....	86
IV.4.D.3 Inmunofluorescencia.....	86
IV.4.D.4 Neutralización.....	87
V. DISCUSIÓN.....	89
V.1. Crecimiento y titulación del MNVH en cultivos celulares	89
V.1.1. Condiciones de crecimiento para el MNVH en cultivos celulares.....	89
V.1.2. Ensayo de formación de focos infecciosos por el MNVH.....	90

V.2. Clonaje, expresión y purificación de la proteína F del MNVH	91
V.2.1. Clonaje y expresión.....	91
V.2.2. Purificación de la proteína F ^{TM-} o de la proteína F ^{TM-} 6His; implicaciones estructurales.....	91
V.3. Caracterización estructural y funcional de la proteína F del MNVH	94
V.3.1. Análisis de la reconstrucción de la estructura 3D del ectodominio de la proteína F del MNVH; comparación con los datos estructurales publicados hasta el momento.....	94
V.3.2. Modelo informático de la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína F del MNVH.....	95
V.3.3. Docking, adecuación del modelo informático con el volumen 3D del ectodominio de la proteína F del MNVH	96
V.3.4. Requerimientos funcionales de la proteína F del MNVH; comparación con los requerimientos necesarios para otras proteínas de fusión.....	100
V.4. Obtención de reactivos inmunoquímicos frente a la proteína F del MNVH	102
V.4.1. Pool de sueros humanos.....	102
V.4.2. Sueros policlonales dirigidos frente a péptidos sintéticos.....	103
V.4.3. Sueros policlonales dirigidos frente a vaccinias recombinantes.....	105
V.4.4. Sueros policlonales dirigidos frente a proteína purificada.....	106
VI. CONCLUSIONES	107
VII. BIBLIOGRAFÍA	109
VIII. ANEXO	119

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Å	Amstrong
AcM	Anticuerpo monoclonal
AEC	Aminoetilcarbazol
Amp ^R	Resistencia al antibiótico ampicilina
β-ME	β-Mercaptoetanol
cRNA	RNA complementario
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen diamino tetracetato sódico
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
F	Proteína de fusión
F TM -	Proteína de fusión que carece de la región transmembrana
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfónico
HN	Hemaglutinina
Ig	Inmunoglobulina
IMAC	Cromatografía de afinidad por iones metálicos
IPTG	Isopropil-b-D-tiogalactósido
ITR	Infecciones del tracto respiratorio
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
M	Molaridad
mA	Miliamperios
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MNVA	Metaneumovirus aviar
MNVH	Metaneumovirus humano
mRNA	RNA mensajero
MWCO	Peso molecular corte, del inglés "Molecular weight cut-off"

nm	Nanómetro
nt	Nucléotido
OPD	O-fenildiamina
ORF	Fase abierta de lectura
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
pdb	del inglés "protein data base"
PIVH	Virus de la parainfluenza humana
pE/L	Promotor temprano/tardío
pl	Punto isoeléctrico
PSA	Persulfato amónico
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RHA	Región heptádica A
RHB	Región heptádica B
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Enzima retrotranscriptasa
SAB	Seroalbúmina bovina
SC	Suero de cerdo
SDS	Dodecil sulfato sódico
STF	Suero de ternera fetal
TEMED	N-N-N'-N'-tetrametil-etilendiamina
Tris	Tris(hidroximetil)-aminoetano
U	Unidades de enzima
uff	Unidades formadoras de foco
ufp	Unidades formadoras de placa
UTR	Región no traducible
V	voltios
VNR	Virus de la neumonía de ratón
VPI 5	Virus de la parainfluenza 5, antes virus del simio 5 (SV5)
vRNA	RNA viral
vRB12	virus vaccinia carente del gen VP37
VRSH	Virus respiratorio sincitial humano

Abreviaturas

vv-F	virus vaccinia recombinante que expresa la proteína F del MNVH
vv-F ^{TM-}	virus vaccinia recombinante que expresa un mutante de la proteína F del MNVH que carece de la región transmembrana
vv-F ^{TM-} 6His	virus vaccinia recombinante que expresa la F ^{TM-} con una cola de 6 histidinas
vTF7.3	virus vaccinia recombinante que expresa la RNA polimerasa del fago T7
6HB	de sus siglas en inglés “six helix bundle”

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Clasificación del MNVH y analogía con otros virus

El metaneumovirus humano (MNVH), aislado por primera vez en 2001 (van den Hoogen et al., 2001), se ha clasificado en el género *Metaneumovirus*, subfamilia *Neumovirinae*, dentro de la familia *Paramixoviridae*.

La familia *Paramixoviridae* pertenece al orden *Mononegavirales*. Los virus de este orden se caracterizan por: (1) tener un genoma formado por una única molécula de RNA de polaridad negativa que se encuentra en el interior de una nucleocápsida helicoidal, que le confiere resistencia a la digestión por RNAsas y que además contiene el complejo de la polimerasa viral; (2) el genoma se transcribe por la RNA polimerasa viral de forma secuencial dando lugar a moléculas de RNA mensajero (mRNAs) subgenómico; (3) el ciclo replicativo es citoplasmático; (4) la progenie viral adquiere una envuelta lipídica que procede de la membrana plasmática de la célula infectada; y (5) la entrada en la célula hospedadora es a través de la fusión entre las membranas viral y celular.

Basándose en criterios morfológicos, la organización del genoma, la actividad biológica de las proteínas y la relación de secuencia entre las distintas proteínas codificadas, la familia *Paramixoviridae* se divide en dos subfamilias, *Paramixovirinae* y *Neumovirinae* (figura I.1). La subfamilia *Paramixovirinae* contiene los géneros *Morbilivirus* (virus del sarampión), *Respirovirus* (virus de la Parainfluenza humana tipos 1 y 3 y virus Sendai), *Rubulavirus* (virus de la Parainfluenza humana tipos 2 y 4, virus de la Parainfluenza 5 también conocido como virus del simio 5, y virus de las paperas), *Avulavirus* (virus de la Enfermedad de Newcastle) y el género reciente *Henipavirus* (virus Hendra y Nipah). Por su parte la subfamilia *Neumovirinae* contiene los géneros *Neumovirus* y *Metaneumovirus*. La clasificación de los dos géneros está basada principalmente en su constelación génica. Los metaneumovirus carecen de ciertas proteínas no estructurales, y el orden de los genes difiere del de los neumovirus (Lamb et al., 2006).

El género *Neumovirus* contiene al virus respiratorio sincitial humano (VRS) humano y al virus de la neumonía de ratón (VNR). Hasta el descubrimiento del MNVH, el

neumovirus aviar (MNVA) era el único miembro del género *Metaneumovirus*. Así, el MNVH está estrechamente relacionado con el metaneumovirus aviar (MNVA) y de forma algo más distante con el virus respiratorio sincitial humano (VRSH) (van den Hoogen et al., 2002).

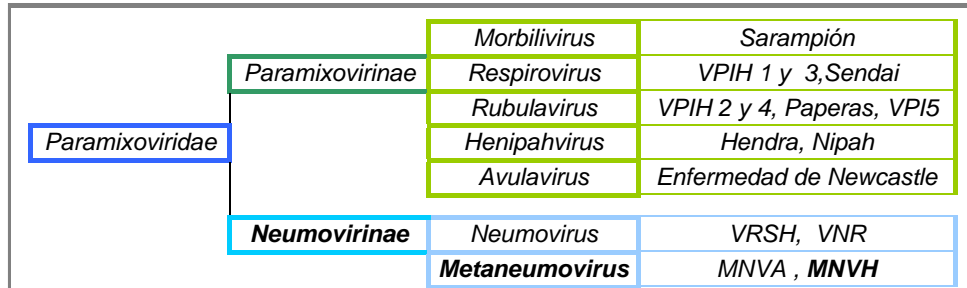


Figura 1.1. Diagrama esquemático de la familia paramixoviridae con especial referencia al metaneumovirus humano (MNVH). En cada género se indican sus miembros más representativos. VPIH 1, 2, 3 o 4: virus de la parainfluenza humana tipo 1, 2, 3 o 4 respectivamente; VPI 5: virus de la parainfluenza 5; VRSH: virus respiratorio sincitial humano; VNR: virus de la neumonía de ratón; MNVA: metaneumovirus aviar.

1.2. Características de la enfermedad

1.2.1. Epidemiología

El metaneumovirus humano se aisló por primera vez en Holanda, en junio de 2001, de aspirados nasofaríngeos de niños con infecciones del tracto respiratorio (ITR). Desde su descubrimiento, la infección con este virus ha sido descrita en Europa (Biacchesi *et al.*, 2003; Freymouth *et al.*, 2003; Greensill *et al.*, 2003), en América (Esper *et al.*, 2003; Falsey *et al.*, 2003), en Asia (Ebihara *et al.*, 2003), en África (Madhi *et al.*, 2003) y en Australia (Howe, 2002). Actualmente se acepta que existen dos linajes genéticos (ver más adelante), subdivididos en dos sublinajes genéticos (A1, A2, B1 y B2) que producen la misma patología.

Las infecciones del tracto respiratorio de origen viral afectan a personas de todas las edades, pero su incidencia es mayor en niños que en adultos. En niños menores de 2 años el virus respiratorio sincitial (VRSH) es la causa principal de ITR. En cuanto al MNVH, también los niños menores de 2 años parecen ser los más susceptibles a la infección. Diversos estudios han mostrado que entre un 5 y un 15% de los niños con ITR son positivos para el MNVH (Peret *et al.*, 2002; Bastien *et al.*, 2003; Boivin *et al.*, 2003; Esper *et al.*, 2004), aunque hay estudios en los que estos porcentajes fueron mayores

(Maggi *et al.*, 2003; Dollner *et al.*, 2004). De hecho, la mayoría de los humanos han estado expuestos al MNVH antes de los 5-10 años de edad (van den Hoogen *et al.*, 2001; Ebihara *et al.*, 2003). Además, las infecciones asintomáticas en niños de muy corta edad parecen no ser comunes (Williams *et al.*, 2004). Los ancianos e inmunodeprimidos, debido a sus características inmunológicas, son también huéspedes comunes, y en algunos estudios aproximadamente el 3% de individuos de todas las edades con ITR, fueron positivos para el MNVH (van den Hoogen *et al.*, 2004b). Como en el caso de VRSH, las re-infecciones con MNVH son frecuentes, aunque la inmunidad inducida por exposiciones anteriores al virus, parece reducir el grado de replicación del virus y los síntomas de la enfermedad. Dado el solapamiento estacional que se ha observado entre las infecciones del MNVH con otros virus respiratorios, se han descrito coinfecciones de este virus con VRSH y con el virus de la gripe (Boivin *et al.*, 2002; Falsey *et al.*, 2003; Greensill *et al.*, 2003). Debido a esto, los porcentajes de infecciones por el MNVH están probablemente subestimados, ya que la mayor parte de los estudios se realizaron en muestras negativas para otros virus respiratorios.

I.2.2. Manifestaciones clínicas y diagnóstico

Se ha descrito un amplio espectro de síntomas clínicos asociados a la infección con el MNVH en pacientes de todas las edades, comprendiendo desde ITR leves hasta enfermedades severas que requirieron hospitalización y que en algún caso desencadenaron la muerte. En niños menores de 5 años, la infección puede venir acompañada de fiebre, congestión nasal, conjuntivitis, faringitis y otitis media. En general los adultos infectados con el MNVH sufren los síntomas respiratorios de un resfriado común, como tos, congestión nasal, ronquera, dolor de garganta y a veces fiebre. En niños hospitalizados, individuos inmunocomprometidos y ancianos débiles, la enfermedad puede llegar a ser más severa, con diagnóstico de rinofaringitis o incluso bronquitis y neumonía. Este amplio espectro de síntomas hace a la enfermedad inducida por el MNVH muy similar, aunque en general levemente más suave, a la ocasionada por la infección con el VRSH (Boivin *et al.*, 2002; Viazov *et al.*, 2003). Sin embargo algunos estudios han postulado que el desarrollo de asma podría ser más frecuente en niños hospitalizados infectados por MNVH que por VRSH (Freyemouth *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003; Mullins *et al.*, 2004; Manoha *et al.*, 2007). Por último, existen evidencias de que el

MNVH podría ser un agente causal, en raras ocasiones, del desarrollo de encefalopatías (Schildgen *et al.*, 2005; Glaser *et al.*, 2006; Kaida *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta que este virus pertenece a la misma familia que el virus del sarampión o el virus Nipah, virus que se sabe pueden infectar el sistema nervioso central, es posible que el MNVH pudiera cruzar en alguna ocasión, la barrera cerebro-espinal.

El MNVH crece muy mal en cultivos celulares. La replicación del virus *in vitro* está restringida a células Vero o LLC-MK2 (que por su origen primate no son de uso frecuente en laboratorios de diagnóstico), a las que es necesario suplementar con tripsina (la cual no se utiliza de manera rutinaria en diagnóstico). Además, la sensibilidad de las técnicas de cultivo celular para la detección del MNVH en secreciones del tracto respiratorio es baja. Estas propiedades podrían explicar por qué el virus no fue identificado hasta hace poco tiempo. Así, aunque actualmente existen anticuerpos monoclonales comerciales para la inmunodetección del virus (inmunofluorescencia, ELISA) la mayor sensibilidad de detección en muestras clínicas se alcanza por RT-PCR (Ebihara *et al.*, 2005; Landry *et al.*, 2005; Percivalle *et al.*, 2005). La RT-PCR en tiempo real es una variante del método anterior que para detectar al MNVH (Maertzdorf *et al.*, 2004; Scheltinga *et al.*, 2005).

I.2.3. Tratamiento y prevención

El tratamiento de las enfermedades graves del tracto respiratorio requiere cuidados paliativos considerables: eliminación mecánica de secreciones, administración de oxígeno humidificado y en los casos más severos, asistencia respiratoria y ventilación mecánica.

La Ribavirina (un análogo de nucleósido) ha mostrado actividad contra el MNVH *in vitro* (Wyde *et al.*, 2003). En estudios *in vivo* (ratones BALB/c) esta droga disminuyó significativamente (hasta 5 logaritmos) la replicación viral en pulmones y redujo la inflamación pulmonar a los 5 días post-infección (Hamelin *et al.*, 2006). Por otra parte, en un caso clínico publicado recientemente (Raza *et al.*, 2007), un paciente transplantado de pulmón con una neumonía grave por MNVH pudo recuperarse de la infección por el tratamiento con ribavirina intravenosa. Otro compuesto como el NMSO₃, un lípido sialyl sulfatado que parece tener una potente actividad viral contra VRSV en cultivos celulares, ha mostrado tener también actividad anti-MNVH *in vitro* (Wyde *et al.*, 2004).

Como medida profiláctica contra el VRSH en niños pertenecientes a los grupos de alto riesgo y en pacientes con trasplante de médula ósea, en la actualidad se utiliza el Synagis, un anticuerpo monoclonal humanizado y neutralizante dirigido contra la proteína de fusión del VRSH (Johnson *et al.*, 1997). En el caso del MNVH, no hay un tratamiento equivalente por el momento, sin embargo hay estudios con anticuerpos neutralizantes que han mostrado muy buenos resultados tanto *in vitro* como *in vivo* (Ulbrandt *et al.*, 2006).

El desarrollo de una vacuna segura y efectiva contra el MNVH se encuentra en intenso estudio. Así, se están evaluando virus atenuados que permitan la replicación del virus vacunal en el tracto respiratorio para inducir una respuesta secretora IgA local, dado que ésta parece ofrecer una potente protección contra virus respiratorios. Varios candidatos prometedores han sido probados en animales. Por ejemplo, un recombinante del virus de la parainfluenza humana tipo 1, que llevaba como gen adicional el de la proteína F del MNVH, indujo anticuerpos específicos que protegieron a ratones y primates frente a un desafío con MNVH (Skiadopoulos *et al.*, 2004). En otro estudio, un virus quimérico humano/bovino de la parainfluenza tipo 3 que expresaba adicionalmente la proteína F del MNVH, indujo anticuerpos neutralizantes contra ambos virus (Tang *et al.*, 2005). Por otro lado se describió que recombinantes del MNVH desarrollados por genética reversa sin las proteínas G y/o SH, retuvieron su inmunogenicidad e indujeron protección en ratones y primates (Biacchesi *et al.*, 2004; Biacchesi *et al.*, 2005). Estos resultados indican que la proteína de fusión del MNVH, es un determinante antigénico importante que media una respuesta de anticuerpos neutralizantes protectora contra el MNVH.

Esta observación se ve reforzada por dos trabajos publicados recientemente, en los que la inoculación de proteína F del MNVH purificada (utilizando diferentes adyuvantes) en hámsteres o ratones, dio lugar a una respuesta de anticuerpos neutralizantes que protegieron a animales frente a un desafío con MNVH (Cseke *et al.*, 2007; Herfst *et al.*, 2007). Herfst y colaboradores observaron en este trabajo además, que los anticuerpos inducidos por la proteína F de un linaje, protegieron a los animales frente al desafío con cepas de linajes homólogos o heterólogos.

Por último, en ensayos de inmunización llevados a cabo en macacos con preparaciones del MNVH inactivado con formalina, demostraron que este tipo de vacuna no sólo falló en la inducción de una respuesta inmune protectora, sino que también

predispuso a los animales a una respuesta de hipersensibilidad después de un desafío con MNVH (de Swart *et al.*, 2007). Estos resultados reproducen la experiencia que hubo en los años 60 con una vacuna de VRSH inactivado con formalina que se administró a niños de muy corta edad, seronegativos para el VRSH. Los niños vacunados no sólo no quedaron protegidos frente a una infección por el VRSH, si no que cuando se infectaron de forma natural, desarrollaron una enfermedad más severa que los niños controles sin vacunar, dando lugar a una tasa muy alta de hospitalización e incluso a dos fallecimientos (Kim *et al.*, 1969). Estas experiencias demuestran, por tanto, que la inmunopatología asociada a las infecciones por el MNVH y el VRSH puede ser determinante en el desarrollo de la enfermedad y que el desarrollo de vacunas frente a estos virus requiere controles de seguridad muy estrictos.

I.3. Biología Molecular del MNVH

I.3.1. Genoma viral

Como es característico en la familia *Paramixoviridae*, el MNVH es un virus con envuelta cuyo material genético es una molécula de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa de aproximadamente 13,4 Kb, que codifica 8 proteínas virales: la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la proteína matriz (M), la proteína de fusión (F), la proteína M2, la proteína SH, la proteína de unión al receptor (G) y la polimerasa viral (L) (van den Hoogen *et al.*, 2002; Biacchesi *et al.*, 2003). Cada gen contiene una fase abierta de lectura (ORF), a excepción del gen M2 que tiene dos, tal como ha sido descrito para el virus respiratorio sincitial humano y bovino, el virus de la neumonía de ratón y el metaneumovirus aviar (Samal *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1992).

Como sucede en el VRSH y otros virus RNA de cadena negativa no segmentada, la transcripción del MNVH empieza en un promotor situado en el extremo 3' del genoma. La transcripción procede de manera secuencial dando lugar a un mRNA poliadenilado para cada gen. La replicación del RNA comprende la síntesis de una copia completa en sentido positivo (complementaria) del genoma, llamada antígeno. La transcripción y la replicación del RNA tienen lugar en el citoplasma.

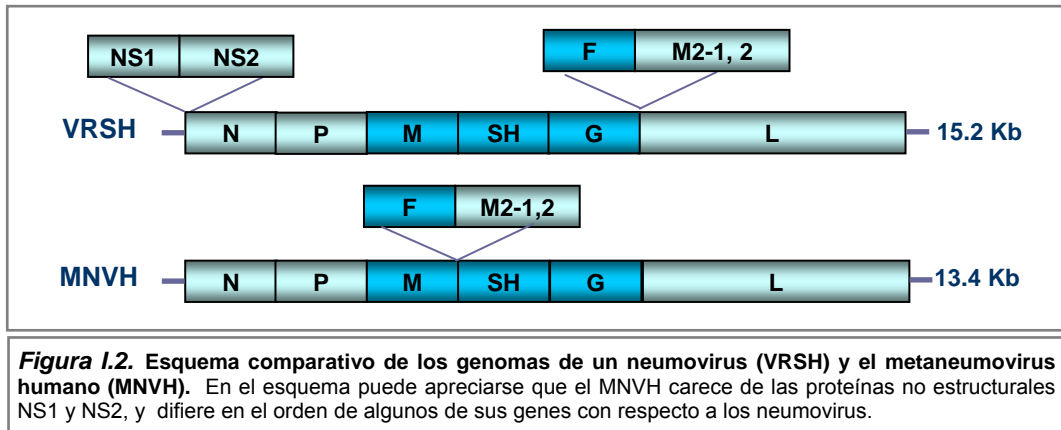
Cada gen comienza con una secuencia de 9 nucleótidos denominada *Gene Start* (GS) que determina el inicio de la transcripción. La comparación de las secuencias no codificantes de los genes del MNVH revelan una secuencia GS consenso para los genes N, P, M, F, M2 y G: GGGACAAA/GU. Las señales de inicio para los genes L y SH de MNVH son ligeramente diferentes (SH: GGGAUAAAU; L: GAGACAAAU; van den Hoogen *et al.*, 2002).

Los genes acaban con una secuencia menos conservada de 9 nucleótidos denominada *Gene End* (GE) que dirige la terminación de la transcripción y la poliadenilación del mRNA. La secuencia GE de los genes en el metaneumovirus aviar, UAGUUAAUU (Randhawa *et al.*, 1996) se encuentra sólo en los genes L y F del MNVH. En los genes N, P, M, M2, y SH se observan variantes con sustituciones de 1 a 3 nucleótidos (van den Hoogen *et al.*, 2002).

Las regiones intergénicas del MNVH varían en tamaño desde 23 hasta 209 nucleótidos y no revelan identidad de secuencia significativa ni entre sí ni con las regiones intergénicas de virus relacionados, tales como el MNVA o el VRSH (van den Hoogen *et al.*, 2002).

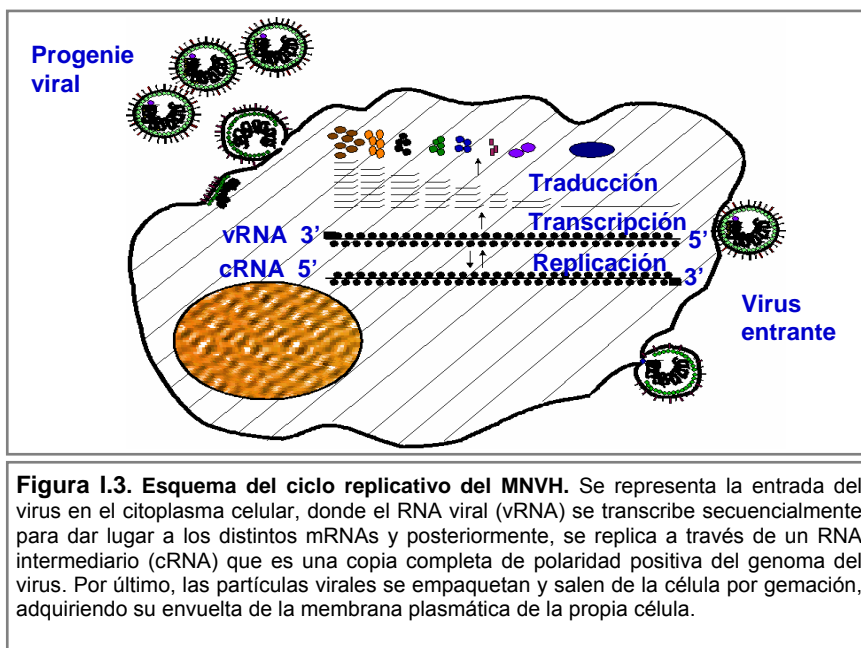
En los extremos 3' y 5' del genoma de los paramixovirus se encuentran las regiones extragénicas denominadas secuencias *leader* y *trailer*, respectivamente, que tienen una cierta complementariedad probablemente porque cada una contiene elementos básicos del promotor viral (Mink *et al.*, 1991). Las secuencias 3' *leader* de los metaneumovirus humano y aviar tienen ambas 41 nucleótidos y se observa identidad de secuencia. La secuencia *trailer*, de 179 nucleótidos, muestra también un alto grado de similitud con el metaneumovirus aviar (van den Hoogen *et al.*, 2002).

En la figura I.2, se muestra un esquema comparativo entre los genomas de un Neumovirus (VRSH) y el MNVH. En ella puede observarse que aunque existen ciertas homologías en la organización génica, hay también diferencias en el orden de alguno de los genes (F, M2-1, M2-2); además, el metaneumovirus carece de las proteínas no estructurales NS1 y NS2.



Como en el resto de los mononegavirales, se cree que debe existir un gradiente transcripcional, de manera que los genes más próximos al promotor se transcribirán con más frecuencia que los genes que están más alejados. Este mecanismo, junto con la presencia de las regiones intergénicas, actuaría como regulador de la transcripción (Kuo *et al.*, 1996; Hardy *et al.*, 1999).

La replicación del genoma viral de los paramixovirus implica la síntesis de un intermediario replicativo encapsidado de polaridad positiva, el antigenoma (cRNA), que es una copia exacta y complementaria del genoma completo (vRNA). El RNA viral se sintetiza empleando como molde el antigenoma. Ambos se encuentran siempre en forma de nucleocápsidas, y su síntesis se inhibe cuando la nucleoproteína es limitante (figura I.3).



En lo que a identidad de secuencia se refiere, el MNVH tipo A muestra un alto porcentaje de identidad de secuencia aminoacídica con el MNVH tipo B (85% a 97%) en casi todos sus genes (excepto los genes que codifican para las proteínas SH y G, 59% y 37% respectivamente). Si se lo compara dentro de la familia *neumovirinae*, tiene una alta identidad de secuencia (56% a 88%) con el neumovirus aviar (MNVA C) en casi todos sus genes (excepto en los genes que codifican las proteínas SH y G) y menos del 50% de identidad con el VRSH (Collins, 2006). La **tabla I.1** indica el porcentaje de identidad en secuencia de aminoácidos entre cada proteína del MNVH tipo A y el MNVH tipo B. En la misma tabla se muestra la relación entre el MNVH tipo A y los distintos metaneumovirus y un neumovirus (el virus respiratorio sincitial humano).

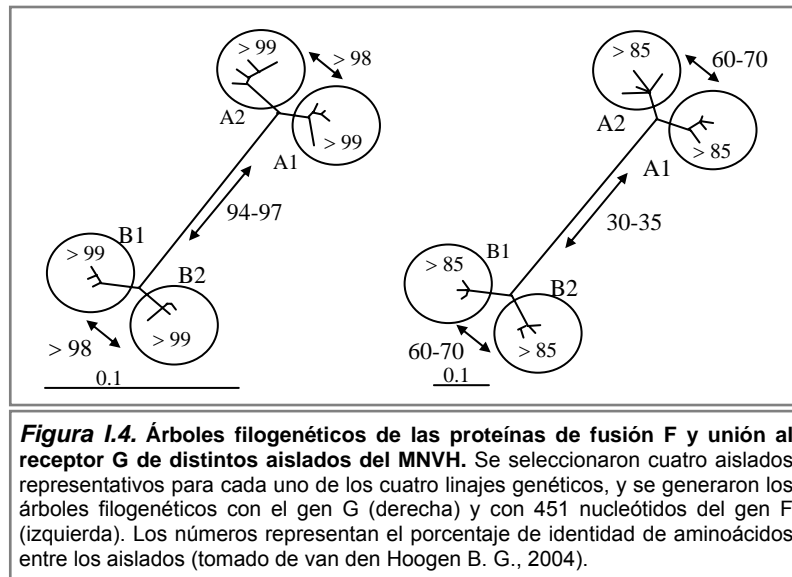
	N	P	M	SH	G	F	M2-1	M2-2	L
MNVH B	96	85	97	59	37	95	96	89	94
MNVA C	88	68	87	24	23	81	83	56	80
MNVA A	70	58	77	20	12	67	73	25	64
MNVA B	69	53	76	20	13	67	71	27	ND ^c
VRSH	42	35	38	23	15	33	36	17	45

Tabla I.1. Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre las secuencias del MNVH (A) y los virus indicados. Los virus están indicados por orden decreciente en relación entre el MNVH linaje A y los virus indicados. ND^c secuencia no disponible. MNVH B: metaneumovirus humano linaje B; MNVA C, A y B: metaneumovirus aviar tipo C, A y B; VRSH: virus respiratorio sincitial humano.

I.3.2. Variabilidad genética y antigénica del MNVH

Una primera comparación de secuencias de aislados del MNVH puso de manifiesto la existencia de dos linajes genéticos (van den Hoogen *et al.*, 2002). Esto fue confirmado posteriormente por otros grupos (Boivin *et al.*, 2002; Pelletier *et al.*, 2002; Peret *et al.*, 2002; Stockton *et al.*, 2002; Falsey *et al.*, 2003; Galiano *et al.*, 2006). Análisis filogenéticos obtenidos con parte de la secuencia de la proteína F (n=84) y de la secuencia completa de la proteína de unión al receptor G (n=35), muestran que además cada linaje puede ser dividido en dos sublinajes (van den Hoogen *et al.*, 2004a), donde la proteína de fusión revela una identidad de secuencia aminoacídica del 94-97% entre los dos linajes, y la proteína G sólo el 30-35% de identidad. Secuencias obtenidas del genoma completo de virus de dos linajes diferentes muestran una identidad nucleotídica promedio del 80-81%, con un 92-93% de identidad entre cepas pertenecientes al mismo linaje. En la figura I.4 se muestran los árboles filogenéticos obtenidos al alinear la secuencia completa del gen que codifica para la proteína G, o 451 nucleótidos del gen que codifica para la proteína F de cuatro aislados representativos para cada uno de los cuatro linajes genéticos (tomado

de van den Hoogen, B.G., 2004).



Como se comentó en el apartado 1.2.3, la proteína F del MNVH es un determinante importante de antigenicidad viral en animales, sin embargo en el huésped natural humano esto no ha sido aún confirmado. La observación de que la mayor diversidad genética entre los dos genotipos ocurre en genes estructurales ($G > SH \gg F$) sugiere que los dos genotipos podrían representar distintos serotipos. Para esclarecer este planteamiento se han utilizado modelos animales. Skiadopoulus y colaboradores (Skiadopoulus, *et al.*, 2004) utilizaron las cepas CAN98-75 y CAN97-83, las cuales representan los dos genotipos del MNVH, en hámsteres, chimpancés, monos verdes africanos y *macaco rhesus*. En estos ensayos, la infección con un genotipo protegió a los animales contra la infección con virus del otro genotipo. Ensayos de neutralización cruzada recíprocos con sueros post-infección, demostraron que cada cepa indujo altos niveles de anticuerpos neutralizantes contra cepas homólogas y heterólogas. Más aún, la inmunización con un virus recombinante del virus de la parainfluenza humana tipo 1, que llevaba como gen adicional el de la proteína F del MNVH CAN97-83, indujo anticuerpos que neutralizaron a virus de ambos linajes y protegieron a los animales en un desafío con cualquiera de las dos cepas (Skiadopoulos *et al.*, 2004). Estos datos sugieren, que después de la infección con un virus de un genotipo ocurre una inmunidad protectora cruzada, y que la proteína F parece ser importante en el desarrollo de esta respuesta cruzada en el huésped. Por lo tanto, los dos genotipos podrían no representar distintos serotipos. Esto es análogo a lo que ocurre con el VRSH, en el cual la infección con un virus del subgrupo A o B despierta

una respuesta de anticuerpos específica tanto para virus homólogos como heterólogos (Collins, 2006).

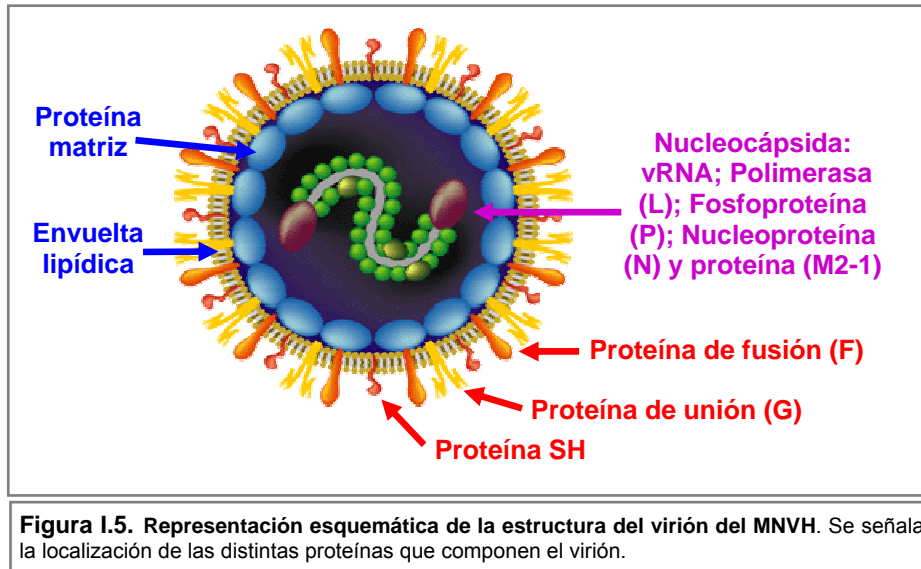
Sin embargo, van den Hoogen y colaboradores mostraron que el suero obtenido de hurones infectados con un virus representativo de un genotipo, no pudo neutralizar a un virus de un genotipo heterólogo *in vitro*, sugiriendo que los dos genotipos son de hecho distintos serotipos (van den Hoogen *et al.*, 2004a).

I.3.3. Proteínas virales

No hay todavía estudios relevantes sobre la funcionalidad de la mayoría de las proteínas del MNVH. Diversos estudios, entre otros, de microscopía electrónica denotan similitudes con otros miembros de la familia de los paramixovirus, y en particular con los de la subfamilia *neumovirinae*. Debido a esto cabe suponer que las proteínas del MNVH desempeñen las mismas funciones que sus homólogas en los paramixovirus. Como tal, las partículas del MNVH tienen una nucleocápsida cubierta por una envoltura lipoproteica que el virus adquiere al salir de la célula por gemación (figura I.5). Así mismo, la nucleocápsida está compuesta por el RNA viral asociado con la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), un factor antiterminador de la transcripción (M2-1) y la polimerasa (L). La proteína matriz (M) debe formar una cubierta en la cara interna de la envuelta del virión.

La envuelta contiene además tres glicoproteínas: la proteína de unión al receptor o proteína G, la proteína de fusión o proteína F, mediadora de la fusión de la membrana viral y celular, y una pequeña proteína hidrofóbica o proteína SH, que en el VPI5 y el VRSH parecería estar implicada en la inhibición de apoptosis mediada por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (He *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2003; Fuentes *et al.*, 2007). Estas glicoproteínas están organizadas independientemente en espículas, que se visualizan como proyecciones cortas (13-17nm) al microscopio electrónico.

A continuación se indican brevemente las principales características que se conocen hasta el momento de las 9 proteínas codificadas por el genoma del MNVH.



Proteína SH: es aproximadamente tres veces más larga (177-183 aminoácidos) que la proteína homóloga en VRSH (64-65 aminoácidos), y por analogía con ésta, se predice que se inserta en la membrana plasmática por una región hidrofóbica localizada en su extremo amino-terminal (van den Hoogen *et al.*, 2002; Biacchesi *et al.*, 2003). Aunque su función no ha sido aún determinada, la delección de esta proteína no tiene un efecto apreciable en la replicación del MNVH *in vitro*, en hámsteres o en monos verdes africanos (Biacchesi *et al.*, 2004; Biacchesi *et al.*, 2005). Al igual que en el caso del VRSH, esta proteína no indujo anticuerpos neutralizantes o inmunidad contra el MNVH en hámsteres inoculados con un virus VPIH tipo 1 recombinante que expresaba dicha proteína (Skiadopoulos *et al.*, 2006).

Proteína matriz (M): la proteína matriz tiene un tamaño de 254 aminoácidos, al igual que en el resto de los metaneumovirus. Muestra una alta identidad de secuencia con los metaneumovirus aviares (76-87%), más baja con los neumovirus VRSH y VNR (37% y 38%) y menos del 10% con la proteína M del resto de paramixovirus (van den Hoogen *et al.*, 2002). En el caso de VRSH esta proteína inhibe la transcripción del genoma antes de que se empaquete en la partícula viral y favorece la asociación entre la nucleocápsida y la envuelta nascente durante la morfogénesis del virus (Teng *et al.*, 1998), pero en el caso del MNVH no hay por el momento ensayos que definan su función.

Nucleoproteína (N): proteína de 394 aminoácidos. Su tamaño es similar al de los

neumovirus y metaneumovirus (391-394 aminoácidos) y más pequeña que en otros paramixovirus. En el VRSH se localiza junto con las proteínas virales P, M2-1 (o 22k) y probablemente L, en cuerpos de inclusión citoplasmáticos observados en células infectadas por el virus o transfectadas con plásmidos que expresan las proteínas N y P (García *et al.*, 1993). La nucleoproteína se une al RNA genómico de los paramixovirus formando las ribonucleoproteínas (RNPs) que son el molde funcional para la polimerasa viral. En el caso del MNVH se supone que la proteína N tendrá una función similar.

Fosfoproteína (P): el segundo marco de lectura abierto en el genoma del MNVH codifica para una proteína de 294 aminoácidos, que muestra una identidad de secuencia del 68% con el MNVA tipo C y sólo del 35% con la proteína P del VRSH. Como en el caso de esta última, la proteína P del MNVH carece de residuos cisteína. Una región de alta similitud entre todos los neumovirus (aminoácidos 185-241) que parece jugar un papel importante en la síntesis de RNA o en mantener la integridad de la estructura del complejo nucleocápsida, aparentemente por representar el dominio de interacción con la polimerasa (Ling *et al.*, 1995), se encuentra también en la proteína P del MNVH mostrando una similitud de 93-100% con los metaneumovirus aviares y del 81% con el VRSH (van den Hoogen *et al.*, 2002). En el caso del VRSH la proteína P es un cofactor esencial de la RNA polimerasa y cabe esperar que, en el caso del MNVH esta proteína tenga un papel equivalente.

Polimerasa (L): por analogía con otros virus de cadena RNA negativa, el último marco de lectura abierto en el genoma del MNVH codifica para la RNA polimerasa RNA dependiente (L, 2005 aminoácidos), componente de la maquinaria de transcripción y replicación viral. Aunque en su totalidad, la identidad de secuencia es baja (64% para el MNVA tipo A, 45% para el VRSH y entre el 13-15% con los otros paramixovirus), esta proteína muestra cuatro motivos altamente conservados (100% con los neumovirus) que se saben esenciales para la función polimerasa (van den Hoogen *et al.*, 2002).

Proteína M2-1: El gen M2 es único entre los miembros de la subfamilia *Neumovirinae*, y dos marcos abiertos de lectura solapados han sido observados en todos los neumovirus. El primero representa a la proteína M2-1 y codifica para una proteína de 187 aminoácidos, que contiene 3 residuos cisteína conservados entre todos los neumovirus. En el caso del VRSH, la proteína M2-1 (o 22K) colocaliza con las proteína N

y P en los cuerpos de inclusión citoplásmicos (García-Barreno *et al.*, 1996), y funciona como un factor antiterminador de la transcripción que favorece la formación de mRNAs completos (Collins *et al.*, 1996). En el MNVH parece tener la misma función (Buchholz *et al.*, 2005). Sin embargo una diferencia notable podría ser que mientras la proteína M2-1 es esencial para la viabilidad del VRSH (Collins *et al.*, 1995), recombinantes del MNVH en los cuales se silenció el gen M2-1 replicaron *in vitro* con una eficiencia muy similar al virus salvaje. (Buchholz *et al.*, 2005).

Proteína M2-2: Esta proteína de 71 aminoácidos parece actuar, como en el caso de VRSH, como factor regulador implicado en el equilibrio entre la replicación y la transcripción del RNA. (Buchholz *et al.*, 2005).

Proteína G: La proteína G del MNVH (219 a 236 aminoácidos según los aislados) es más corta que la proteína homóloga en el VRSH (289-299 aminoácidos). Es una glicoproteína de tipo II que tiene un alto contenido de residuos serina y treonina (30-34%), los cuales son potenciales aceptores de O-glicosilaciones, un alto contenido de residuos prolina (7-8,5%), y de 3 a 6 sitios potenciales de N-glicosilación (van den Hoogen *et al.*, 2002). No hay estudios al respecto todavía, pero se cree que como su homóloga en los neumovirus, la proteína G no tendrá actividad neuroaminidasa ni hemaglutinina.

La función de la proteína G del MNVH no se conoce totalmente, pero se ha propuesto que funciona como proteína de unión al receptor. Aunque en el caso del MNVH no hay estudios en este sentido, en el VRSH diversos estudios muestran una unión entre la proteína G del VRSH y glicosaminoglicanos de la superficie celular (Hallak *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2000; Escribano-Romero *et al.*, 2004).

Experimentos realizados con un mutante natural en el que se deletionó espontáneamente el gen G y el SH, o con virus recombinantes contruidos por genética reversa, mostraron que la proteína G del VRSH es dispensable para la replicación en células Vero, pero esencial para una replicación eficiente tanto en células HEp-2 como *in vivo* (Collins, 2006). En el caso del MNVH, se ha observado que un virus recombinante al cual se le había deletionado la proteína G (solo o en combinación con la proteína SH) fue capaz de replicar *in vitro*. Aunque el mutante ΔG del MNVH es atenuado con respecto al tipo salvaje en hámsteres y monos verdes africanos, es competente para replicación,

demostrando sin ambigüedad que la proteína G del MNVH no es esencial *in vivo* o *in vitro* (Biacchesi *et al.*, 2004; Biacchesi *et al.*, 2005).

En el caso VRSH, el 15-20% de la proteína que se sintetiza en la célula infectada se secreta al medio exterior en forma soluble (Gs). La forma Gs se produce en la célula infectada por el VRSH debido al comienzo de la traducción en un segundo codón de iniciación, en fase con el primero, lo que produce una proteína sin los primeros 48 aminoácidos de la proteína asociada a la membrana (Gm) (Roberts *et al.*, 1994). La función de esta forma soluble de la proteína G del VRSH es aún desconocida, aunque se piensa que podría capturar anticuerpos neutralizantes impidiendo la neutralización del VRSH, o que podría tener un papel modulador de la respuesta inmune y/o inflamatoria. Para el MNVH no se ha descrito aún una forma soluble de la proteína G, sin embargo, el análisis de la secuencia de aminoácidos sugiere que esta especie proteica no existe.

Proteína F: Dado que la proteína F del MNVH es el objeto de estudio de esta tesis, a continuación y de forma más detallada se describen sus características.

I.4. La glicoproteína F del MNVH

La proteína de fusión (F) de los paramixovirus desempeña un papel primordial en la penetración viral mediando la fusión entre las membranas viral y celular. Este evento ocurre a un pH neutro. Como consecuencia de esta fusión la nucleocápsida es liberada en el citoplasma de la célula huésped. Más tarde en la infección, la proteína F expresada en la membrana plasmática de las células infectadas facilita también la fusión con células adyacentes, dando lugar a la formación de sincitios, células gigantes multinucleadas (Walsh *et al.*, 1983). Este efecto citopático puede llevar a la necrosis tisular *in vivo* y puede explicarse como un mecanismo de expansión viral.

La proteína F de los paramixovirus es un homotrímero (Russell *et al.*, 1994; Calder *et al.*, 2000) que se sintetiza como un precursor inactivo (F0). Para ser biológicamente activa, debe procesarse proteolíticamente por proteasas de la célula huésped. El corte proteolítico produce dos cadenas, F1 y F2, que forman así una proteína biológicamente activa constituida por las dos cadenas unidas por un puente disulfuro (figura I.6).

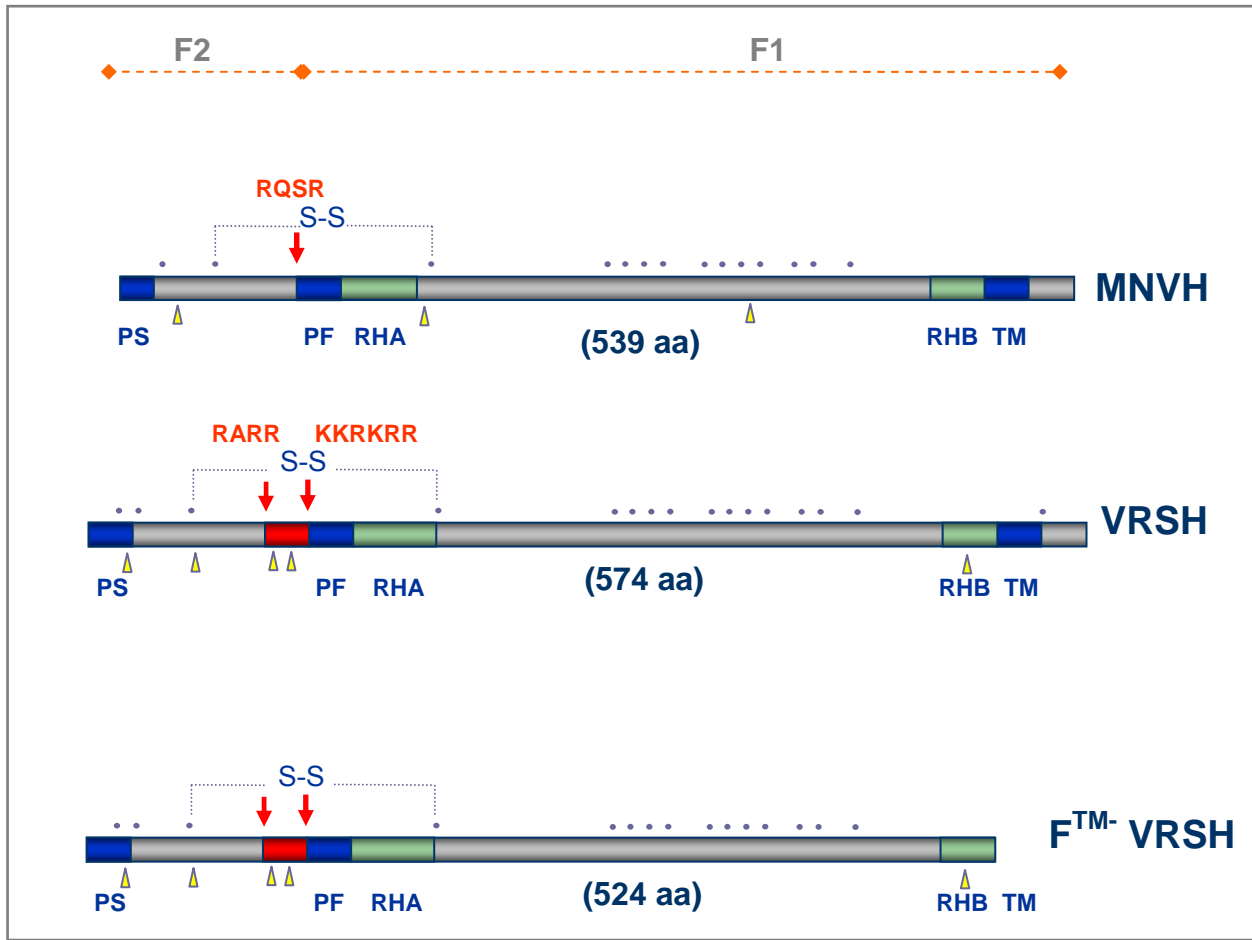


Figura I.6. Esquema comparativo de la proteína de fusión F del MNVH y el VRSH (F y FTM). En la parte superior y media se muestra un esquema de las proteínas F del MNVH y VRSH, con los dominios característicos de una proteína de fusión de un paramixovirus. En la parte inferior se muestra un esquema del mutante de la proteína F del VRSH, al que se le han deletado los últimos 50 aminoácidos (FTM). Las flechas indican los sitios de corte en la proteína. El sitio I (RARR) y II (KKRKRR) en VRSH y el sitio único equivalente a este último (RQSR) en MNVH. S-S puente disulfuro. PS, PF y TM: Péptido señal, péptido de fusión y región transmembrana, respectivamente. RHA y RHB: región heptáptica A y B. ▲ Sitios de N-glicosilación. • Residuos cisteína.

El gen que codifica la proteína F del MNVH se localiza adyacente al gen que codifica la proteína M, lo cual es característico de los miembros del género metaneumovirus. El gen F codifica para una proteína de 539 aminoácidos, y un análisis de su secuencia muestra una identidad del 81% con el MNVA C, 67% con MNVA A y B, 33-38% con otros neumovirus (33% con el VRSH), y sólo un 10-18% con otros paramixovirus (van den Hoogen, *et al.*, 2002).

A pesar del porcentaje relativamente bajo de identidad de secuencia con otros paramixovirus, la proteína F del MNVH revela las características típicas de una proteína de fusión (figura I.6), de acuerdo a lo descrito para las proteínas F de los miembros de la familia *Paramixoviridae* (Morrison, 1988). La proteína inmadura F0 contiene tres regiones hidrofóbicas: una en el extremo N-terminal, que actúa como péptido señal para la

translocación al retículo endoplásmico durante sus síntesis; otra región cerca del extremo carboxi-terminal (C-terminal) denominada dominio transmembrana (TM) y que sirve para que la proteína se ancle a la membrana, y una tercera región en el extremo N-terminal de la cadena F1, denominada péptido de fusión, que se inserta en la membrana celular durante el proceso de fusión de membranas. Además, adyacentes al péptido de fusión y a la región transmembrana existen dos regiones heptádicas (RHA y RHB). Las regiones heptádicas RHA y RHB de la proteína F de los paramixovirus son importantes para la estabilización de la estructura que adopta la proteína una vez producida la fusión de membranas (Lambert *et al.*, 1996).

En la zona central de la cadena F1 se encuentra una zona que contiene 12 residuos de cisteína muy cercanos entre sí, 7 de los cuales se conservan en todos los paramixovirus. En la cadena F2 existen dos residuos cisteína, de los cuales uno se encuentra en todos los paramixovirus. Como se observa en el alineamiento de las proteínas F del virus respiratorio sincitial humano y el MNVH (figura I.7) los 14 residuos de cisteína están conservados en ambos virus. Por otro lado, esta proteína tiene 3 sitios de N-glicosilación, dos de los cuales se encuentran también en los metaneumovirus aviares, sin embargo, ninguno de estos sitios coincide con los sitios de glicosilación del virus respiratorio sincitial humano.

Como se mencionó anteriormente el MNVH está relacionado genéticamente con el VRSH y produce patologías similares. Sin embargo, aunque hay analogías entre ambos virus, existen también importantes diferencias en las propiedades de algunas de sus proteínas.

Una de estas diferencias es en la forma de procesamiento proteolítico de la glicoproteína F de ambos virus. La glicoproteína F del VRSH se sintetiza como un precursor de 574 aminoácidos que posteriormente experimenta un doble procesamiento proteolítico por furina para generar las cadenas F1 y F2 (González-Reyes *et al.*, 2001), las cuales se mantienen unidas covalentemente por un puente disulfuro. La proteína F del VRSH forma un homotrímero y el procesamiento de los monómeros del trímero es un proceso esencial para su activación y facilitar la fusión de las membranas viral y celular en el inicio del ciclo infeccioso. Este doble procesamiento proteolítico es único de los virus respiratorios sincitiales humano y bovino. En cambio los metaneumovirus, como el resto

de los paramixovirus, tienen un único sitio de corte proteolítico en la proteína F (figura I.6). Los dos sitios de corte en el precursor inactivo (F0) del VRSH son: sitio I (106-RARR-109) y sitio II (131-KKRKRR-136) (González-Reyes *et al.*, 2001; Zimmer *et al.*, 2001). Es posible que el péptido que une estos dos sitios forme un bucle expuesto en la estructura tridimensional de la proteína, haciendo a ambos sitios accesibles a la proteasa celular. En la proteína F del MNVH hay un único sitio de corte proteolítico, precedido por la secuencia RQSR que no es reconocible por furina (la secuencia consenso de furina es R-X-K/R-R), por lo que esta proteína debe procesarse por alguna otra proteasa celular o extracelular. En este sentido es significativo que mientras el VRSH no requiere tripsina en el medio de cultivo para propagarse en cultivos celulares, el MNVH es dependiente de tripsina para multiplicarse en cultivos de células.

HMPV	1	-----M	SWKVVIIISL	LITPOHGLKE	SYLEES	STI	TEGYLSVLRT	GWYTNVFTLE	51
HRSV	1	MELPILKANA	ITTLAAVTF	CFASSQNITE	EFYQST	CSAV	SKGYLSALRT	GWYTSVITIE	60
Consenso					E	CS	GYLS.LRT	GWYT.V.T.E	
HMPV	52	VDVENVLTC-	-TDGP-SLIK	TELDLTKSAL	RELKTVSADQ	LAREEQ----			94
HRSV	61	LSNIKENKCN	GTDAKVKLMK	QELDKYKNAV	TELQLLMQST	PAANNRARRE	LPRFMNYTLN		120
Consenso		C	TD	L.K	ELD	K.A	EL	A	
HMPV	95	-----IE	NPQRSRFVLG	AIALGVATAA	AVTAGIAIAK	TIRLESEVNA	IKGALKQTNE	146	
HRSV	121	NTKKTNVTL	KKRKRRLG	-FLLGVG-SA	-IASGTAVSK	VLHLEGEVNA	IKSALLSTNK	176	
Consenso			R	RF.LG	LVG	A	G.A.K	LE.EVN	IK.AL.TN
HMPV	147	AVSTLNGVVR	VLATAVRELK	EFVSKNLTSA	INRNKCDIAD	LKMAVFSFSQF	NRRFLNVVRQ	206	
HRSV	177	AVVSLNGVVS	VLTSKVLDLK	NYIDKQLLPI	VNKQSCRISN	IETVIEFQQK	NNRLLLEITRE	236	
Consenso		AV.L.NGV	VL.V.LK	K.L	N	C.I	F.Q	N.R.L.R	
HMPV	207	FSDNAGITPA	ISLDLMTDAE	LARAVSYMPT	SAGQIKLMLE	NRAMVRRKGF	GILIGVYGSS	266	
HRSV	237	FVNAGVTTTP	VSTYMLTNSE	LLSLINDMPI	TNDQKKLMSN	NVQIVRQOSY	SIMSIIKEEV	296	
Consenso		FS.NAG.T	S	T.E	L	MP	Q.KLM	N.VR	I
HMPV	267	VIYMQVLPPIF	GVIDTPCWII	KAAPSCSE--	KNGNYACLLR	EDQGWYCKNA	GSTVYYPNEK	324	
HRSV	297	LAYVQVLPPLY	GVIDTPCWKL	HTSPLCTTNT	KEGSNICLTR	TDRGWYCDNA	GSVSFFPQAE	356	
Consenso		Y.VQLP	GGIDTPCW	P.C	K.G	CL.R	D.GWYC.NA	GS	P
HMPV	325	DCETRGDHVF	CDTAAGINVA	EQSRECNINI	STTNYPCKVS	TGRHPISMVA	LSPLGALVAC	384	
HRSV	357	TCKVQSNRVF	CDTMNSLTLP	SEVNLCNVDI	FNPKYDCKIM	TSKTDVSSSV	ITSLGAIVSC	416	
Consenso		C	VF	CDT	CN	I	Y.CK	T	S
HMPV	385	YKGVSCSIGS	NWVGIIKQLP	KGCSYITNQD	ADTVTIDNTV	YQLSKVEGEQ	HVIKGRPVSS	444	
HRSV	417	YGKTKCTASN	KNRGIKTFSS	NGCDYVSNKG	VDTVSVGNL	YVVKQEGKS	LYVKGEPIIN	476	
Consenso		Y	C	GIK	GC	Y.N	DTV	NT	Y
HMPV	445	SFDPIKFPED	QFNVALDQVF	ESIENSQALV	DQSNKILNSA	E--KGNTGFI	IVVILVAVLG	502	
HRSV	477	FYDPLVFPSP	EFDASISQVN	EKINGLAFI	RKSDPELLHN	NAGKSTNIM	ITIIIVIIIV	536	
Consenso		DP	FP.D	F	QV	E.I	S.A	S	L
HMPV	503	LTMISVSIII	IIKKTRKPTG	---APPELNG	VTNGGFIPHN			539	
HRSV	537	ILLSLIAVGL	LLYCKARSTP	VTLKSKDQLSG	INNIAFSN--			574	
Consenso				T		L.G	N.F		

Figura I.7. Alineamiento de las secuencias de las proteínas de fusión del MNVH y del VRSH. Sobre la secuencia se indica con fondo amarillo las regiones hidrofóbicas: péptido señal, péptido de fusión y región transmembrana, respectivamente. Con fondo verde los sitios de N-glicosilación. Sobre fondo fucsia las cisteínas compartidas entre ambas secuencias. Sobre fondo celeste se indican los sitios de corte proteolítico. Con letras en azul se indican las regiones heptádicas A y B respectivamente. Como consenso se indica con la letra correspondiente cuando hay identidad y con un punto cuando no la hay. Los números a izquierda y derecha indican el número en la secuencia de aminoácidos, y el guión (-) indica un espacio insertado para un mejor alineamiento.

En el año 1999, en nuestro laboratorio se desarrolló un mutante de la proteína F del VRSH que carecía de la región transmembrana (F^{TM-} , Bembridge *et al.*, 1999; figura I.6). Esta forma soluble de la glicoproteína F del VRSH, se comportó igual que la proteína salvaje en cuanto a procesamiento, plegamiento, oligomerización y reactividad con anticuerpos monoclonales (AcMs, Calder *et al.*, 2000), sin embargo es una forma mucho más sencilla de manejar y purificar, ya que se secreta al sobrenadante de células infectadas con los virus vaccinia recombinantes que la expresan.

I.5. Proceso de fusión de membranas

La fusión de las membranas viral y celular es una etapa clave en el proceso infeccioso de los virus. Muchos estudios sugieren que las proteínas virales implicadas en este proceso, son capaces de cambiar de una conformación de un estado metaestable pre-activo a otra de mayor estabilidad, correspondiente al estado post-activo, y que este cambio es esencial para que se produzca la fusión de membranas (Lamb, 1993; Hernandez *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1998; Skehel *et al.*, 1998; Weissenhorn *et al.*, 1999).

Para muchos virus, como el de la influenza, el virus de la estomatitis vesicular o el virus del bosque Semliki, este proceso de fusión ocurre en el medio ácido de los endosomas celulares, donde el pH ácido dispara un cambio de conformación en la proteína de fusión lo cual lleva a la fusión de membranas. Para diversos virus, incluyendo

los paramixovirus y los retrovirus, se ha establecido que la fusión ocurre en la superficie de la célula a un pH neutro (Hernandez *et al.*, 1996; Dutch *et al.*, 2000; Skehel *et al.*, 2000). A pesar de esto, existen evidencias que indican que los virus podrían penetrar en la célula utilizando más de una vía de entrada. Así, en casos como el del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV, por sus siglas en inglés “Newcastle disease virus”) o el virus de la inmunodeficiencia tipo 1 (VIH-1), parece que podrían ser además internalizados en la célula por una vía endocítica pH-dependiente (Daecke *et al.*, 2005; Cantín *et al.*, 2007).

Las proteínas F de los paramixovirus pertenecen a las proteínas virales de fusión tipo I, de las cuales la proteína Hemaglutinina (HA) del virus de la gripe es el miembro

mejor estudiado. Las proteínas de clase I incluyen también a la gp160/Env del VIH-1, la proteína S de los coronavirus, y la proteína G del filovirus Ebola. Como es de esperar, todas estas proteínas tienen características en común. Todas contienen múltiples sitios de glicosilación, deben ser triméricas y sufrir un procesamiento proteolítico para ser fusogénicamente activas. Seguido de este procesamiento, la subunidad que contiene el dominio transmembrana tiene además en su recientemente generada región N-terminal, una región extremadamente hidrofóbica denominada péptido de fusión.

Además, todas estas proteínas tienen unas secuencias heptádicas repetitivas cercanas al péptido de fusión (RHA) y a la región transmembrana (RHB). Se ha demostrado que estas regiones forman un complejo muy estable (6HB, de sus siglas en inglés “six helix bundle”) muy similar al inducido en la proteína HA a bajo pH, en el cual la RHA forma un trímero de hélices α enrolladas entre sí, recubierto antiparalelamente por tres hélices de la RHB (figura I.8) (Chan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2000). La similitud de estas estructuras en todos los paramixovirus sugiere fuertemente un mecanismo de fusión conservado, probablemente con una proteína de fusión ancestral relacionada a todas ellas (Skehel *et al.*, 1998; Baker *et al.*, 1999).

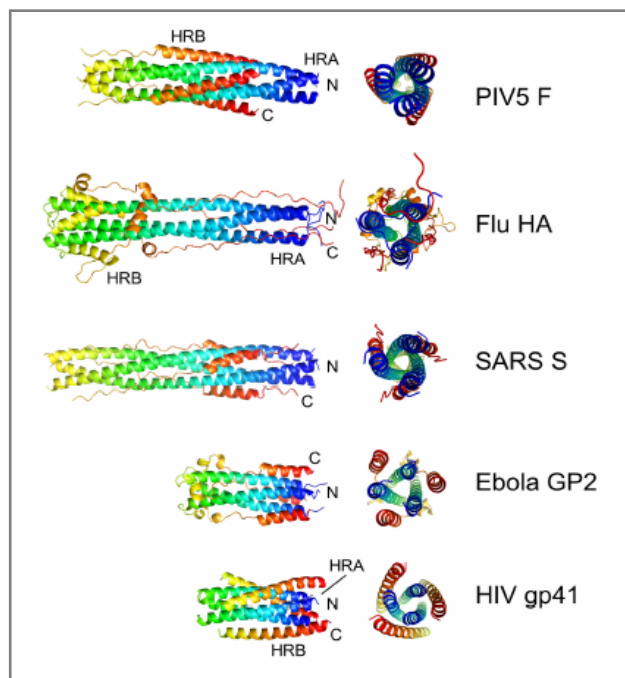


Figura I.8. Estructura del core de alguna de las proteínas de fusión viral de tipo I. Las cadenas están coloreadas en degradé desde el azul (N-terminal) hasta el rojo (C-terminal). Tomada de Lamb *et al.*, 2007.

En el año 2001 se determinó la estructura cristalina para la mayor parte de la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) (Chen *et al.*, 2001a; Chen *et al.*, 2001b) y en 2005 la estructura casi completa de la proteína F del virus de la parainfluenza humana tipo 3 (VPIH3) (Yin *et al.*, 2005). Estas estructuras revelaron un trímero, con unas regiones bien diferenciadas a las que se llamó cabeza, cuello y tallo (figura 1.9). En un primer momento se creyó que estas proteínas estaban en una conformación preactiva, pero la interpretación de datos fue complicada por la proteólisis de la proteína en el cristal de la proteína F de NDV. Además, la estructura de la proteína F del VPIH3 al que se le había mutado el sitio de corte para evitar la activación de la proteína y tratar así de aislar la estructura pre-fusión, contenía la organización de hélices 6HB que se pensaba ya entonces que por su termoestabilidad debía corresponder con su estado post-fusión. Se planteó entonces que, aunque el procesamiento proteolítico de la proteína es necesario para su activación y funcionalidad, este podría no ser imprescindible para el plegamiento a un estado post-fusión. Este trabajo indicaba también que tal vez la región transmembrana, de la que esta proteína carecía, fuera necesaria para mantener y estabilizar a la proteína en su conformación metaestable pre-fusión.

La estructura atómica de la proteína F del VPI5 en la que se propone su conformación metaestable pre-fusión, se determinó en el 2006 (figura 1.9) (Yin *et al.*, 2006). Para esta determinación, se utilizó una forma de la proteína F a la que se le eliminó la región transmembrana para obtenerla de manera soluble y facilitar así su purificación. Para su estabilización fue necesaria la adición de un dominio trimérico soluble (GCNt) que suplanta al dominio transmembrana. La proteína trimérica obtenida tiene una gran cabeza globular adyacente a un tallo formado por 3 hélices alfa de las RHB de las 3 subunidades, orientando la cabeza hacia fuera de la membrana viral. La cabeza contiene 3 dominios (DI-III, figura 1.9) por subunidad extendidas a través de un eje trimérico, manteniendo las subunidades en estrecho contacto. Una gran cavidad está presente en la base de la cabeza, con el extremo y los lados formados por DI y DII. El dominio DIII cubre la parte superior de la cabeza y al péptido de fusión (que no había podido ser resuelto en las estructuras del NDV y VPIH-3), que queda protegido del solvente entre este dominio y el DII de otra subunidad. El sitio de procesamiento proteolítico/activación está adyacente al péptido de fusión proyectándose en los vértices de la estructura trimérica.

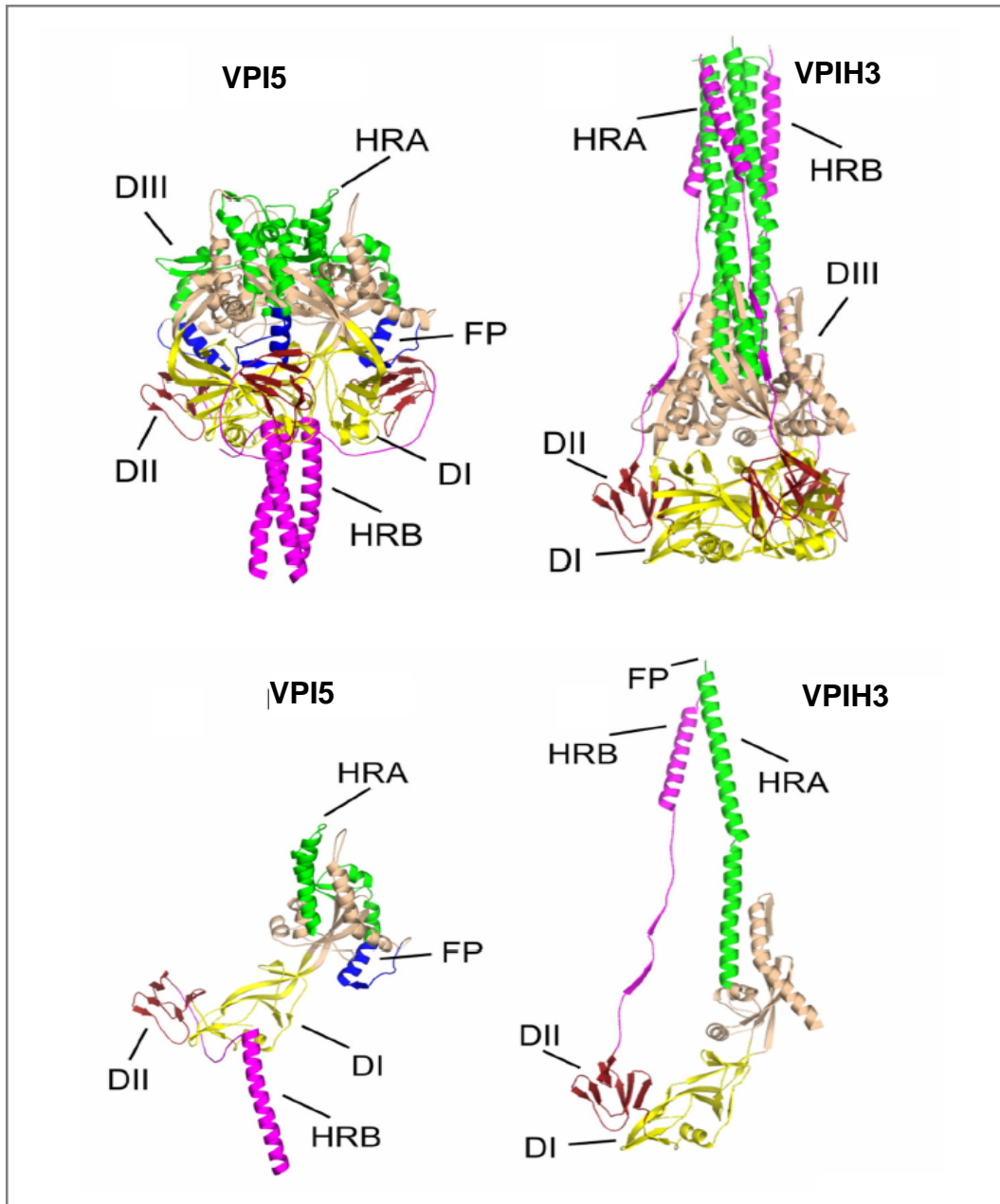


Figura 1.9. Estructura de las proteínas F del VPI5 y VPIH3 en los propuestos estados pre- y post-fusión, respectivamente. Cada dominio (DI, DII y DIII) se representan en ambos modelos con el mismo color. El péptido de fusión en azul en la estructura de la proteína F del VPI5, no pudo ser determinado en la estructura de la proteína del VPIH3. En la parte superior se muestra la estructura del trímero y la parte inferior la estructura del monómero correspondiente. Tomada de Lamb et al., 2007.

Para tratar de correlacionar la función biológica de la proteína F con su estructura molecular, una versión soluble de la proteína F del VPI5 (F-GCNt) en su estado pre-fusión fue inducida a alcanzar su forma post-fusión (Connolly *et al.*, 2006). En este trabajo se observó que el corte con tripsina (procesamiento en el sitio de corte de la proteína F) inducía unos cambios conformacionales locales, pero que este procesamiento era insuficiente para permitir una asociación con liposomas. Solo se observó una asociación a liposomas de la proteína proteolíticamente procesada, cuando dicho procesamiento se

realizó en presencia de calor. Esto sugiere que aunque la proteína esté procesada, y por tanto en un estado funcional pre-activo, la exposición del péptido de fusión no ocurre hasta que el calor dispara un cambio conformacional global en la proteína. No se sabe cuál es el evento o proceso que genera este cambio conformacional en una infección real.

Existe un modelo para la fusión mediada por la proteína F del virus de la Enfermedad de Newcastle, en el cual se propone que la proteína de unión al receptor del virus (HN), cambia su conformación oligomérica al unirse al receptor (ácido siálico), originando un segundo sitio de unión al ácido siálico (Zaitsev *et al.*, 2004). Este proceso podría inducir también un cambio conformacional en la proteína F que diera lugar a la fusión de las membranas viral y celular. Sin embargo, el hecho de que los virus VPI5 y VPIH3 (virus de la misma subfamilia: *paramixovirinae*) no tengan este segundo sitio de unión al ácido siálico (Lawrence *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2005), hace pensar que éste no sea un proceso general.

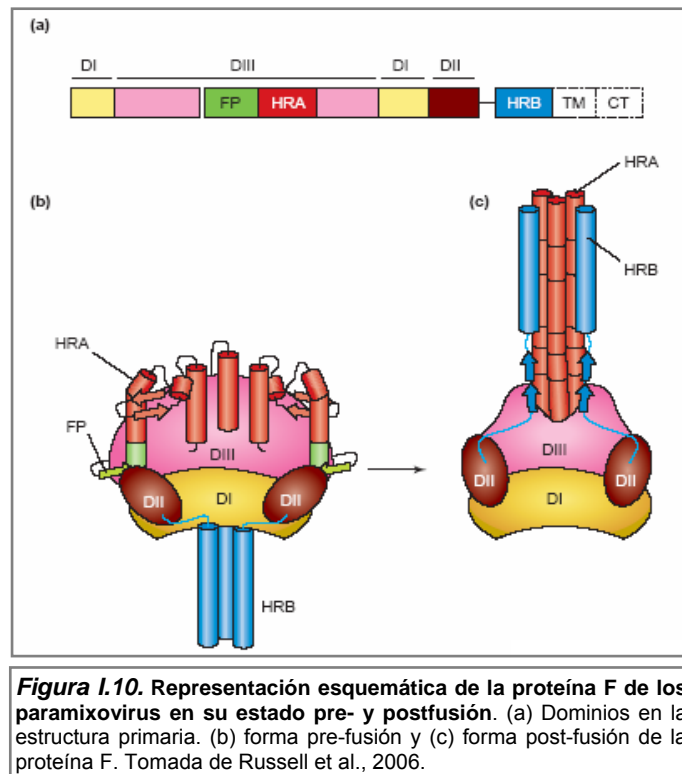
Por otra parte, en la subfamilia *neumovirinae*, a la que pertenecen el MNVH y el VRSH, se han rescatado virus mutantes naturales y/u originados por genética reversa sin la proteína G (homóloga a la proteína HN) capaces de replicarse *in vitro* con una eficiencia similar a la del tipo salvaje (Biacchesi *et al.*, 2004; Biacchesi *et al.*, 2005; Collins, 2006). Debe existir por tanto en esta subfamilia, un mecanismo diferente por el cual se dispare en la proteína F el cambio conformacional necesario para el proceso de fusión.

1.5.1. Modelo del proceso de fusión de membranas mediado por paramixovirus

Después de la activación de la proteína de fusión y antes de la estabilización mediante la formación del 6HB presente en el estado post-fusión, existen intermediarios que representan formas parcialmente plegadas de la proteína, que han podido ser identificados por la adición de péptidos derivados de la región RHA o RHB (Chan *et al.*, 1998; Russell *et al.*, 2001; Melikyan *et al.*, 2005), indicando que la proteína sufre cambios conformacionales que exponen ambas regiones heptádicas, antes del plegamiento final que lleva a la estructura final 6HB

Ha sido propuesto un modelo de la fusión de membranas mediada por

paramixovirus basado en estas estructuras, que plantea que la proteína F adoptaría al menos 5 intermediarios para pasar de la forma pre-fusión a la post-fusión (Russell. *et.al.*, 2006). El esquema de la figura I.10 muestra a la proteína F en las conformaciones pre- (panel b) y post-fusión (panel c) de una manera simplificada para un mejor entendimiento de los cambios producidos en los distintos dominios.



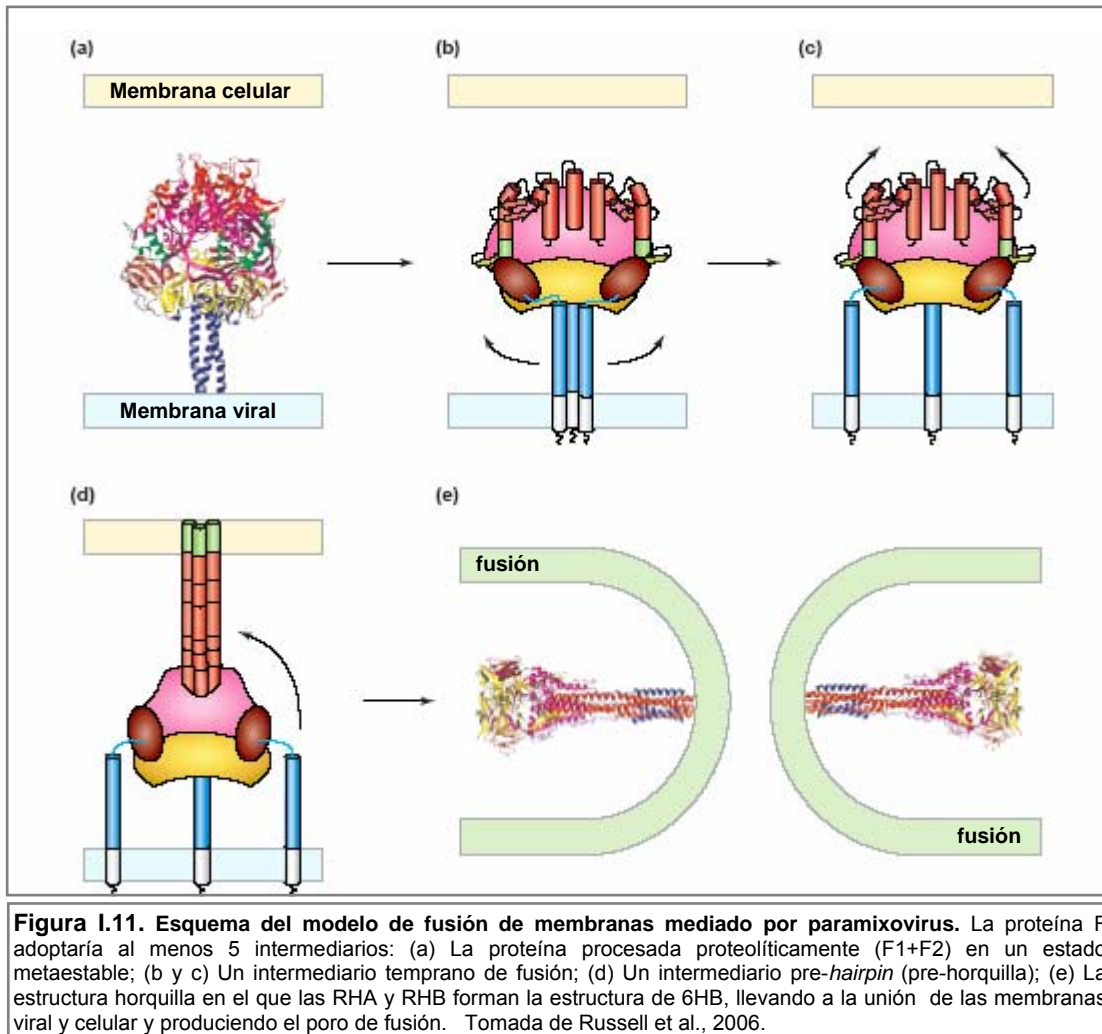
Las etapas del modelo de fusión de membranas mediada por paramixovirus implicarían (Figura I.11):

a) La proteína proteolíticamente procesada (F1+F2) se encuentra en un estado pre-activo metaestable.

b y c) Un intermediario temprano de fusión en el cual las cadenas de la región heptádica (RHB) se abren.

d) Un intermediario pre-*hairpin* (pre-horquilla) en el cual el péptido de fusión de los tres monómeros se inserta en la membrana de la célula diana, y la RHA de los tres monómeros adoptan una conformación de hélices alfa paralelas.

e) La estructura de horquilla en la que las RHA y RHB forman la estructura de 6HB, llevando a la unión de las membranas viral y celular y produciendo el poro de fusión.



I.6. Técnicas para el estudio estructural de proteínas

Actualmente existen distintas técnicas biofísicas que permiten la visualización de proteínas:

- La cristalografía de rayos X, que proporciona información de alta calidad pero cuya limitación es la necesidad de trabajar con sistemas cristalinos, lo que no siempre es factible.
- La espectrometría por resonancia magnética nuclear, que proporciona información de moléculas en solución, aunque está limitada a moléculas de pequeño tamaño (35-

40KDa) en una elevada concentración y alta solubilidad.

- Por último la microscopía electrónica de partículas individuales, que si bien ha sido vista siempre como una herramienta de baja resolución, ha experimentado un gran avance tanto en técnicas de preparación de muestras como en el dispositivo instrumental en sí. Hoy en día prácticamente se han eliminado la mayoría de las limitaciones de esta metodología, como son el daño por radiación o la elevada proporción de ruido frente a la señal específica (Stowell *et al.*, 1998; Ruprecht *et al.*, 2001). También se ha avanzado en el desarrollo de técnicas computacionales que permiten el procesamiento de imágenes (Thuman-Commike, 2001). A pesar de todo, la resolución alcanzada por esta técnica es normalmente inferior a la obtenida por técnicas cristalográficas o de resonancia magnética nuclear. Esto se debe a factores técnicos como los defectos de las lentes del microscopio, el tipo de tinción, etc. Sin embargo, una ventaja de este método es que no necesita elevadas concentraciones ni grandes cantidades de proteína.

1.6.1. Técnicas de microscopía electrónica

Existen dos metodologías principales dentro de la microscopía electrónica para la observación de moléculas o complejos moleculares: tinción negativa y crio-microscopía. La tinción negativa es una técnica sencilla y económica y su uso se ha generalizado como técnica fundamental para contrastar muestras particuladas. El contraste se obtiene embebiendo la muestra a observar en una sal de un metal pesado (ácido fosfotúngstico al 2%, acetato de uranilo al 4%, etc), que perfila el relieve de la proteína sobre un fondo oscuro; de ahí su denominación como técnica de “contraste negativo”, o de tinción negativa. Estos metales, además de aumentar el contraste protegen la muestra del daño por irradiación. Debido a la granulosidad de la tinción, al achatamiento/aplastamiento variable de la estructura 3D de la proteína, y al movimiento del tinte sobre la rejilla, el límite de resolución que puede alcanzarse es de 10-20Å (Ruprecht *et al.*, 2001).

En la crio-microscopía la rejilla se congela en etano líquido para mantener las moléculas en un estado de hielo vítreo preservándose de este modo su conformación nativa. En este caso el contraste es menor que en la tinción negativa, por ello para esta técnica se necesita una concentración de muestra mayor y un tamaño mínimo de la

partícula (aproximadamente 70kDa).

Cualquiera que sea la metodología a utilizar, la muestra debe tener una pureza elevada, ya que se pretende que las partículas observadas correspondan a una única especie molecular. Preferiblemente, ésta debe estar en una conformación única, o en conformaciones que sean lo suficientemente diferentes para permitir su separación por métodos informáticos. En el caso de la tinción negativa, la concentración de la muestra suele estar en los 10-100µg/ml, aunque puede variar en función de las características de la molécula (Ruprecht *et al.*, 2001).

I.6.2. El microscopio electrónico

En el microscopio electrónico un haz de electrones incide sobre la muestra, y de la interacción de estos electrones con los átomos de la misma surgen señales que son captadas por un detector, o bien proyectadas directamente sobre una pantalla. Los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, de forma que tiene que hacerse un vacío casi total en el interior de un microscopio de estas características. La imagen tomada se llama micrografía.

En un microscopio óptico o de fluorescencia la resolución será definida como la habilidad del instrumento para resolver dos puntos situados a una distancia d . Este concepto varía en el microscopio electrónico, ya que la resolución está sometida a una serie de limitaciones provocadas por la estabilidad de las corrientes, aberraciones de las lentes o el propio fondo inespecífico de la muestra. Por tanto, en este contexto la resolución será definida como la capacidad de discernir la señal específica de la imagen frente al ruido de la muestra. Una de las estrategias que ayudan a solventar este problema es trabajar según los métodos de Fourier (Frank, 1996). Dichos métodos consisten en transformar las funciones ondulatorias de cada una de las imágenes mediante ecuaciones matemáticas en puntos discretos que representan la frecuencia, amplitud y fase de cada elemento de la imagen. Este procedimiento se denomina *Transformada de Fourier* y permite extraer las señales correspondientes a la partícula de aquellas que provienen del fondo inespecífico de la muestra.

I.6.3. Procesamiento de imagen y reconstrucción tridimensional

Una vez que se consigue una micrografía de calidad en la que las moléculas se encuentran lo suficientemente dispersas y diferenciables, se puede intentar la reconstrucción tridimensional de la proteína en cuestión mediante el procesamiento de imágenes por métodos informáticos.

Para llevar a cabo este procesamiento de imágenes, primero se digitaliza la micrografía, para permitir su transferencia a un ordenador. Este proceso se realiza en un escáner de alta eficacia o digitalizador que mide el nivel de gris de cada punto del negativo o píxel (Dunn *et al.*, 1998). Estas imágenes son sometidas entonces a una evaluación cuantitativa computacional que verifica la calidad de los datos que aporta dicha foto (Zhou *et al.*, 1996).

Una vez que las imágenes han sido obtenidas, digitalizadas y se ha evaluado su calidad, comienza el procesamiento de imágenes. En la figura I.12 se muestra un esquema que representa los principales pasos en el procesamiento de imágenes para la reconstrucción tridimensional.

En el panel A de esta figura se observa una representación de lo que sería una micrografía que muestra un campo con diferentes moléculas del objeto en estudio. Para determinar la orientación individual de las partículas, uno debe trabajar sobre cada partícula, y no sobre la micrografía completa. Así, el primer paso es especificar la posición de cada partícula individual dentro de la micrografía: un proceso conocido como selección de partículas. Para esto el usuario observa la micrografía digitalizada en la pantalla del ordenador e indica la localización de cada partícula con el ratón. Al finalizar la selección el programa presenta cada molécula como una foto particular (panel B).

El siguiente paso implica el alineamiento o reposicionamiento de las imágenes (panel C), donde cada cada partícula se orienta de una manera similar. El objetivo en este paso es determinar las rotaciones y traslaciones de manera precisa, para que cuando las imágenes sean observadas todas juntas se aprecien características estructurales.

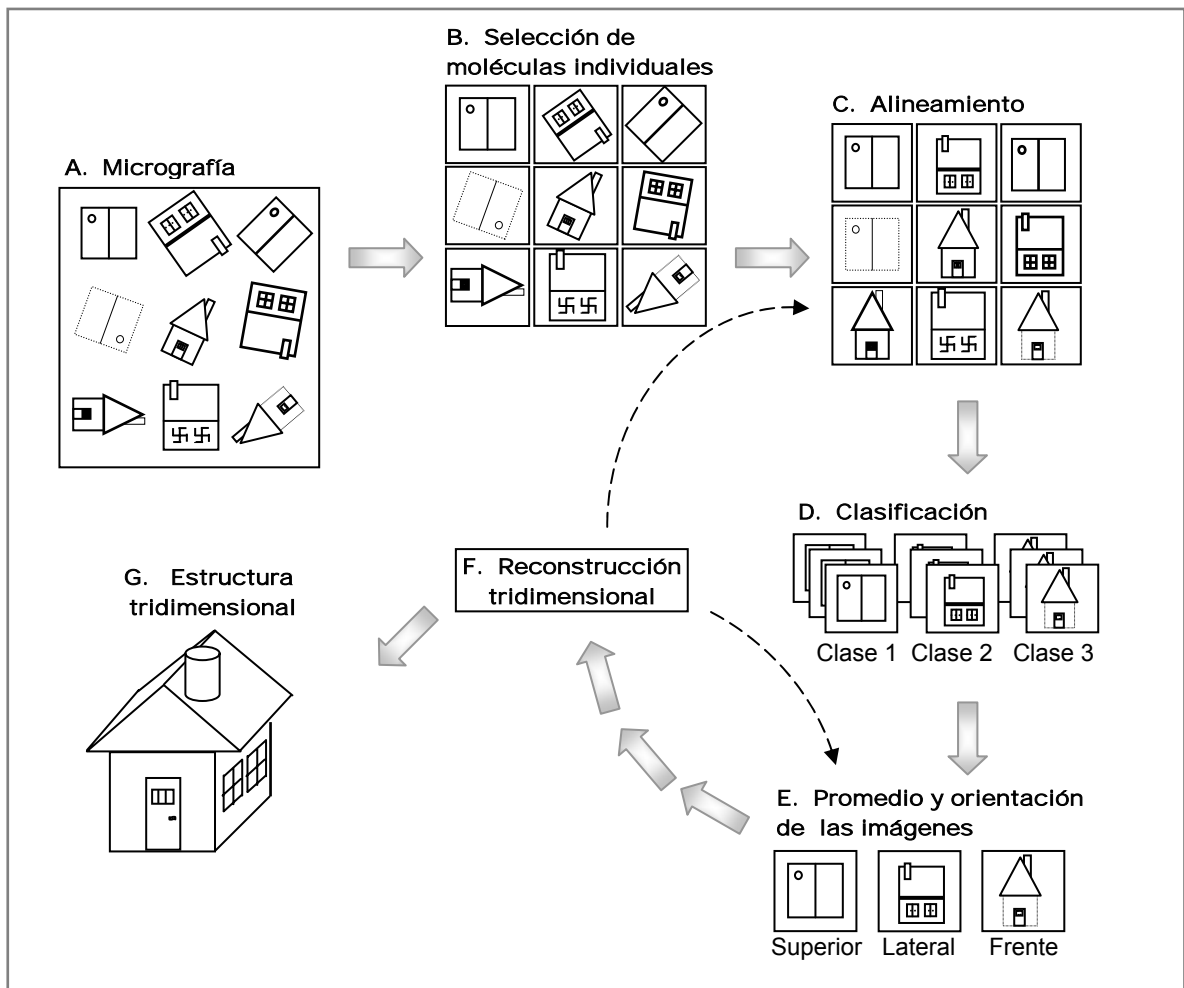


Figura I.12. Esquema descriptivo del método de procesamiento iterativo de imágenes para la reconstrucción de una estructura tridimensional. (A) representación de una micrografía que muestra un campo con diferentes moléculas del objeto en estudio. (B) Selección de partículas: el usuario observa la micrografía digitalizada en la pantalla del ordenador e indica la localización de cada partícula con el ratón. Al finalizar la selección el programa presenta cada molécula como una foto particular. (C) Alineamiento o reposicionamiento de las imágenes. (D) Clasificación de partículas. (E) Promedio y orientación de imágenes. (F) Reconstrucción tridimensional. Adaptada de Thuma-Commike, 2001).

Posteriormente se realiza la clasificación de partículas (panel D), es decir la identificación de vistas similares del objeto u objetos y clasificación en clases. Las vistas similares son incluidas en un mismo grupo y son promediadas (panel E). De este modo al hacer una media de las partículas se consigue incrementar la relación señal/ruido, debido a la repetición de los elementos comunes de partículas de la misma clase en posiciones similares, y a la distribución aleatoria del ruido en cada imagen.

Este grupo de partículas homogéneas son entonces utilizadas para generar un primer modelo tridimensional mediante el paquete de programas EMAN (*Electron Micrograph Analysis*, por sus siglas en inglés) (NCMI-EMAN, ; Ludtke *et al.*, 1999). Una vez generado dicho modelo se realiza un refinamiento iterativo de la estructura usando los

algoritmos implementados en el programa SPIDER (*System for Processing Image Data from Electron microscopy and Related fields, por sus siglas en inglés*) hasta que se alcanza una convergencia máxima, momento a partir del cual las vueltas de refinamiento ya no mejoran el modelo (Spider Web, ; Frank *et al.*, 1996).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El estudio comparativo de las proteínas de fusión de distintos paramixovirus, desde un punto de vista estructural y funcional, puede contribuir a entender tanto el proceso de fusión de membranas como el mecanismo de activación y los cambios conformacionales que estas proteínas experimentan durante dicho proceso.

Como ya se ha comentado a lo largo de la Introducción, la proteína F del MNVH es la responsable de la fusión de las membranas viral y celular, así como de la fusión de las membranas de las células infectadas con las de las células adyacentes no infectadas, dando lugar a la formación de sincitios.

Además, dada la importancia de la proteína F en la respuesta inmune protectora del huésped frente al MNVH, el conocimiento de la estructura y de los requerimientos funcionales de esta glicoproteína es, a nuestro modo de ver, esencial para el desarrollo de posibles vacunas o terapias paliativas contra el virus.

Por todo ello los objetivos planteados para esta tesis fueron:

I.- Poner a punto un sistema de crecimiento del MNVH en cultivos celulares.

Dado que en el laboratorio no se trabajó anteriormente con el MNVH, se probarán distintas condiciones y líneas celulares para determinar las mejores condiciones de infección y replicación viral.

II. - Clonar, expresar y purificar la proteína F del MNVH.

El gen de la glicoproteína F se clonará en vectores de expresión procariótica y eucariótica. Así mismo, con el fin de disponer de una forma soluble de la proteína F, se obtendrán mutantes de la misma desprovistos de las regiones transmembrana y citoplásmica. Estos mutantes permitirán una producción y purificación más sencilla de la proteína F para su caracterización estructural.

III.- Realizar un estudio comparativo de la estructura de la proteína F del MNVH con proteínas homólogas de otros paramixovirus.

La proteína F purificada se observará al microscopio electrónico tras tinción negativa. Las imágenes así obtenidas se emplearán para hacer una reconstrucción tridimensional de esta molécula, que se comparará con lo publicado hasta el momento para las proteínas F de otros paramixovirus.

IV.- Determinar los requerimientos para la funcionalidad de la proteína F del MNVH.

Se determinará en ensayos de formación de sincitios cuales son los requerimientos necesarios para la funcionalidad de la proteína F del MNVH. Se analizarán diferencias y similitudes con otros miembros de la familia de los paramixovirus.

V.- Producir reactivos inmunoquímicos específicos frente al virus y frente a la proteína F del MNVH.

Para contar con herramientas para la detección del MNVH y de la proteína de fusión del virus, se llevarán a cabo inmunizaciones con péptidos basados en la secuencia de la proteína F, virus vaccinia recombinantes que expresen distintas formas de la proteína F o proteína F purificada.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. MATERIALES

III.1.1. Material Biológico

III.1.1.1. Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas fueron las siguientes:

- BHK-21: células de riñón de hámster Sirio o dorado (*Mesocricetus auratus*). *American Type Culture Collection*, ATCC: CCL-10.
- BSR T7/5: línea celular derivada de BHK-21 que expresa la RNA polimerasa del bacteriofago T7 (Buchholz et al., 1999).
- CV-1: células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). *American Type Culture Collection*, ATCC: CCL-70.
- HEp-2: carcinoma de laringe humano. *American Type Culture Collection*, ATCC: CCL-23.
- LLC-MK2: células de riñón de mono Rhesus (*Macaca mulatta*). *American Type Culture Collection*, ATCC: CCL-7.
- Vero 118: células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). *American Type Culture Collection*, ATCC: CCL-81.
- Vero 118 118: clon de células Vero 118 que han sido seleccionadas por su resistencia a la tripsina, cedidas por el Dr. A.D.M.E. Osterhaus, Departamento de Virología, Erasmus MC, Rotterdam, Holanda

III.1.1.2. Virus

Los virus empleados en este trabajo fueron:

- Metaneumovirus humano (MNVH) cepa NL/01/99; aislado en Holanda en 1999, cedido por el Dr. A.D.M.E. Osterhaus, Departamento de Virología, Erasmus MC, Rotterdam, Holanda.
- vRB12, virus vaccinia mutado, derivado de la cepa Western Reserve (WR), en el que 93% de la secuencia que codifica la proteína P37 está delecionada (Blasco et al., 1995).
- vTF7.3, virus vaccinia mutado que expresa la RNA polimerasa del fago T7 (Fuerst

et al., 1986).

- Virus vaccinia recombinantes vv-F y vv-F^{TM-} (Corral et al., 2007), que llevan clonados el gen de las proteínas F del metaneumovirus humano y una forma soluble de ésta (F^{TM-}), respectivamente. La proteína F corresponde a la forma completa de la proteína, mientras que la F^{TM-} es una forma mutada que carece de los últimos 50 aminoácidos de la región carboxi-terminal, correspondiente a la cola citoplasmática y la región transmembrana.

- Virus vaccinia recombinante vv-F^{TM-}6His que lleva clonado el gen de las proteínas F^{TM-} del metaneumovirus humano fusionado a una cola de 6 Histidinas.

III.1.1.3. Bacterias y plásmidos

La cepa bacteriana utilizada para el crecimiento de los plásmidos que se han empleado en el trabajo ha sido *Escherichia coli* DH5 α (Hanahan, 1983).

Los plásmidos empleados para el desarrollo de este trabajo se resumen en la siguiente tabla.

Plásmidos	Tamaño (pb)	Características	Referencia
pRB21	5537	pE/L, VV vP37, Amp ^R	(Blasco et al., 1995)
pRB21-F	7157	Plásmido pRB21 que tiene insertado el gen F del MNVH	
pRB21-F ^{TM-}	7007	Plásmido pRB21-F al que se le mutó la Gly 486 por un codón de terminación para generar el mutante TM-	
pRB21-F ^{TM-} 6His	7025	Plásmido pRB21-F ^{TM-} al que se le agregó un tag de 6 Histidinas en el extremo C-terminal	
pGEM4	2871	Amp ^R , pT7, pSP6	PROMEGA
pGEM4-F	4491	Plásmido pGEM4 que tiene insertado el gen F del MNVH	
pTM1	5357	Amp ^R , líder EMC, pT7,	(Moss et al., 1990)
pTM1-F	6977	Plásmido pTM1 que tiene insertado el gen F del MNVH	
pCAGGS	4790	Amp ^R , <i>Enhancer CMV-IE</i> , promotor e intrón de la β -actina de pollo, poliA β -globina de conejo	(Niwa et al., 1991)
pCAGGS-F	6410	Plásmido pCAGGS que tiene insertado el gen F del MNVH	

Tabla III.1. Plásmidos utilizados en este trabajo. pE/L: promotor temprano/tardío de vaccinia. VV: región para recombinación homóloga en el virus vaccinia. vP37: gen de la proteína VP37 del virus vaccinia. Amp^R: gen de resistencia a ampicilina. Enhancer CMV-IE: *enhancer* inmediato temprano del citomegalovirus. Líder EMC: región no codificante del virus de la encefalomiocarditis. pT7: promotor de T7. pSP6: promotor SP6. poliA: señal de poliadenilación.

III.1.1.4. Animales

Se utilizaron conejos New Zealand para la realización de los distintos sueros policlonales.

III.1.1.5. Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales dirigidos frente a la proteína F del MNVH, así como el suero policlonal de cobaya anti-MNVH fueron gentilmente cedidos por el Dr. A.D.M.E. Osterhaus, Departamento de Virología, Erasmus MC, Rotterdam, Holanda.

El resto de los anticuerpos utilizados en este trabajo se describen en el apartado IV.4 de Resultados.

III.1.1.6. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en el clonaje, mutagénesis y secuenciación de la proteína F del MNVH se detallan en la siguiente tabla.

Nombre del oligo	Utilización	Secuencia (5'→3')
Fm1-18EcoRI+	Clonaje en pRB21 y pCAGGS	CATCTT <u>GAATTC</u> ATGTCTTGAAAGTGGTG
Fm1620-1601HindIII-	Clonaje en pRB21	CGACTG <u>AAGCTT</u> CTAATTATGTGGTATGAAGC
Fm1-18HindIII+	Clonaje en pGEM4	GCATCGA <u>AAGCTT</u> ATGTCTTGAAAGTGGTG
Fm1620-1601Asp718-	Clonaje en pGEM4	AGTACG <u>GGTACC</u> CTAATTATGTGGTATGAAGC
Fm1-18Afl III+	Clonaje en pTM1	GCTAGT <u>ACATGT</u> CTTGAAAGTGGTG
Fm1620-1601BamHI-	Clonaje en pTM1	ACGTAC <u>GGATCC</u> CTAATTATGTGGTATGAAGC
Fm1620-1601SmaI-	Clonaje en pCAGGS	ACGTAC <u>CCCGGG</u> CTAATTATGTGGTATGAAGC
Fm267-281-	Secuenciación	TGCTCCTCTCTCGCC
Fm475-493+	Secuenciación	GCCACTGCAGTGAGAGAGC
Fm732-746-	Secuenciación	GCGCGGTTCTCCAAC
Fm918-934-	Secuenciación	TACAATACCACCTTGA
Fm1012-1036+	Secuenciación	GCAGCAGGGATCAATGTTGCTGAGC
Fm1159-1173-	Secuenciación	CGAGCAGCTTACCCC
Fm1231-1247+	Secuenciación	ACCAACCAGGATGCGGA
FmT80C+	Mutagénesis	ATTTGGAAGAATCATGTAGTACTATAACTGAGGG
FmT80C-	Mutagénesis	CCCTCAGTTATAGTACTACATGATTCTTCCAAAT
FmG590A+	Mutagénesis	CAGCTTCAGTCAATTCAACAGAAGATTCT

FmG590A-	Mutagénesis	AGAAATCTTCTGTTGAATTGACTGAAGCTG
FmG839A+	Mutagénesis	CTTTGGTGTTCATAGATACACCTTGTGGATC
FmG839A-	Mutagénesis	GATCCAACAAGGTGTATCTATGACACCAAAG
FmG1062A+	Mutagénesis	GCAACATCAACATATCTACTACCAACTACC
FmG1062A-	Mutagénesis	GGTAGTTGGTAGTAGATATGTTGATGTTGC
Fm1468Stop+	Mutagénesis	AAGGAAACACTTAGTTCATTATCGTAGTAA
Fm1468Stop-	Mutagénesis	TTACTACGATAATGAACTAAGTGTTTCCTT
FmTM-His1+	Mutagénesis	GAAAAAGGAAACACTCATCATCATTAGTTCATTATCG
FmTM-His1-	Mutagénesis	CGATAATGAACTAATGATGATGAGTGTTTCCTTTTTC
FmTM-His2+	Mutagénesis	CACTCATCATCATCATCATTAGTTCATTATCG
FmTM-His2-	Mutagénesis	CGATAATGAACTAATGATGATGATGATGATGAGTG

Tabla III.2. Secuencia de los oligonucleótidos empleados en esta Tesis. El signo + indica que el oligonucleótido tiene la polaridad del mRNA del gen F y el signo – la complementaria. En cursiva y subrayado se muestra la secuencia que reconocen las enzimas indicadas en cada caso.

III.1.1.7. Enzimas

El kit de mutagénesis dirigida (Quik Change® Site-Directed Mutagenesis kit) fue suministrado por Stratagene-Europe (Amsterdan, Holanda).

El kit de secuenciación automática de DNA (DNA Sequencing Kit Big Dye 3,1) fue suministrado por Abi Prism (Parking Elmer, Biosystems).

Las enzimas de restricción utilizadas en el clonaje de la proteína F (BamHI, EcoRI, HindIII, Asp718, NcoI, AflIII, SmaI) fueron suministradas por Roche.

Otras enzimas empleadas en la manipulación de DNA fueron: fosfatasa alcalina de gamba (USB/GE Healthcare), T4 DNA ligasa (kit ligación rápida de Roche) y Ampli Taq® DNA polimerasa (Applied Biosystems).

La tripsina se adquirió de Sigma (San Luis, Estados Unidos)

III.1.1.8. Oligopéptidos

Los oligopéptidos utilizados en el desarrollo de este trabajo se detallan en la siguiente tabla.

Los péptidos F₈₃₋₁₀₂, F₂₂₆₋₂₄₄ y F₄₆₅₋₄₈₄ fueron suministrados por el servicio de proteómica del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III.

Nombre del oligo	Secuencia
F ₈₃₋₁₀₂	TVSADQLAREEQIENPRQSR
F ₂₂₆₋₂₄₄	ELARAVSNMPTSAGQIKLM
F ₄₆₅₋₄₈₄	ESIENSQALVDQSNRILSSA

Tabla 3. Secuencia de aminoácidos de los oligopéptidos empleados en este trabajo. F₈₃₋₁₀₂: péptido que tiene los aminoácidos 83 a 102 de la proteína F del MNVH; y así sucesivamente. Los aminoácidos en rojo son errores de secuencia que se cometieron en la síntesis del péptido.

III.1.2. Medios de cultivos

III.1.2.1. Células eucariotas

DMEM-10, DMEM-2,5 Y DMEM-0: Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Dulbecco y Freeman, 1959; Gibco), con 4mM glutamina, 100U/ml penicilina, 0,1mg/ml de estreptomina y enriquecido con 10%, 2,5% suero de ternera fetal (STF) o sin suero.

DMEM-agar: Medio DMEM-2,5 conteniendo un 1% de aminoácidos no esenciales (Biological Industries) y 0,7% de agar noble (Difco).

DMEM-agar-tripsina: Medio DMEM-0 conteniendo un 1% de aminoácidos no esenciales (Biological Industries), 0,7% de agar noble (Difco) y tripsina (2µg/ml, Sigma)

Tripsina-Verseno: 0,05% tripsina, 0,02% EDTA en PBS.

III.1.2.2. Bacterias

LB: 1% bacto-triptona, 1%NaCl y 0,5% extracto de levadura.

SOB: 2% bacto-triptona, 0,5% extracto de levadura, 10mM NaCl y 2,5mM KCl.

Circle-Grow^R: (Bio 101 System)

III.1.3. Reactivos

Los compuestos orgánicos (formaldehído, metanol, etanol, etc.), inorgánicos, colorantes para electroforesis, detergentes, persulfato amónico (PSA), fracción V de la seralbúmina bovina (SAB) y glicerol fueron suministrados por VWR.

Disco y Bio 101 Systems proporcionaron los componentes de los medios de cultivo de bacterias (bactotripton, extracto de levadura y agar).

Los reactivos para electroforesis: acrilamida, N-N'-metilen-bisacrilamida, dodecil

sulfato sódico (SDS), β -mercaptoetanol (β ME), N-N-N'-N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED), azul de bromofenol y marcadores de peso molecular preteñidos (Precision Plus Protein Standards Dual color y Precision Plus Protein Standards All Blue) se obtuvieron de Bio-Rad. Para la separación de ácidos nucleicos se empleó agarosa de laboratorios Conda (Pronadisa).

Para las inmunotransferencias o *western blots*, el Inmobilon-P lo suministró Millipore, el 3MM Whatman y el bloqueante I-Block, Tropix.

Se emplearon películas autoradiográficas de AGFA CURIX RP2 que se revelaron con productos de Eastman Kodak.

Dimetilsulfóxido (DMSO), antibióticos, ácido p-cumárico, luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-phthalazinedione), así como el sustrato para la peroxidasa, O-fenilendiamina (OPD) y el 3-amino-9-etil-carbazol (AEC), se compraron a Sigma.

Los marcadores de tamaño de DNA y el inhibidor de proteasas Complete-Mini EDTA-free se obtuvieron de Roche.

Para la concentración de proteínas se utilizó Vivaflow50, Vivaflow200 y Vivaspín50 de 100.000MWCO de Sartorius (Vivascience, Hannover, Alemania).

Las inmunoglobulinas (Igs) conjugadas con peroxidasa contra Igs de conejo o de ratón fueron suministradas por GE-Healthcare, así como las inmunoglobulinas conjugadas con fluoresceína.

III.2. MÉTODOS

III.2.1. Manipulación de células, virus y animales

III.2.1.1. Cultivo de células eucariotas

Las células se crecieron en placas de Petri con medio DMEM-10 incubándose a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 98% de humedad. Las monocapas celulares se subcultivaron desprendiéndolas con tripsina-verseno.

Para su almacenamiento, las células se resuspendieron en STF con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y se congelaron en nitrógeno líquido.

III.2.1.2. Crecimiento del MNVH

Para el crecimiento de virus MNVH se infectaron cultivos al 80% de confluencia de

células LLC-MK2, a una multiplicidad de infección de 0,1 unidades formadoras de foco por células (uff/célula) en DMEM-0. Después de 1 hora de adsorción a 37°C se retiró el inóculo, se añadió medio DMEM-0 fresco. Al día siguiente, se quita la mitad del medio de la placa y se agrega medio DMEM-0 nuevo con 4µg/ml de tripsina y se dejó progresar la infección durante 5-6 días. Cada dos días se retiró el 25% del medio (~3ml) y se agregó medio DMEM-0 nuevo con 8µg/ml. Pasado este tiempo las células se rasparon y se recogieron junto con el sobrenadante. La preparación se alicuoteó y se guardó a -80°C.

III.2.1.3. Titulación de MNVH por tinción inmunohistoquímica

Células LLC-MK2 confluentes en placas M6 se infectaron con 200µl de diluciones seriadas de virus. Se dejó adsorber durante 1 hora a 37°C. Luego se retiró el inóculo y se lavó con 0,5ml de DMEM-0. Entonces se agregó 1ml de DMEM-agar-tripsina y se incubó durante 4días. Al cabo de este tiempo se agregaron 2ml de formaldehído al 4% en PBS 1x, y se incubó a temperatura ambiente durante 45min. Se quitó el agar con cuidado y se fijó con metanol durante 5min. Luego se lavó 2x con agua y se bloqueó con PBS con 1% de seroalbúmina bovina (PBS-SAB1%) durante 30min a temperatura ambiente.

Después se añadieron 0,8ml/pocillo de una dilución 1:1000 del anticuerpo anti-FTM-6His conejo E en PBS-SAB1% y se incubó 1h a temperatura ambiente. Luego de lavar 5x con agua se añadió 0,8ml de anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa 1:500 en PBS-SAB 1% y se incubó 1h a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente 5x con agua y se añadió 0,8ml de sustrato por pocillo en la proporción: 10ml tampón ELISA (tampón 0,1M citrato, 0,2M fosfato pH=5.5), 0,6ml de 3-amino-9-etil-carbazol (AEC) (de una solución de 20mg de AEC/6ml DMSO, bien disuelta por vortex y sonicación), 20µl H₂O₂.

La placa se envolvió, se mantuvo en oscuridad aprox. 20min, se quitó el sustrato y se contaron las placas a simple vista.

III.2.1.4. Ensayo de Neutralización de MNVH

Células LLC-MK2 confluentes en placas M96 se infectaron con 60µl/pocillo con x uff de MNVH que habían sido preincubadas 30 minutos a 37°C en ausencia o presencia de distintas cantidades de anticuerpo. Se dejó adsorber durante 1 hora a 37°C. Luego se retiró el inóculo y se lavó con 0,5ml de DMEM-0. Se agregó entonces 1ml de DMEM-agar-

tripsina y se incubó durante 3-4 días. Se cuantificó la reducción del número de focos de células infectadas en presencia del anticuerpo, respecto al control sin anticuerpo. Esta cuantificación se realizó siguiendo el protocolo de titulación del virus por tinción inmunohistoquímica descrito en el apartado III.2.1.3.

III.2.1.5. Crecimiento del virus vaccinia

Para el crecimiento de virus vaccinia recombinantes se infectaron cultivos confluentes de células CV-1 a una multiplicidad de infección de 0,1 unidades formadoras de placa por célula (ufp/célula) en DMEM-2,5. Después de 1 hora de adsorción a 37°C se retiró el inóculo, se añadió medio DMEM-2,5 fresco y se dejó progresar la infección durante 48-72 horas. Pasado este tiempo las células se rasparon, se recogieron junto con el sobrenadante y se centrifugaron 5 minutos a 1500rpm. El sedimento se lavó con PBS estéril, se resuspendió en (250µl/placa p100) 1mM de Na₂HPO₄, se congeló (-80°C) y descongeló (37°C) tres veces para romper las células y se sonicó en un baño de ultrasonidos durante 3 minutos para la liberación del virus intracelular. La preparación se volvió a centrifugar a 1500rpm durante 5 minutos para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se alicuoteó y se guardó a -80°C.

III.2.1.6. Titulación de virus vaccinia por plaqueo en agar

Pocillos de placas M-6 con células CV-1 confluentes se infectaron por duplicado con 250µl de diluciones seriadas de virus vaccinia. Después de 1 hora de adsorción a 37°C en medio DMEM-2,5, se retiró el inóculo y se añadió 2ml de DMEM-agar. A las 48 horas post-infección, las células se fijaron con 2ml de paraformaldehído al 10% en PBS completo durante 30 minutos y, una vez retirado el agar, se tiñeron durante 30 minutos con 1ml de 0,1% cristal violeta en 20% metanol. A continuación se procedió a contar las placas de lisis.

III.2.1.7. Construcción de virus vaccinia recombinantes

Los virus vaccinia recombinantes empleados en este trabajo (vv-F, vv-F^{TM-} y vv-F^{TM-} 6His) se prepararon siguiendo el protocolo de Blasco y Moss (Blasco *et al.*, 1995). Brevemente, placas p35 con células CV-1 se infectaron con la cepa de vaccinia vRB12 en

medio DMEM-0. Una hora después se transfectaron, usando lipofectina, con 5ug del plásmido pRB21 que contenía el gen a expresar (F, F^{TM-} o F^{TM-} 6His). Como el vRB12 no tiene el gen VP37 y es por tanto, incapaz de formar placas, los virus recombinantes (que si forman placas) se pudieron recuperar de las células infectadas y transfectadas a los 2 días de haberse infectado, mediante plaqueo en células CV-1. Las placas de lisis se recuperaron y clonaron por plaqueo tres veces más para asegurar que el virus purificado provenía de una única partícula.

III.2.2. Clonaje y expresión de la proteína F del MNVH

III.2.2.1. Cultivo de bacterias y preparación de células competentes.

Las bacterias se plaquearon a 37°C en medio sólido Circle-Grow y 100μgr/ml de ampicilina. Colonias individuales se aislaron y se crecieron a 37°C durante la noche con fuerte agitación en 5ml de medio LB líquido conteniendo la misma concentración de ampicilina. A alícuotas de estos cultivos se les añadió glicerol al 20% (concentración final) y se guardaron a -80°C para su uso posterior (Miller, 1972; Sambrook, 1989).

Para la preparación de células competentes para transformación se siguió el método del cloruro de rubidio (Hanahan, 1983). Las células se crecieron en medio SOB enriquecido con Mg²⁺ a 37°C. Posteriormente, 1ml del cultivo se diluyó en 200ml de medio SOB/Mg²⁺ y se creció a 37°C con agitación fuerte hasta obtener una densidad óptica a 550nm, de 0,45-0,55 unidades. El cultivo se centrifugó a 5000rpm durante 5 minutos a 4°C en un rotor JA-17 (Beckman). Las bacterias sedimentadas se resuspendieron suavemente en 10ml de tampón TfBI (100mM RbCl₂, 50mM MnCl₂, 30mM acetato potásico, 10mM CaCl₂, 15% glicerol) por cada 30ml de cultivo inicial y se volvió a centrifugar. El sedimento se resuspendió con suavidad en 2,4ml de tampón TfBII (10mM MOPS, 10mM RbCl₂, 75mM CaCl₂, 15% glicerol) por cada 30ml de cultivo inicial. Por último se repartió en tubos eppendorff preenfriados en un baño de etanol/CO₂. Las bacterias se almacenaron congeladas a -80°C hasta su uso.

Empleando un plásmido de concentración conocida se calculó la eficiencia de transformación de las bacterias competentes (n° de colonias/μg de plásmido) en presencia de ampicilina 100μgr/ml.

III.2.2.2. Extracción de RNA total (Método del Trizol)

Una placa p100 de células LLC-MK2 infectadas con el MNVH se raspó a los 6 días post-infección para desprender las células que aún estaban pegadas. Las células y el sobrenadante se colocaron en un tubo de 20ml y se centrifugaron a 1200rpm por 5min. Se descartó el sobrenadante y se añadió 1ml de Trizol (1mlTrizol/10⁷ células) resuspendiendo bien mediante pipeteos y vórtex. Se mantuvo 5min a temperatura ambiente y entonces se pasó a un eppendorf.

Se añadieron entonces 0,2ml de cloroformo (por ml de Trizol) y se mezcló con el vórtex durante 15seg. Se dejó reposar 3min y entonces se centrifugó en minifuga a máxima velocidad (13.000rpm) durante 15min a 4°C. El sobrenadante se pasó a otro eppendorf (aproximadamente el 60% del vol) procurando no tomar volumen de la interfase. Se añadieron 0,5ml de isopropanol (por ml de trizol) y se agitó manualmente. Se dejó 10min a temperatura ambiente y entonces se centrifugó en minifuga a máxima velocidad (13.000rpm) durante 10min a 4°C. Se descartó el sobrenadante.

Procurando no resuspender el *pellet* se añadió 1ml etanol 75% (por ml de trizol). Se centrifugó en una minifuga a máxima velocidad (13.000rpm) durante 5min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar ligeramente.

Entonces se resuspendió en 100µl de agua estéril mediante pipeteo y vortex, y se guardó a -20°C.

III.2.2.3. Amplificación del gen de la proteína F por RT-PCR

El gen que codifica para la proteína F de MNVH se amplificó mediante RT-PCR a partir del RNA total extraído de células infectadas por el virus (III.2.2.2).

El cDNA se sintetizó agregando 600ng del oligonucléotido negativo (Tabla 2; III.1.1.6) a 2µgr de RNA en un volumen final de 20µl. Esta mezcla se incubó durante 15min a 65°C. Entonces se agregaron tampón de baja concentración salina (Promega), dNTPs y Cl₂Mg a una concentración final de 1x, 400µM y 2,5mM, respectivamente en un volumen de 30µl. Por último se agregó 1µl de Retrotranscriptasa (Promega) por tubo de reacción y se incubó durante 30min a 42°C y 5min a 95°C.

Posteriormente se realizó la amplificación del gen de la proteína F de MNVH por PCR. Para esto se llevó a 100µl el volumen del tubo de reacción de la RT, con una concentración final de 600ng de cada uno de los oligos (Tabla 2; III.1.1.6), 400uM de dNTPs y 1x del tampón de baja concentración salina (Promega). Finalmente se

agregaron 2,5U de la Taq Plus Long (Stratagene) y se llevo a cabo el siguiente ciclado: 94°C 2min // 94°C 30seg, 45°C 1min, 72°C 5min (x 25ciclos) // 72°C 10min.

El producto de reacción de amplificación se analizó en un gel de agarosa 1%.

III.2.2.4. Ligación y transformación de bacterias competentes

El gen que codifica para la proteína F del MNVH amplificado se clonó en los plásmidos pTM1, pGEM4, y pRB21. Los dos primeros para expresión y el tercero para el desarrollo de los virus vaccinia recombinantes. Así cada plásmido y los fragmentos amplificados por RT-PCR se digirieron con las enzimas correspondientes -pTM1 (NcoI/BamHI), pGEM4 (HindIII/Asp718), y pRB21 (EcoRI/HindIII)- según las indicaciones de la casa comercial para cada caso. En el caso del plásmido pTM1, el gen de la proteína F se digirió con la enzima AflIII, que deja unos extremos compatibles con NcoI. A continuación el plásmido se trató durante 1 hora a 37°C con fosfatasa alcalina para evitar una posible recircularización. La enzima se inactivó calentando a 65°C durante 30 minutos. El plásmido tratado y los fragmentos amplificados se ligaron incubando la mezcla con la enzima T4 DNA ligasa durante 15 minutos a temperatura ambiente (kit de ligación rápida de Roche).

Bacterias *E.coli* DH5 α competentes se transformaron mediante choque térmico (15min/hielo, 1min/42°C y 2min/hielo) con el producto de ligación.

III.2.2.5. Selección de bacterias transformadas y secuenciación de las colonias positivas

Las bacterias transformadas se crecieron en placas de Circle-Grow con ampicilina durante toda la noche a 37°C. Para detectar las colonias que llevan el plásmido con el gen de la F de MNVH se hizo una PCR directamente de las colonias. Para esto se tomaron con una punta estéril bacterias de las colonias a analizar y se agregaron a 50 μ l de mezcla de reacción con una concentración final de: 1x tampón PCR (Promega), 200 μ M dNTPs, 75 ng de cada uno de los primers (los mismos que se utilizaron para el clonaje; Tabla 2, apartado III.1.1.6), y 5U de Taq Polimerasa (Stratagene). El perfil de PCR fue: 94°C 2min // 94°C 30seg, 55°C 45seg, 72°C 45seg (x 25 ciclos) // 72°C 2min. El producto de esta PCR se corrió en un gel de agarosa 1%, y aquellas colonias en las que se amplificó una banda de tamaño esperado (1620pb), se crecieron en 5ml de LB con ampicilina durante

toda la noche, con agitación fuerte a 37°C. Se realizó una miniprep (Promega) de cada uno de estos cultivos según las indicaciones de la casa comercial.

El gen que codifica para la proteína F clonado en estos plásmidos se secuenció completamente con los primers indicados en la Tabla 2 (III.1.1.6). La secuenciación del DNA se llevó a cabo en un secuenciador automático Perkin-Elmer utilizando el Kit Big Dye 3,1 (Applied Biosystems). Para cada reacción de PCR se empleó como molde 100-300ng de DNA y 30ng de los oligonucleótidos específicos complementarios a regiones internas del gen clonado (Tabla 2, III.1.1.6). El perfil de ciclado fue el siguiente: 94°C/3min // 96°C/30seg, 55°C/4min (x 25min).

III.2.2.6. Corrección de secuencia y producción de mutantes de la proteína F

Para la corrección de la secuencia de la proteína F así como para la producción posterior de mutantes se utilizó el kit de mutagénesis dirigida (Quik Change site-directed mutagenesis kit, Stratagene), usando como molde los plásmidos pRB21-F, pGEM4-F o pTM1-F, y los oligos correspondientes (Tabla 2, III.1.1.6). El programa de PCR utilizados fue 95°C 3min // 95°C 30seg, 55°C 1min, 68°C 14min (x 18 ciclos). El resultado de la PCR se dirigió según las indicaciones del proveedor con DpnI, para eliminar el DNA parental metilado.

Bacterias *E. coli* DH5 α competentes se transformaron con los plásmidos resultantes. Las células competentes se incubaron 5min en hielo y posteriormente, se les añadió el plásmido y se incubaron 15min a 4°C, 1min a 42°C y, finalmente, 5min a 4°C. A continuación se añadió 1ml de LB y se incubaron durante 1hora a 37°C. Las bacterias transformadas se crecieron durante la noche a 37°C en placas de Circle-Grow con 100 μ g/ml de ampicilina. Se crecieron varias colonias y se seleccionaron aquellas cuya secuencia fue la esperada.

III.2.2.7. Subclonaje del gen que codifica para la proteína F del MNVH en el plásmido pCAGGS

El subclonaje del gen que codifica para la proteína F del MNVH se realizó amplificando el gen por PCR a partir del plásmido pTM1. Para esto 5ng de pTM1-F se agregaron a 50 μ l de mezcla de reacción con una concentración final de: 1x tampón PCR

(Promega), 200 μ M dNTPs, 75 ng de cada uno de los *primers* (Tabla 2, apartado III.1.1.6), y 0,5U de Taq Polimerasa (Stratagene). El perfil de PCR fue: 94°C 2min // 94°C 30seg, 55°C 45seg, 72°C 45seg (x 25 ciclos) // 72°C 2min. El producto de esta PCR y el plásmido pCAGGS se digirieron primero con EcoRI y luego con SmaI de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial. A continuación el plásmido se trató durante 1 hora a 37°C con fosfatasa alcalina para evitar una posible recircularización. La enzima se inactivó calentando a 65°C durante 30 minutos. El plásmido tratado y los fragmentos amplificados se ligaron incubando la mezcla con la enzima T4 DNA ligasa durante 15 minutos a temperatura ambiente (kit de ligación rápida de Roche). Entonces bacterias *E.coli* DH5 α competentes se transformaron mediante choque térmico (15min/hielo, 1min/42°C y 2min/hielo) con el producto de ligación.

La selección y secuenciación de colonias positivas se realizó de acuerdo a lo indicado en III.2.2.5.

III.2.2.8. Ensayo de fusión de membranas

Monocapas confluentes de células BSR T7/5, Vero 118, BHK, o LLC-MK2 creciendo en microcámaras ($\sim 2 \times 10^6$ células) con DMEM-10 sin antibiótico, se transfectaron con 1 μ gr de DNA de plásmidos que codificaban para la proteína F del MNVH. Para estas transfecciones se utilizó Fugene (Roche) en una proporción 2:1 (μ l Fugene/ μ gr de DNA), según las indicaciones de la casa comercial. Para ello, el DNA disuelto en agua se llevo hasta 20 μ l con medio Optimem (Gifco) y se incubó con 2 μ l de Fugene durante 45 minutos a temperatura ambiente. Entonces se añadió la mezcla a las células en medio DMEM-0 y se incubó durante 7 horas a 37°C. Luego se retiró el medio, se lavó dos veces con DMEM-2,5 y se mantuvieron las células en DMEM-2,5 por 16 horas.

Entonces las células se lavaron con DMEM-0 y se incubaron durante 1 hora con medio DMEM-0 con tripsina (0,5 μ gr/ml para las células BHK y BSR T7/5; 2 μ gr/ml células Vero 118 y LLC-MK2).

Posteriormente se retiró el medio y luego de lavar con PBS 1x pH=7, se sometieron a pulsos de 4 minutos con pH ácido (PBS pH=5; 10mM HEPES, 5mM MES). Se retiró nuevamente el medio, y después de lavar con PBS 1x pH=7, se incubó durante 1 hora con DMEM-0 con tripsina (0,5 μ gr/ml para las células BHK y BSR T7/5; 2 μ gr/ml células Vero 118 y LLC-MK2). Luego de este tiempo, las células se lavaron y se mantuvieron

durante 2 horas en DMEM-2,5. Este proceso se repitió 3 veces y entonces las células se incubaron 20 horas más en DMEM-0 con tripsina. Todos los lavados e incubaciones se hicieron a 37°C o con tampones pre-calentados. Finalmente las células se fijaron con metanol frío y acetona, y se realizó la inmunofluorescencia como se describe en el apartado III.2.5.3.

III.2.3. Purificación de la proteína F del MNVH

III.2.3.1. Cromatografía de Intercambio Aniónico

Sobrenadante de células infectadas con el virus vaccinia recombinante que expresa la forma F^{TM-} se concentró utilizando un sistema de flujo tangencial a través de membranas con un tamaño de poro de 100.000 MWCO (“peso molecular corte” del inglés “Molecular weight cut-off”. Sartorius) hasta un volumen final de 10-30ml (~100x). Posteriormente este sobrenadante concentrado se dializó en el tampón de unión Tris-HCl 20mM pH=7.5, se centrifugó 10min a máxima velocidad y se aplicó a una columna de intercambio aniónico Q (Vivapure Q, Vivascience, Sartorius) previamente equilibrada en dicho tampón. La elución se realizó en 3 etapas, por centrifugación con 500µl del tampón Tris-HCl 20mM pH=7.5 con 100, 500 y 1000mM de NaCl. La purificación se siguió por SDS-PAGE 10% y *western blot* que se reveló con el anticuerpo F₄₆₅₋₄₈₄ diluido 1:5000 y con el anticuerpo anti-BSA diluido 1:1000.

III.2.3.2. Cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC)

Sobrenadante de células infectadas con el virus vaccinia recombinante que expresa la forma F^{TM-}6His se concentró utilizando un sistema de flujo tangencial a través de membranas con un tamaño de poro de 100.000 MWCO (“peso molecular corte” del inglés “Molecular weight cut-off”. Sartorius) hasta un volumen final de 10-30ml (Entre 100 y 200 veces). Posteriormente este sobrenadante concentrado se dializó en el tampón de unión 20mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 500mM NaCl, 20mM Imidazol y se aplicó a una columna HisTrap HP de 1ml (GE Healthcare) utilizando el sistema AKTAPrime Plus (GE Healthcare) a un flujo de 0,3ml/min. La columna se lavó a un flujo de 0,5ml/min con este tampón de unión hasta que la densidad óptica se estabilizó en cero unidades en por lo menos 5 fracciones (5ml). La elución se realizó a 0,5ml/min y en 3 etapas con el volumen necesario (hasta que la densidad óptica se estabilizó en cero unidades en por lo menos 5 fracciones)

del tampón de elución (20mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 500mM NaCl con 100mM, 300mM y 500mM de Imidazol). La purificación se siguió por SDS-PAGE 10% y *western blot* que se reveló con el anticuerpo F₄₆₅₋₄₈₄ diluido 1:5000 y con el anticuerpo anti-BSA diluido 1:1000.

III.2.3.2. Cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel

La muestra a inyectar en la columna de filtración en gel se dializó en el tampón de Tris-HCl 20mM pH=7.5 100mM NaCl, se centrifugó a máxima velocidad 10min a 4°C y se aplicó en este mismo tampón (pre-enfriado a 4°C) en una columna de Superosa 12 HR 10/30. La cromatografía se llevo a cabo utilizando el sistema automático AKTAPurifier (GE Healthcare), a un flujo constante de 0,3ml/min y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial para la columna utilizada (presión, etc). Se recogieron fracciones de 0,6ml. La purificación se siguió por SDS-PAGE 10% y *western blot* que se reveló con el anticuerpo F₄₆₅₋₄₈₄ diluido 1:5000 y con el anticuerpo anti-BSA diluido 1:1000.

III.2.4. Obtención de sueros policlonales en conejos *New Zealand*

III.2.4.1. Sueros policlonales frente a péptidos sintéticos con secuencia de la proteína F del MNVH

Los péptidos liofilizados se resuspendieron según su carga neta aparente en AcNa 100mM pH=5,2 (F₈₃₋₁₀₂ y F₂₂₆₋₂₄₄) o en CO₃HNa 100mM pH=9,0 (F₄₆₅₋₄₈₄).

Entonces estos péptidos se emulsionaron en adyuvante completo de Freund (Difco) y se inocularon intradermicamente en múltiples sitios del lomo a dos conejos *New Zealand* (por péptido), de los que previamente se había extraído suero preinmune. Al cabo de tres semanas se les dio una segunda dosis de antígeno emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (Difco), esta vez intramuscularmente en las patas traseras. Se repitió esta inoculación dos veces más con intervalos de 15-20 días.

Los conejos se sangraron por la oreja 15 días después de la última inoculación y los antisueros se separaron del coágulo de sangre por centrifugación. Se realizaron un total de 13 sangrías cada 20 días, que fueron analizadas por ELISA. Luego de verificar que los títulos eran similares en todas las sangrías, éstas se juntaron y se congelaron a -20°C.

III.2.4.2. Sueros policlonales frente a los virus vaccinia recombinantes vv-F y vv-F^{TM-}

Los virus vaccinia recombinante vv-F y vv-F^{TM-} purificados por colchón de sacarosa se inocularon en conejos *New Zealand* (1×10^7 ufp por conejo). Cada virus se inoculó intramuscularmente en las patas de un par de conejos. Se repitió esta inoculación dos veces más con intervalos de 15-20 días.

Los conejos se sangraron por la oreja 15 días después de la última inoculación y los antisueros se separaron del coágulo de sangre por centrifugación. Se realizaron un total de 7 sangrías cada 20 días, que fueron analizadas por ELISA. Luego de verificar que los títulos eran similares en todas las sangrías, éstas se juntaron y se congelaron a -20°C .

III.2.4.3. Sueros policlonales frente a proteína F^{TM-} 6His purificada

Proteína F^{TM-} 6His purificada se emulsionó en adyuvante completo de Freund (Difco) y se inoculó intradermicamente en múltiples sitios del lomo a dos conejos *New Zealand*, de los que previamente se había extraído suero preinmune. Al cabo de tres semanas se les dio una segunda dosis de antígeno emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (Difco), esta vez intramuscularmente en las patas traseras. Se repitió esta inoculación una vez más 15-20 días después.

Los conejos se sangraron por la oreja 15 días después de la última inoculación y los antisueros se separaron del coágulo de sangre por centrifugación. Se realizaron un total de 7 sangrías cada 20 días, que fueron analizadas por ELISA. Luego de verificar que los títulos eran similares en todas las sangrías, éstas se juntaron y se congelaron a -20°C .

III.2.5. Métodos para el análisis de proteínas

III.2.5.1. ELISA

Placas de cloruro de polivinilo se recubrieron con $50\mu\text{l}$ de antígeno diluido en PBS ($\approx 30\text{ng}$ de proteína F^{TM-} 6His purificada o $1\mu\text{gr}$ de péptido) y se incubaron durante la noche a 4°C . Los pocillos se saturaron durante 30 minutos con 2% suero de cerdo (SC) diluido en 0,05% Tween-20 en PBS para el ensayo de sueros, o con SAB1% en PBS para el caso de anticuerpos monoclonales. A continuación se incubó 1 hora a 37°C con los sueros o AcMs diluidos en el tampón anterior correspondiente. Los complejos inmunes se detectaron con un anticuerpo anti-Ig específico de especie conjugado con peroxidasa y se revelaron con OPD (Sigma) diluido en tampón 0,1M citrato, 0,2M fosfato pH=5,5 y H_2O_2 al

0,06%. La reacción se paró añadiendo 3N H₂SO₄, y la densidad óptica se midió a 490nm.

III.2.5.2. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección de proteínas (*western blot*)

Las proteínas diluidas en tampón de muestra (0,08M Tris-HCl pH6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 0,01% de azul de bromofenol), se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% en presencia de 5% β-Mercaptoetanol, a 80V hasta que la muestra pasa el concentrador y a 120-150V mientras se resuelve en el separador.

El gel se tiñó durante 2 horas con 0,05% azul de *Coomasie*, 45% metanol, 7% ácido acético en agua. El exceso de colorante se eliminó con 25% metanol, 7% ácido acético en agua.

Cuando el gel se utilizó para realizar un *western blot* se electrotransfirió a papel Inmobilon-P (Towbin et al., 1979) en tampón de transferencia (2,5mM Tris-HCl pH7.5, 19,2mM Glicina y 20% metanol) durante 2 horas a 220mA. Los sitios de unión inespecífica de la membrana se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente o, alternativamente, toda la noche a 4°C con 0,2% I-Block en PBS con 0,1% Tween20. Posteriormente, la membrana se incubó con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente con los antisueros diluidos en la solución de bloqueo. A continuación, la membrana se lavó con PBS-0,05% Tween 20. Los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron mediante la incubación con anti-Ig conjugado con peroxidasa y tras lavar la membrana nuevamente con PBS 0,1% Tween 20, se revelaron con el sustrato luminiscente ECL (100mM Tris-HCl pH=8,5, 800mM luminol, 5mM ácido cumárico y 0,03% H₂O₂) detectándose las bandas por autoradiografía.

III.2.5.3. Inmunofluorescencia

Las células se fijaron con metanol durante 5 minutos y con acetona durante 30 segundos, ambos preenfriados a -20°C, dejándose posteriormente secar a temperatura ambiente. Después de bloquear los sitios de unión inespecífica con PBS-SAB 1% (cuando el anticuerpo primario es un suero policlonal) o con PBS (para anticuerpos monoclonales), las células se incubaron con los anticuerpos correspondientes durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron con PBS e incubaron con un anticuerpo secundario anti-Ig de ratón conjugado con fluoresceína (Amersham-

Biosciences) diluido en PBS. Por último las células se lavaron con PBS y H₂O y se observaron en un microscopio Zeiss equipado con un sistema de fluorescencia.

III.2.5.4. Microscopía electrónica

Las proteínas se absorbieron a rejillas de carbono y se tiñeron con 1% silicotungtato sódico a pH7,0. Para visualizar las muestras se utilizó un microscopio electrónico Jeol 1200 a 100kV. Las micrografías se tomaron con una dosis mínima, en condiciones de desenfoque que permitieron una resolución de 1,5nm, aproximadamente (Wrigley, 1986).

III.2.6. Estudios bioinformáticos

III.2.6.1. Alineamiento de secuencias

Los alineamientos de las secuencias utilizado para este trabajo se realizó con el programa *BLAST 2 Sequences* del paquete informático *ExpASy Proteomics Server* (Tatusova, 1999), o utilizando el programa *MultAlin* de la plataforma bioinformática diseñada por *Genopole Toulouse-Midi-Pyrénées* (Corpet, 1988).

III.2.6.2. Perfil de hidrofobicidad de la proteína F del MNVH

Para conocer el perfil de hidrofobicidad de la proteína F se utilizó el programa *ProtScale* (Gasteiger, 2005), del grupo de programas de *Expasy Proteomics Server*, que aplica el algoritmo de Kyte & Doolittle (Kyte et al., 1982) utilizando ventanas de nueve aminoácidos y solapando los valores de 8 residuos.

III.2.6.3. Determinación del punto Isoeléctrico teórico de la proteína F del MNVH

El punto isoelectrico (pI) teórico fue calculado utilizando el programa *ProtParam* (Gasteiger, 2005), del grupo de herramientas para la identificación y análisis de proteínas *ExpASy Proteomic Server*.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. CRECIMIENTO Y TITULACIÓN DEL MNVH EN CULTIVOS CELULARES

IV.1.A. Selección de la línea celular y de las condiciones para crecer el MNVH en cultivos celulares

Dado que en el laboratorio no se había trabajado anteriormente con el MNVH, se probaron diversas condiciones y líneas celulares donde se evaluó la replicación de este virus. Para esto se infectaron células HEp-2, Vero 118, BHK, BSR T7/5, o LLC-MK2 con la cepa NL/1/99 del MNVH y la infección se siguió por la aparición de efecto citopático al microscopio óptico y la aparición de células fluorescentes reveladas con un suero de cobaya anti-MNVH (suero cedido por el Dr. A.D.M Osterhaus) como se muestra en la figura IV.1 (panel A). Se llegó a la conclusión de que, si bien todos los tipos celulares eran infectados por el MNVH, el virus infectaba mejor a las células LLC-MK2. Esta línea celular se utilizó, por tanto, habitualmente para la producción de semilla de virus y extractos de células infectadas por el MNVH.

La infección del MNVH se describió como dependiente de tripsina en células tMK (cultivo terciario de riñón de mono; van den Hoogen *et al.*, 2001). Puesto que en los laboratorios no se dispone en general de este tipo de células, se decidió comprobar si el crecimiento del MNVH en células LLC-MK2 también era dependiente de tripsina. Para esto, se añadieron varias cantidades de tripsina a cultivos de LLC-MK2, a distintos tiempos después de la adsorción del virus. Como se observa en la figura IV.1, si no se agrega tripsina la infección se restringe a células individuales (panel B), es decir, el virus no se puede propagar a células vecinas. Al agregar tripsina a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ (panel C) se observó que aparecían focos de células infectadas en la monocapa, indicando que el virus era capaz de propagarse a células adyacentes.

La concentración de tripsina de 2 $\mu\text{g/ml}$ resultó ser óptima, puesto que concentraciones mayores tenían un efecto tóxico en las células. Además la infección fue más eficiente cuando cada dos días se retiró medio de cultivo de la placa (~25%) y se agregó medio nuevo con tripsina (2 $\mu\text{g/ml}$).

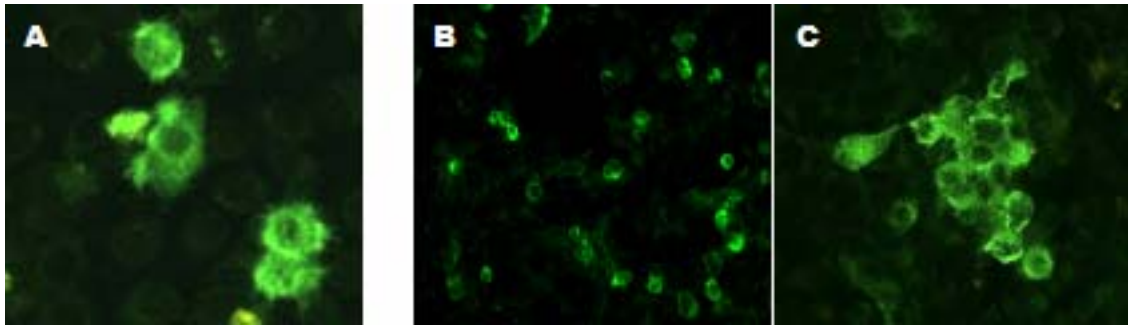


Figura IV.1. Inmunofluorescencia de células LLC-MK2 infectadas con MNVH. Las células se infectaron a una m.d.i. de 0,1uff/cel. Después de una hora de adsorción, se retiró el inóculo y se agregó medio DMEM-2,5 (A), medio DMEM-0 sin tripsina (B) o medio DMEM-0 con 2 µg/ml de tripsina (C). Las células se fijaron a las 48h y se revelaron con un suero de cobaya anti-MNVH diluído 1:100 (A) o con un pool de sueros humanos positivos para el MNVH diluído 1:200 (B y C).

El efecto citopático en las células LLC-MK2 aparece paulatinamente durante los 3-4 días posteriores a la infección por el MNVH (figura IV.2). A diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los paramixovirus, donde se observa la aparición de sincitios tras la infección, el efecto producido por el MNVH en células LLC-MK2 se caracteriza por la aparición de células redondeadas. Éstas van aumentando en número a medida que avanza la infección, dando lugar a cúmulos o grupos de células redondeadas que, finalmente se desprenden cuando la infección llega a sus estadios finales.

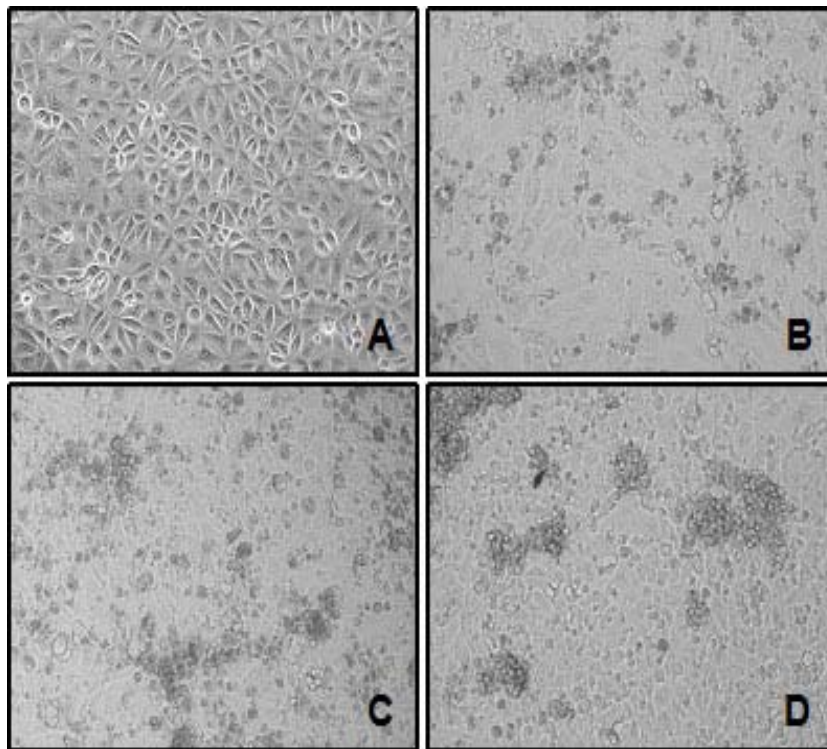


Figura IV.2. Evolución del efecto citopático en células LLC-MK2 infectadas por MNVH. Las células se infectaron con una m.d.i. de 0,1 uff/cel. Después de una hora de adsorción, se quitó el inóculo y se agregó medio DMEM-0 con 2µg/ml de tripsina. Las fotografías se tomaron con un microscopio de contraste de fases a distintos tiempos post-infección: A. 0h B. 24h, C. 48h y D. 72h.

IV.1.B. Ensayo de formación de focos infecciosos por el MNVH

Como método adicional para el seguimiento de la infección por el MNVH, así como para su titulación, se puso a punto un ensayo de formación de focos infecciosos. Para esto, células LLC-MK2 confluentes se infectaron con diluciones seriadas del MNVH. Después de una hora de adsorción, se retiró el inóculo, se lavó con medio DMEM-0 y se agregó agarosa al 0,7% en DMEM-0 conteniendo (o no) 2 μ g/ml de tripsina. A los 4 días, las células se fijaron y se revelaron con un suero anti-proteína F (descrito más adelante), como se indica en Materiales y Métodos. Las células infectadas se pusieron de manifiesto con el sustrato cromógeno 3-amino-9-etil-carbazol (AEC), que forma un producto final rojo insoluble en agua, lo que permite visualizar a las células infectadas con un color marrón rojizo, sobre un fondo claro de células sin infectar.

En la figura IV.3 se observa que las células infectadas tenían una coloración rojiza tanto en ausencia como en presencia de tripsina; sin embargo, y de acuerdo a lo observado por inmunofluorescencia, en ausencia de tripsina (panel A) la infección se restringió a células individuales, mientras que en presencia de tripsina (panel B) la infección se extendió también a células vecinas, dando lugar a la aparición de focos. Por esto, en ausencia de tripsina el conteo de células infectadas fue más tedioso y dependiente de la observación al microscopio óptico, mientras que en presencia de tripsina la formación de focos de células infectadas por MNVH facilitó el conteo a simple vista.

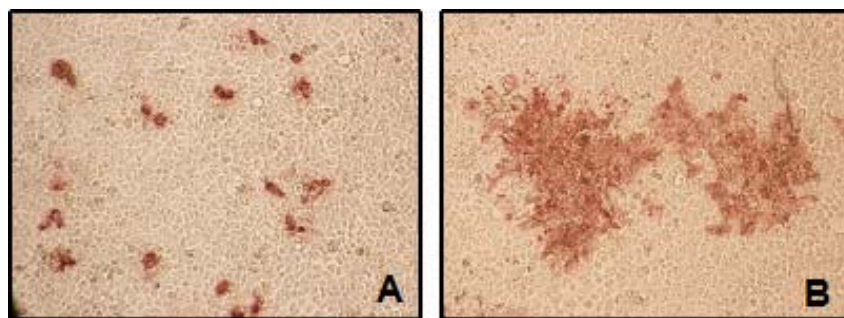


Figura IV.3. Tinción inmunohistoquímica con AEC de células LLC-MK2 infectadas con el MNVH. Células LLC-MK2 se infectaron a una m.d.i. de 0,1uff/cel. Después de una hora de adsorción, se quitó el inóculo y la monocapa celular se lavó con medio DMEM-0. A continuación se agregó DMEM-0 con agarosa al 0,7% (A) o DMEM-0 con agarosa al 0,7% y 2 μ g/ml de tripsina (B). Las células se fijaron a los 4 días y se revelaron con un anticuerpo anti-F y AEC como sustrato de la reacción colorimétrica.

Como consecuencia de los resultados presentados en este apartado, las semillas de MNVH producidas en el laboratorio se crecieron habitualmente en células LLC-MK2 en presencia de tripsina durante 5-6 días. Cada dos días se retiró el 25% de medio de la placa y se agregó medio DMEM-0 fresco con 2µg/ml de tripsina. Los títulos obtenidos fueron del orden de 10^5 uff/ml.

IV.2. CLONAJE, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA F DEL MNVH

En primer lugar se sintetizaron los oligonucleótidos con la secuencia del gen que codifica para la proteína F y a los sistemas en los que se quería clonar el gen (Tabla III.2 de Materiales y Métodos). Entonces se realizó la puesta a punto del protocolo de RT-PCR para determinar la temperatura de hibridación y concentración salina óptimas. Una vez puesto a punto este protocolo, se realizó la amplificación del gen de la proteína F del MNVH, a partir del RNA total obtenido de células infectadas por el virus como se indica en Materiales y Métodos.

El producto de estas RT-PCRs se clonó en los plásmidos pGEM-4 (Promega), pTM1 (Moss et al., 1990), y pRB21 (Blasco et al., 1995) como se indica en el esquema de la figura IV.4. El plásmido pGEM-4 se seleccionó por ser un vector de clonaje que tiene un tamaño pequeño (2781pb), lo que permite una alta eficiencia de transformación y el clonado de genes de gran tamaño, y un sitio de clonaje múltiple reconocido por numerosas enzimas de restricción. Además tiene las secuencias del promotor y terminador de SP6 y T7 en sentido opuesto y flanqueantes al sitio de clonaje múltiple, lo que permite una síntesis controlada de RNA positivo (mRNA) o negativo de acuerdo a la polimerasa que se utilice; o simplemente la secuenciación del gen de interés. pTM1 es un vector de expresión bajo el control de la RNA polimerasa del fago T7, que posee la región 5' no traducible (5'UTR) del virus de la encefalomiocarditis (ECMV) después del promotor de la polimerasa T7, lo que hace que los transcritos de este plásmido sean más estables y traducibles por un mecanismo independiente de CAP (Elroy-Stein et al., 1989; Fuerst et al., 1989), aumentando considerablemente la expresión de la proteína de interés en comparación con, por ejemplo, el plásmido pGEM-4. Por último el pRB21 es un plásmido que contiene un promotor fuerte temprano/tardío del virus vaccinia y unas regiones del

mismo virus flanqueantes para originar un virus vaccinia recombinante por recombinación homóloga que lleve la proteína de interés.

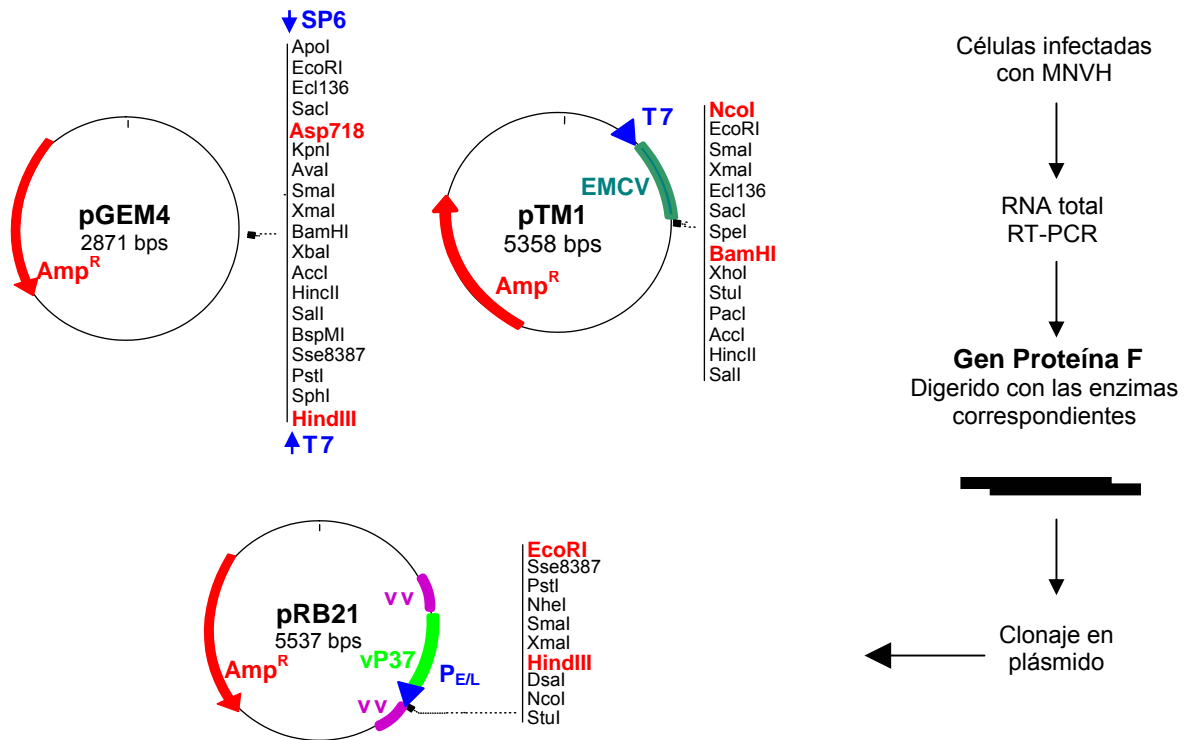


Figura IV.4. Esquema del clonaje del gen de la proteína F del MNVH en los distintos vectores. El producto de la amplificación por RT-PCR se digirió con las enzimas de restricción seleccionadas en cada uno de los plásmidos en los que fue clonado. Estas enzimas se muestran en rojo en el esquema de cada plásmido. El procedimiento de clonaje se detalla en Materiales y Métodos (apartado III.2.2). **Amp^R**: resistencia a ampicilina; **EMCV**: 5'UTR del virus de la encefalomiocarditis; **vv**: regiones del virus vaccinia utilizadas en la recombinación homóloga para el desarrollo de virus vaccinia recombinante; **vp37**: gen de la proteína P37 del virus vaccinia; **P_{EL}**: promotor temprano tardío del virus vaccinia; **T7** o **SP6**: promotores T7 o SP6.

Al secuenciar el gen de la proteína F clonado en el plásmido pRB21, se observó que tenía algunos cambios con respecto a la secuencia del gen F clonado en los plásmidos pGEM-4 y pTM1. Además, tanto las secuencias del gen F clonado en los plásmidos pTM1 y pGEM-4 como en el pRB21 tenían cambios respecto a la secuencia obtenida a partir de clones infectivos rescatados a partir de la cepa NL/1/99, que fue la que se utilizó en el clonaje, o la NL/1/00 (R. Fouchier, comunicación personal), que pertenece al otro subtipo. En la Tabla IV.1 se indica la secuencia obtenida para dichos clones infectivos, así como también los cambios observados en la secuencia del gen de la proteína F clonada en los diferentes vectores. Como puede observarse en dicha tabla, se detectaron cuatro cambios no conservativos en las posiciones 27, 197, 280 y 354. Puesto que los cambios de aminoácidos en estas posiciones correspondían a residuos que

estaban conservados en las cepas NL/1/99 y NL/1/00, que representan dos subtipos distintos del MNVH, se consideró que dichos cambios podrían influir de forma significativa en las propiedades de la molécula y por ello se corrigieron mediante mutagénesis dirigida como se indica en la Tabla IV.1. Así la secuencia del gen F fue idéntica en todos los vectores y se correspondía con la secuencia obtenida en el laboratorio del Dr. Osterhaus, cuya funcionalidad se había comprobado por rescate de virus infectivo, a partir de una copia de cDNA completo del genoma del MNVH (R. Fouchier, comunicación personal).

Aminoácido (Nº en la secuencia)	NL/1/00	NL/1/99	pTM1 / pGEM-4_F _M	pRB21_F _M
27	S	S	L -->S	S
197	N	N	N	S -->N
280	D	D	G -->D	G -->D
354	I	I	M -->I	I

Tabla IV.1. Cambios de aminoácidos entre los distintos plásmidos y subtipos de MNVH. En negro se indica la secuencia obtenida para cada plásmido; en rojo los cambios realizados por mutagénesis dirigida.

En nuestro laboratorio se construyó un mutante de la proteína F del VRSH que carecía de la región transmembrana (F_{TM-}, Bembridge *et al.*, 1999). Esta forma soluble de la glicoproteína F del VRSH, se comportó igual que la proteína salvaje en cuanto a procesamiento, plegamiento, oligomerización y reactividad con AcMs (Calder *et al.*, 2000), sin embargo es una forma mucho más sencilla de manejar y purificar, ya que se secreta al sobrenadante de células infectadas con estos virus vaccinia recombinantes. Asumiendo que dada la homología funcional y estructural que existe entre las proteínas F del MNVH y del VRSH, el comportamiento entre las formas completa y soluble podría ser el mismo, decidimos producir también el mutante F^{TM-} en pRB21 y el vaccinia recombinante correspondiente. Para esto se cambió en el pRB21-F el codón Gly 478 por un codón de terminación por mutagénesis dirigida.

Después de realizar la mutagénesis dirigida se comprobaron por secuenciación los cambios introducidos y los plásmidos obtenidos se emplearon en un ensayo de expresión transitoria (no mostrado) para comprobar por inmunofluorescencia que se expresaban las distintas formas de la proteína F.

Una vez que se comprobó que todos los plásmidos tenían la secuencia correcta

y que todos expresaban las distintas formas de la proteína F (F o F^{TM-}), se procedió a la construcción de los virus vaccinia recombinantes para ambas formas, tal como se describe en Materiales y Métodos. Este tipo de vectores tienen dos ventajas para nuestro propósito. Primero, los transcritos de los virus vaccinia recombinantes no son expuestos a las enzimas celulares de *splicing*; esto evita el riesgo de un procesamiento inapropiado que podría ocurrir con secuencias que como el gen de la proteína F han evolucionado exclusivamente en el citoplasma. Segundo, las glicoproteínas de membrana F y G del VRSH, un virus estrechamente relacionado al MNVH, que han sido expresadas utilizando este sistema fueron indistinguibles de las producidas por una infección por VRSH en lo que respecta a glicosilación, puentes disulfuro, distribución celular, expresión en la superficie celular, antigenicidad o movilidad electroforética (Ball et al., 1986; Olmsted et al., 1986; Stott et al., 1987; Wertz et al., 1987).

Cuando se obtuvieron los virus vaccinia recombinantes vv-F y vv-F^{TM-}, se comprobó por inmunofluorescencia la expresión de las dos formas de la proteína. Como se observa en la figura IV.5 tanto el vaccinia vv-F como el vv-F^{TM-} expresaron la proteína F. Entonces se seleccionó una placa de cada recombinante y se realizó la producción y titulación de la semilla. El título obtenido fue del orden 10⁸-10⁹ ufp/ml para los dos virus.

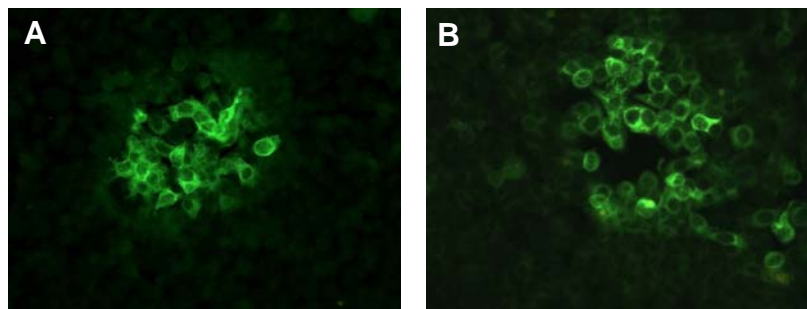


Figura IV.5. Inmunofluorescencia de células HEP-2 infectadas con el virus vaccinia recombinante vv-F (A) y vv-F^{TM-} (B). Las células se infectaron a una m.d.i. de 0,1ufp/cel. Veinticuatro horas post-infección las células se fijaron y se revelaron con un pool de sueros humanos, positivos para el MNVH, diluido 1:200.

IV.2.A. Purificación de la proteína F^{TM-} por intercambio iónico y filtración en gel

Una vez que se obtuvieron los virus vaccinia recombinantes se procedió a la purificación de la proteína F^{TM-}, para conseguir una muestra lo suficientemente pura que nos permitiera su observación al microscopio electrónico y su inoculación en conejos para obtener sueros policlonales anti-F.

Este mutante, como se comentó en la introducción, al carecer de la región transmembrana es secretado al sobrenadante, por lo que su manejo y purificación es teóricamente más sencillo que a partir de extractos celulares o de membranas de células infectadas. Así el sobrenadante de células HEp-2 infectadas con el vaccinia F^{TM-} se recogió y concentró mediante un sistema de filtración con flujo tangencial a través de membranas con un tamaño de poro de 100.000 MWCO (“Molecular weight cut-off” o “peso molecular corte”. Sartorius) 100-200 veces, hasta un volumen final de 10-30ml.

En un primer momento y dado que no contábamos con anticuerpos monoclonales para una purificación por columna de inmunoafinidad, se decidió intentar una purificación por cromatografía de intercambio iónico (columnas Vivapure, Vivascience) y posterior cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel (columna de Superosa 12HR 10/30, GE Healthcare). La primera nos permitiría una purificación de la F^{TM-} aprovechando la diferencia de carga que tiene cada una de las diferentes proteínas en una preparación cualquiera (en este caso sobrenadante concentrado) a un pH determinado. La segunda nos permitiría separar por tamaño las diferentes proteínas además de arrojar una aproximación de tamaño para aquellas proteínas globulares en preparaciones homogéneas.

Para determinar cuáles eran las condiciones más eficientes de purificación por intercambio iónico se evaluaron diferentes tampones utilizando tanto columnas de intercambio catiónico como aniónico (Vivapure S y Q, respectivamente). Siguiendo las indicaciones de la casa comercial, se probaron tampones diferentes y varios rangos de pH. Estos tampones fueron: AcNa 20mM (pH= 4.0; 4.5; 5.0; 5.5), Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 20mM (pH= 6.0; 6.5; 7.0; 7.5) y Tris-HCl 20mM (pH= 7.5; 8.0; 8.5). La proteína F^{TM-} se unió mejor a una columna de intercambio aniónico (Vivapure Q) en el tampón Tris-HCl 20mM pH=7.5, y se eluyó a una concentración de NaCl que permitió su separación de la seroalbúmina bovina (SAB), un contaminante mayoritario proveniente del medio de cultivo celular.

La figura IV.6 muestra un SDS-PAGE teñido con azul de *Coomassie* o revelado por *western blot* de una purificación tipo por intercambio aniónico, en la que el sobrenadante de células HEp-2 infectadas con el vv-F^{TM-} se concentró, dializó en el tampón Tris-HCl 20mM pH=7.5 y se aplicó a una columna de intercambio aniónico

(Vivapure Q). La elución se hizo en 3 etapas, aumentando la concentración salina (E1=100mM, E2=500mM y E3=1M NaCl), con un volumen de 500ul para cada condición por lo que la muestra además de purificarse se concentró. En los *western blot* (paneles B y C) se ve que la proteína F^{TM-} sale mayoritariamente en la fracción E1 (100mM NaCl) y en cambio la SAB sale en la fracción E2 (500mM); además por el SDS-PAGE teñido con azul de *Coomassie* se ve que la mayor parte de las proteínas contaminantes salen también en la fracción E2.

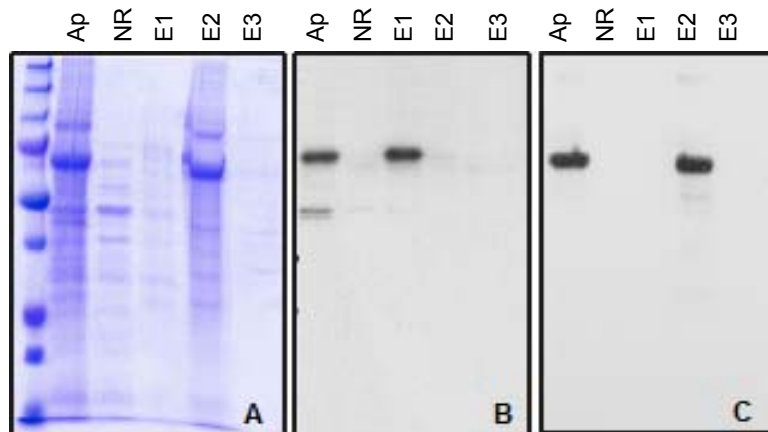
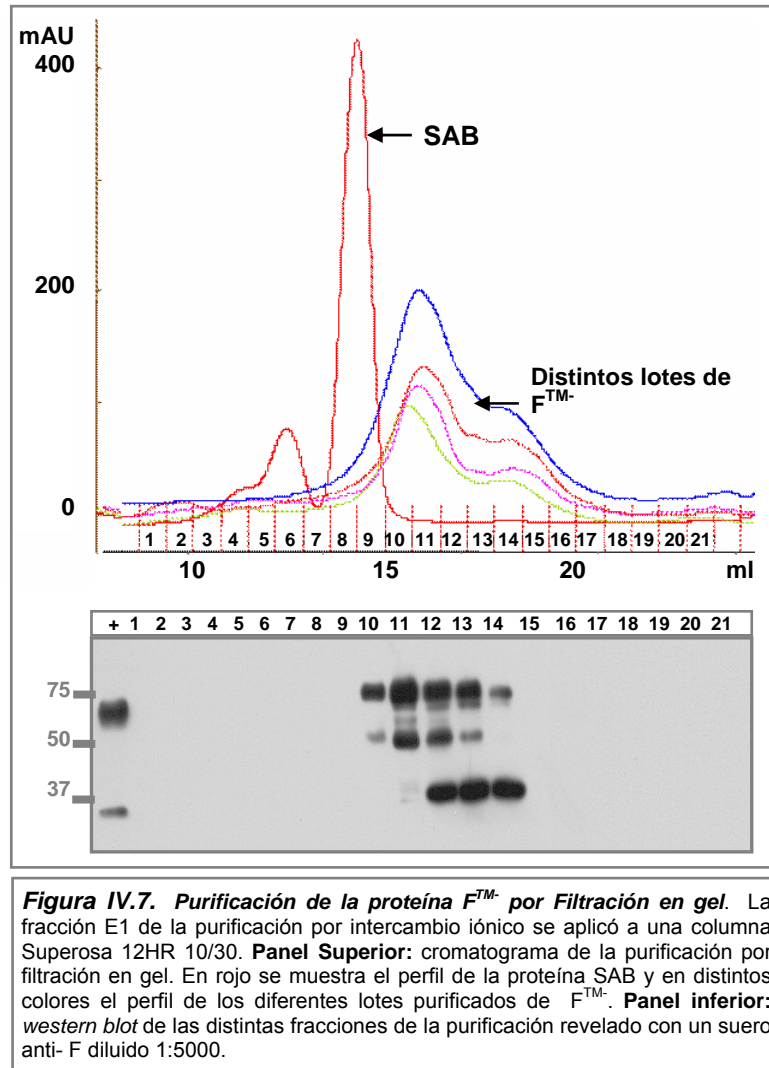


Figura IV.6. Pruebas de intercambio iónico para la purificación de la proteína F^{TM-}. Sobrenadante de células infectadas con el virus vaccinia recombinante vv-F^{TM-} se concentró (~100x), se dializó en tampón de unión (Tris-HCl 20mM pH=7.5) y se aplicó a la columna de intercambio aniónico. La elución se realizó en 3 etapas con 500ul de tampón. **Ap:** aplicado, sobrenadante concentrado. **NR:** no retenido; **E1:** tampón Tris-HCl 20mM con 100mM NaCl; **E2:** con 500mM NaCl; **E3:** con 1M NaCl. **Panel A:** SDS-PAGE teñido con Azul de *Coomassie* de la purificación. **Panel B:** *western blot* de la purificación revelado con un suero anti-F diluido 1:5000; **Panel C:** Idem panel B pero revelado con anticuerpos anti-SAB diluido 1:1000.

La fracción E1 se sometió entonces a una cromatografía de filtración en gel en una columna Superosa 12HR 10/30 (GE Healthcare) utilizando el sistema automático AKTA Purifier (GE Healthcare). Como proteína patrón se utilizó SAB, dado que conocíamos su tamaño (75KDa) y perfil de elución. En el cromatograma de la figura IV.7 se observa en rojo el perfil de la SAB, y en 4 diferentes colores las curvas pertenecientes a 4 purificaciones diferentes. Al contrario de lo que se esperaba, basándonos en el perfil de elución del mutante F^{TM-} del VRSH (que por su conformación trimérica tiene un tamaño de ~220KDa y eluye antes que la SAB), la proteína F^{TM-} del MNVH eluyó después de la SAB, como si tuviera un tamaño menor.

Al observar la fracción 11 de esta purificación al microscopio electrónico no se pudo distinguir ninguna molécula de proteína F (no mostrado). Además, la muestra tenía un elevado grado de impureza para realizar este tipo de ensayos.



IV.2.B. Purificación de la proteína F^{TM-} 6His por cromatografía de afinidad por iones metálicos y filtración en gel

Dado que no conseguimos por intercambio iónico y filtración en gel, una preparación lo suficientemente pura que nos permitiera entre otras cosas su observación al microscopio electrónico, decidimos agregar una cola de 6 histidinas al mutante sin la región citoplasmática (F^{TM-}), para poder purificar esta proteína por cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC) y un paso posterior de filtración en gel. El mutante F^{TM-}6His se obtuvo por mutagénesis dirigida agregando un *tag* de 6 histidinas al plásmido pRB21-F^{TM-} y originando entonces el vaccinia correspondiente. La purificación de F^{TM-}6His se realizó a través de columnas de Ni²⁺ (HisTrap HP 1ml, GE Healthcare), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Para esto, el sobrenadante obtenido de células

infectadas con el virus vaccinia recombinante se concentró, dializó en un tampón de unión recomendado por GE Healthcare (20mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 500mM NaCl 20mM Imidazol) y se inyectó en la columna utilizando el sistema automático AKTAPrime Plus. Se evaluó hacer la elución con un gradiente de 20 a 500mM de Imidazol (no mostrado), pero se comprobó que los mismos resultados se obtenían haciendo una elución en etapas (100mM, 300mM y 500mM). La purificación en etapas requirió además menos tiempo.

En la figura IV.8 se muestra el perfil cromatográfico obtenido y el seguimiento de la purificación por *western blot*. Como puede observarse, la proteína se une a la columna, y se eluye principalmente con 100mM de Imidazol, aunque una pequeña parte de la proteína queda retenida y sale a 300mM.

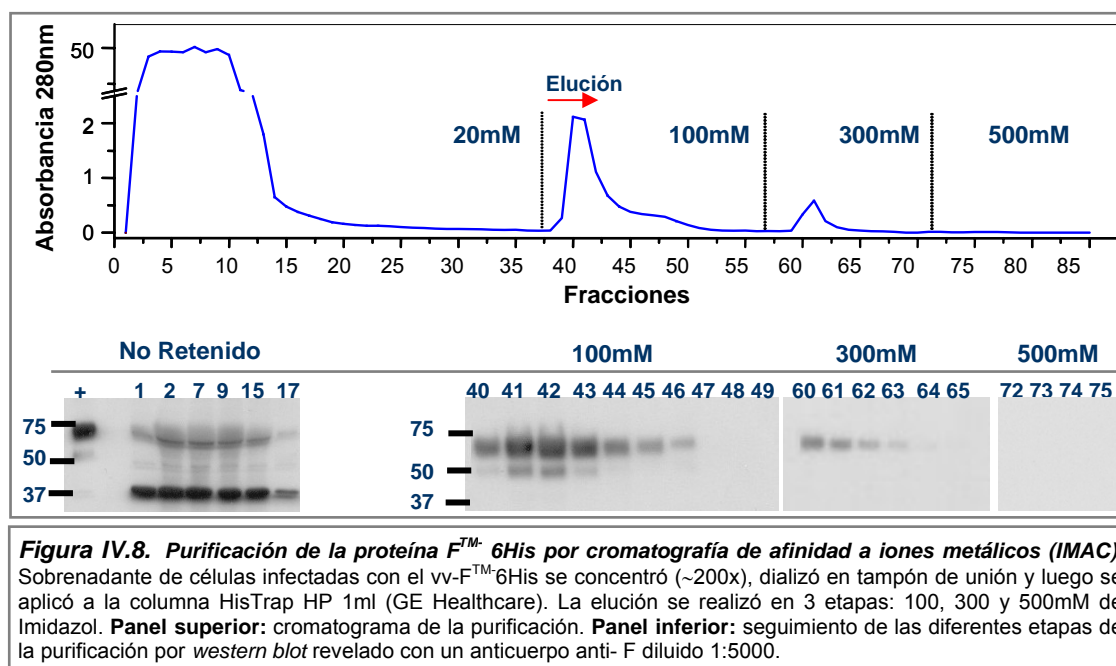


Figura IV.8. Purificación de la proteína FTM-6His por cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC). Sobrenadante de células infectadas con el vv-FTM-6His se concentró (~200x), dializó en tampón de unión y luego se aplicó a la columna HisTrap HP 1ml (GE Healthcare). La elución se realizó en 3 etapas: 100, 300 y 500mM de Imidazol. **Panel superior:** cromatograma de la purificación. **Panel inferior:** seguimiento de las diferentes etapas de la purificación por *western blot* revelado con un anticuerpo anti- F diluido 1:5000.

Las fracciones que contienen proteína FTM-6His se juntaron y se sometieron entonces a una cromatografía de filtración en gel en una columna de Superosa 12HR10/30 (GE Healthcare). Como puede observarse en el perfil de dicha cromatografía (figura IV.8) la preparación de proteína FTM-6His se resolvió en tres picos. El primer y segundo pico (por orden de elución) se corresponden con los dos picos que habitualmente se observan para la FTM- del VRSH (perfil en azul), y que por microscopía electrónica se vio que corresponden a proteína agregada o en forma trimérica respectivamente. El tercer pico podría corresponderse con la forma monomérica de la

proteína F^{TM-} o con una fracción considerable, aunque no se detecte por *western blot*, de SAB. Estos 3 picos se corrieron en un SDS-PAGE 10% y se tiñeron con azul de *Coomassie* o se electrotransfirieron a una membrana de Inmobilon para hacer un *western blot* (panel derecho, figura IV.8). Aunque en el *western blot* se observa que las tres fracciones contienen proteína F^{TM-} , el SDS-PAGE muestra que la composición de cada fracción es muy diferente. La fracción A, que podría corresponder a proteína agregada, tiene muchas impurezas. La fracción B y la fracción C tienen un grado de pureza mucho mayor y tienen una apariencia similar, aunque la banda mayoritaria tiene una movilidad ligeramente inferior en la fracción C.

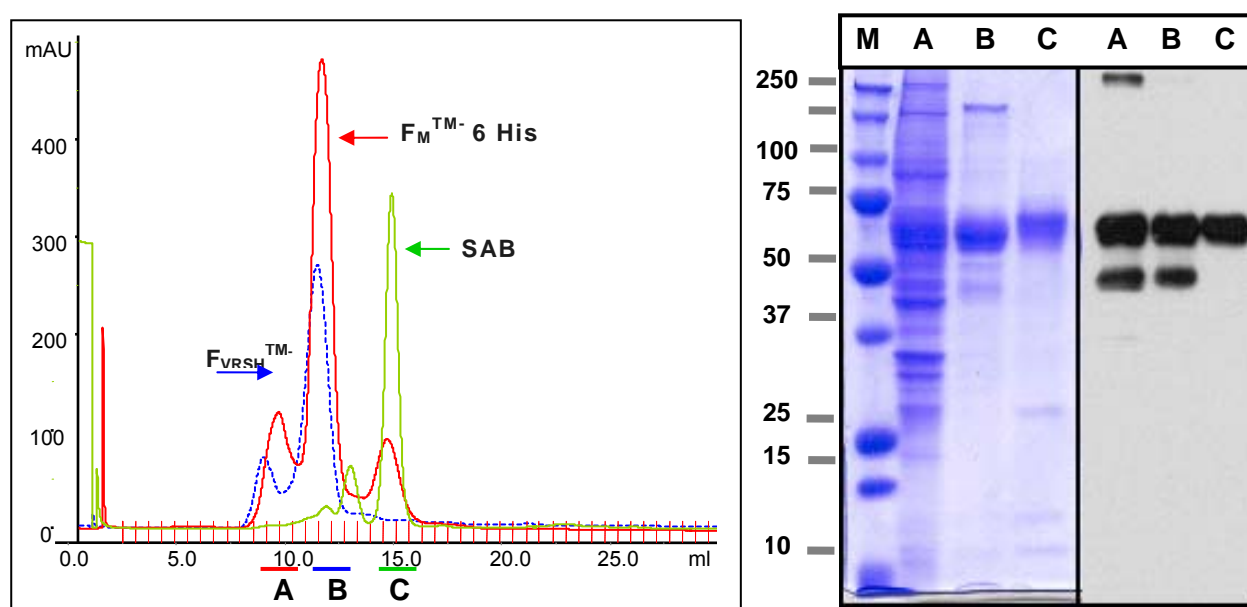


Figura IV.8. Purificación de la proteína F^{TM-} 6His por cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC) y filtración en gel (FG). Las fracciones de la purificación por IMAC que contenían proteína F^{TM-} 6His, se concentraron y se aplicaron a una columna de Superosa 12HR 10/30 (GE Healthcare). **Panel izquierdo:** cromatograma de la purificación en FG de las fracciones de la purificación por IMAC de F^{TM-} 6His. En azul se muestra el perfil de la proteína homóloga F^{TM-} del VRSH, en verde el perfil de la SAB y en rojo el de la proteína F^{TM-} 6His del MNVH. **Panel derecho:** SDS-PAGE teñido con azul de *Coomassie* y *western blot* revelado con un suero anti- F diluido 1:5000, de los 3 picos de elución obtenidos en la purificación.

IV.3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA F DEL MNVH

IV.3.A. Observación al microscopio electrónico de la proteína F^{TM-} 6His purificada

Las 3 fracciones de proteína F^{TM-} 6His purificadas en el apartado anterior se tiñeron por tinción negativa (apartado III.2.5.4) y se observaron al microscopio electrónico. En la fracción A, tal como se esperaba por lo observado en el SDS-PAGE, no pudieron diferenciarse partículas de proteína F^{TM-} 6His del fondo por la cantidad de impurezas que

había (no mostrado). En la fracción C tampoco fue posible distinguir moléculas de proteína $F^{TM-6His}$, pero en este caso, porque la población proteica tenía un tamaño pequeño para el nivel de resolución de la técnica (no mostrado). En esta fracción podría haber proteína $F^{TM-6His}$ en forma monomérica o SAB, que por su tamaño no se resuelven con este tipo de tinción. En cambio, la fracción B tuvo una pureza y homogeneidad suficiente como para permitir detectar campos en los que las partículas individuales se encontraron lo suficientemente dispersas, por lo que se realizó la adquisición de micrografías. La figura IV.9 muestra varios campos de las micrografías tomadas sobre la fracción B, que permiten discernir sin dificultad partículas individuales de proteína $F^{TM-6His}$ (remarcadas en verde). Cabe destacar que aunque la proteína se encontró mayoritariamente no agregada, en alguna micrografía se observa la agregación de las moléculas de proteína en forma de roseta (remarcadas en rojo).

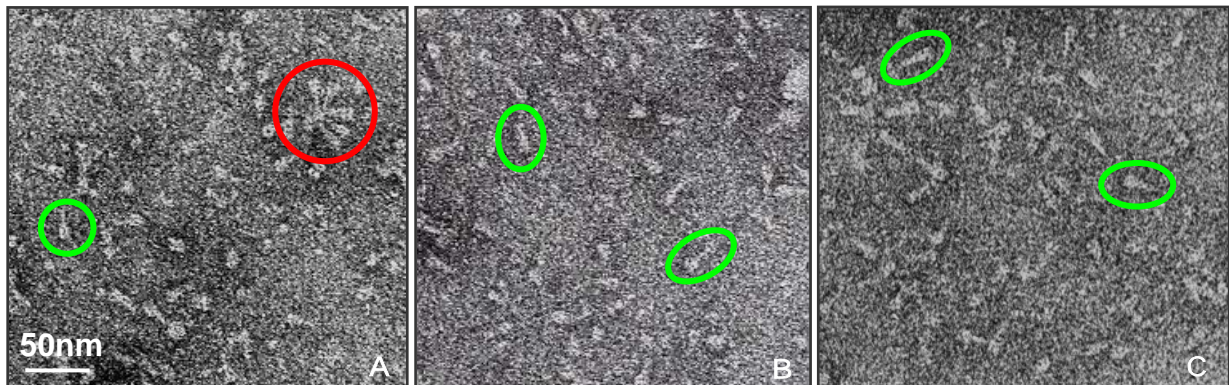


Figura IV.9. Visualización al microscopio electrónico de proteína $F_m^{TM-6His}$ purificada por IMAC y FG. La fracción B de la purificación de la proteína $F_m^{TM-6His}$ purificada por IMAC y filtración en gel se tiñó por tinción negativa como se detalla en Materiales y Métodos y se observó al microscopio electrónico. Las micrografías se tomaron a 50.000 aumentos. En verde se resaltan las moléculas individuales de proteína $F^{TM-6His}$. En la foto A se observa una roseta señalada en rojo.

IV.3.A.1. Procesamiento de imágenes y reconstrucción de un volumen 3D del ectodominio de la proteína F del MNVH

Con el fin de obtener un detalle mayor de la estructura del ectodominio del trímero de la proteína $F^{TM-6His}$, las micrografías se digitalizaron y mediante diferentes paquetes de programas informáticos (XMIPP, EMAN, SPIDER) se obtuvo la imagen promedio del trímero. Posteriormente se realizó la reconstrucción tridimensional de la estructura del mismo. Para ello se seleccionaron 9953 imágenes del trímero de $F^{TM-6His}$ (Panel A, figura IV.10), que se sometieron a un proceso de clasificación usando un algoritmo basado en métodos de máxima probabilidad (del inglés "*maximun likelihood*")

implementado en XMIPP (Panel B, figura IV.10). Dada la calidad de la muestra y de las micrografías obtenidas, todas las imágenes pudieron ser utilizadas para un alineamiento y promediado de imágenes, lo que produjo un gran incremento de la relación señal/ruido, generando una imagen media que muestra en detalle la proteína (Panel C, figura IV.10).

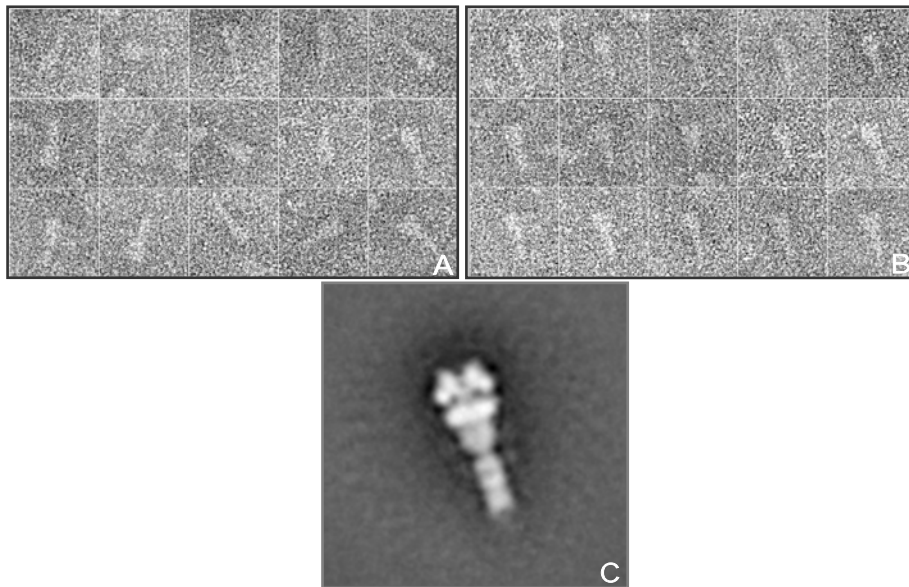


Figura IV.10. Selección, clasificación y procesamiento de imágenes. Panel A: partículas individuales del trímero de FTM6His seleccionadas de las 8 micrografías digitalizadas del microscopio electrónico. Panel B: clasificación y alineamiento de las partículas. Panel C: promedio bidimensional originado a partir de la colección de imágenes.

Este grupo de partículas homogéneas pudieron entonces ser utilizados para generar un primer modelo tridimensional mediante el paquete de programas EMAN. Una vez generado dicho modelo se realizó un refinamiento iterativo de la estructura usando los algoritmos implementados en el programa SPIDER hasta que se alcanzó una convergencia máxima, momento a partir del cual, las vueltas de refinamiento ya no mejoran el modelo. Cabe aclarar que una ventaja significativa de esta proteína es que tiene un eje de simetría tres, esto es, tiene 3 caras indistinguibles entre sí, por lo que los datos que se consiguen para una cara, en realidad están definiendo también las otras dos. Esto hace que la cantidad de imágenes se multiplique por 3. La resolución final para la estructura 3D obtenida, que se muestra en la figura IV.11, fue de 14 Å.

En el volumen 3D obtenido se observa claramente lo comentado acerca del grado de simetría 3, que se corresponde con que la proteína F sea un homotrímero. La estructura tiene un tamaño aproximado de 17nm de longitud y en ella se pueden diferenciar 3 zonas bien definidas a las que llamamos cabeza, en la zona distal y de

aproximadamente 6,5nm de longitud por 7nm de ancho; seguido por un cuello de 2nm de extensión que se encuentra conectado al tallo, de 7,8nm de longitud. Además se distinguen claramente un canal axial y 3 canales radiales que se comunican con dicho canal.

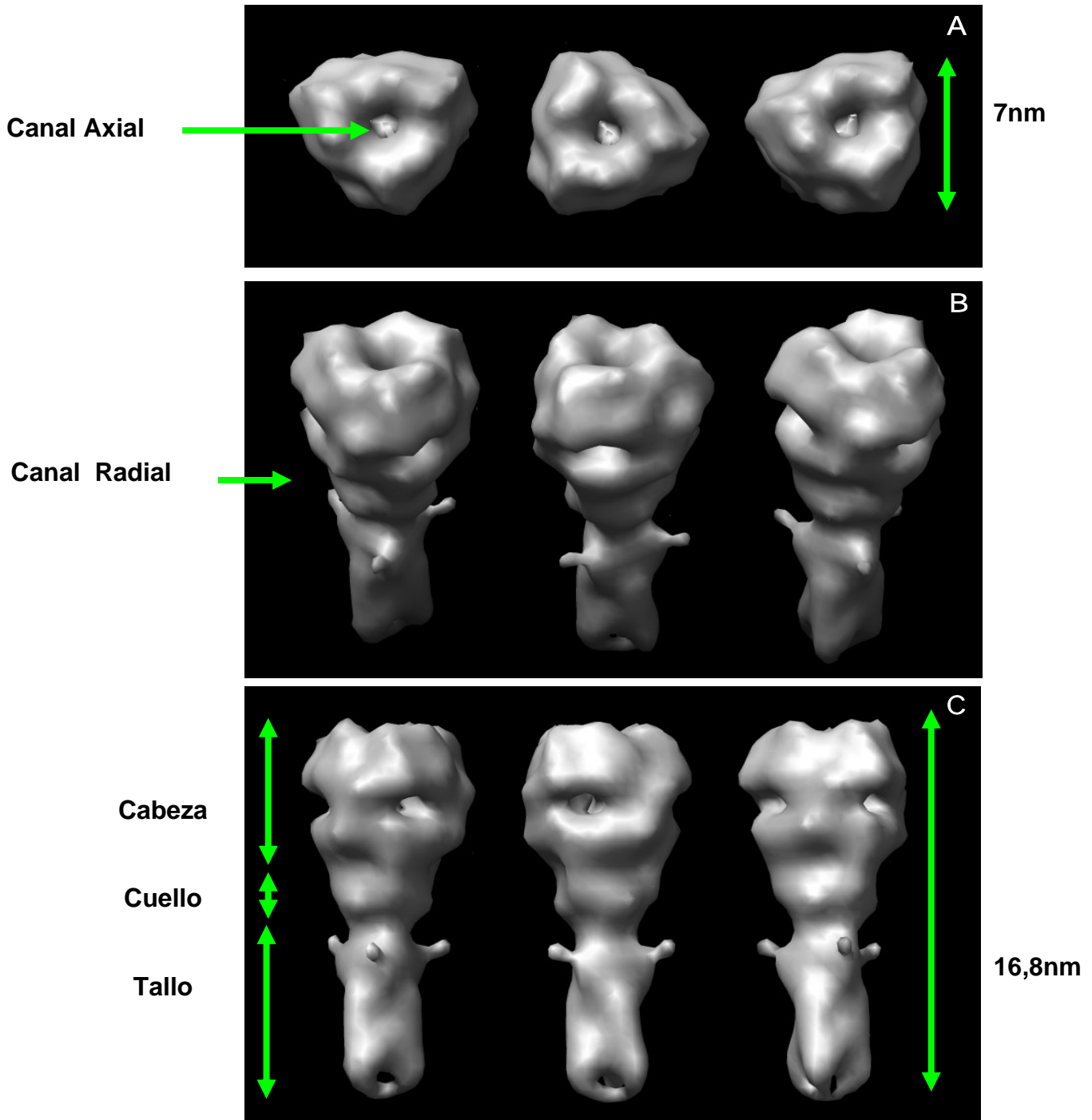


Figura IV.11. Representación del volumen de la reconstrucción 3D del ectodominio de la proteína F^{TM} del MNVH realizada a partir de micrografías de microscopio electrónico a una resolución de 14Å. En la figura se muestran 3 vistas del trímero rotado 90° y 135° (respectivamente de izquierda a derecha). En el **panel A** se muestra una vista superior del trímero, en el **panel B** una vista lateral con una leve inclinación, y en el **panel C** una vista lateral.

IV.3.B. Modelo informático de la estructura tridimensional de la proteína F

Como método de aproximación alternativo a la caracterización estructural por microscopía electrónica y procesamiento de imágenes, se realizaron también modelos informáticos de la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína F del MNVH. Tomando como base, la estructura tridimensional de la proteína F del virus de la parainfluenza 3 (Yin et al., 2005) en el que se propone es el estado post-fusión, se modeló la estructura tridimensional del ectodominio de la proteína F del MNVH en este supuesto estado post-fusión (figura IV.12). Por otro lado, teniendo en cuenta las coordenadas de la proteína F del virus de la parainfluenza 5 (VPI5) cuya estructura tridimensional se ha resuelto por difracción de rayos X de los cristales obtenidos (Yin et al., 2006), y que se propone está en un estado pre-fusión (Connolly et al., 2006) se modeló también la estructura tridimensional del ectodominio de la proteína F del MNVH en este supuesto estado pre-fusión (figura IV.13).

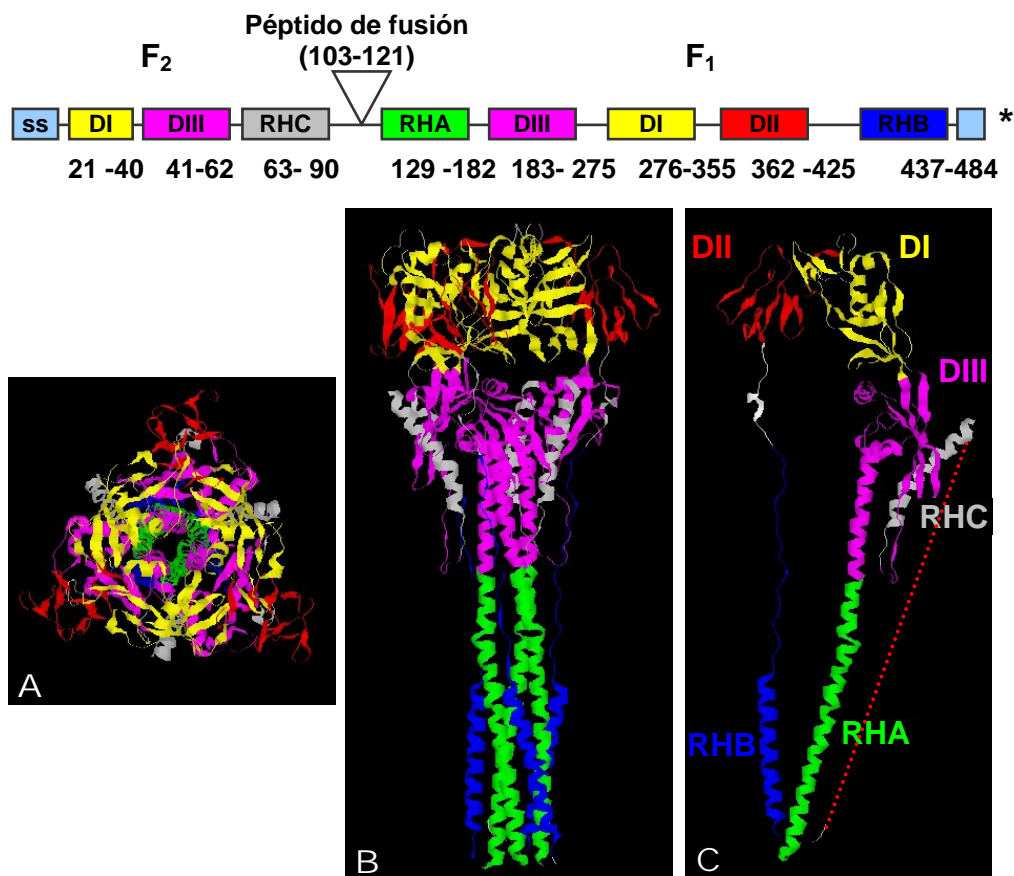


Figura IV.12. Modelo de la estructura tridimensional de la proteína F del MNVH "post-fusión". En la parte superior del esquema se indican los distintos dominios que se observan en la estructura con el mismo color. En las figuras se observan una vista lateral del trímero (B) o del monómero (C) y una vista superior del trímero (A). Este modelo carece de los aminoácidos que corresponden al sitio de corte y al péptido de fusión, se indica en punteado su potencial ubicación.

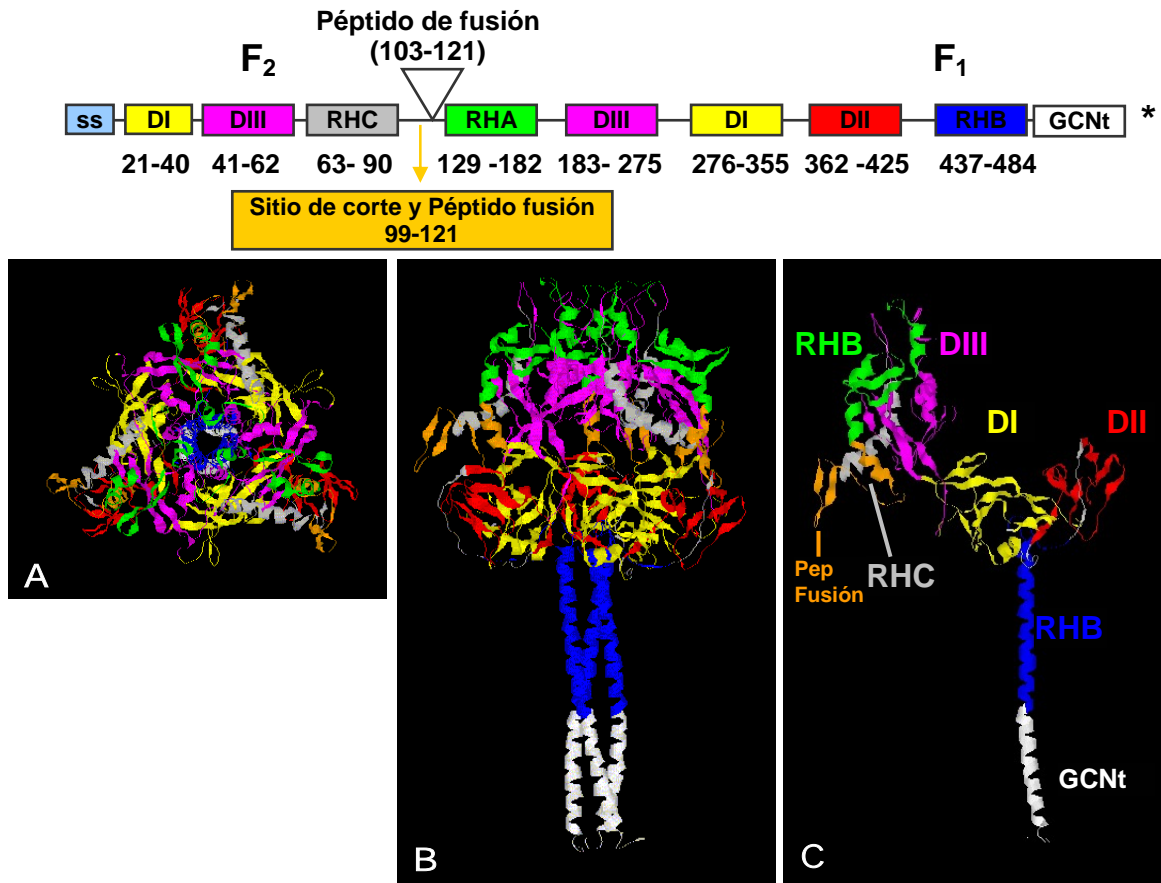


Figura IV.13. Modelo de la estructura tridimensional de la proteína F del MNVH "pre-fusión". En la parte superior del esquema se indican los distintos dominios que se muestran en la estructura con el mismo color. En las figuras se observan una vista lateral del trímero (B) o del monómero (C) y una vista superior del trímero (A). Este modelo muestra en naranja el segmento correspondiente al sitio de corte y al péptido fusión, además de una extensión de la región heptádica B en blanco (GCN) que corresponde a una estructura estabilizadora que se utilizó para purificar esta proteína (Yin *et al.*, 2006).

Una diferencia importante entre ambos modelos, aparte de que cada uno correspondería a un estado funcional diferente de la proteína, es que en el primero (post-fusión), no se tenían las coordenadas del segmento correspondiente al sitio de corte y al péptido de fusión, segmento que sí pudo resolverse en la estructura de la proteína F del parainfluenza 5 (segmento en naranja en la figura IV.13).

Para la construcción de los modelos informáticos, se hizo en primer lugar un alineamiento de las secuencias de las proteínas de fusión de VPIH3 y VPI5 con la de la proteína F del MNVH, y un análisis informático predictivo por regiones posterior para buscar homologías estructurales. Posteriormente se intercambiaron los aminoácidos de la proteína F de la que se tienen las coordenadas por los aminoácidos de la proteína F del MNVH, originando un archivo ".pdb" (protein data base) que contiene la posición de cada átomo que conforma a la proteína en un eje de coordenadas tridimensional. Este archivo puede observarse y analizarse con cualquier programa de cómputos para visualización

de proteínas (Rasmol, SPDBViewer, Chimera, Pymol, etc).

En estos modelos tridimensionales se encuentran representados los aminoácidos (20-90 y 126-483 en el post-fusión, y 20-482 en el pre-fusión) de la proteína F del MNVH. Como puede observarse en ambas figuras (IV.12 y IV.13), la proteína se ha diferenciado en dominios. Los dominios I (amarillo) y II (rojo), integrados mayoritariamente por hojas β , forman parte de la cabeza de la proteína. El segmento pequeño de α -hélices correspondiente a la RHC (gris) forma parte del cuello en el modelo post fusión, y parte de la cabeza en el modelo pre-fusión, al igual que el dominio III (magenta). La RHA (verde), compuesta por α -hélices, forma parte del tallo en la forma de post-fusión y se encuentra expuesta en la parte superior de la cabeza en la forma pre-fusión. Por último la RHB, compuesta por α -hélices, se muestra en ambos casos formando parte del tallo de la proteína.

IV.3.C. Análisis comparativo entre el modelo informático de la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína y el volumen 3D generado a partir del procesamiento de imágenes tomadas por microscopía electrónica (“*Docking*”)

Como se comentó en la introducción, a pesar del porcentaje relativamente bajo de identidad de secuencia con otros paramixovirus, la proteína F del MNVH revela las características típicas de una proteína de fusión de acuerdo a lo descrito para las proteínas F de los miembros de la familia *Paramixoviridae* (Morrison, 1988). Por otra parte, aunque las proteínas F de los Paramixovirus tienen una elevada homología estructural, cada una de ellas tendrá seguramente diferencias locales en su estructura terciaria y cuaternaria debido, entre otras cosas, a diferencias en su secuencia de aminoácidos y/o longitud de secuencia, número de sitios de corte, etc. Así, es muy probable que aunque en rasgos generales este modelo se acerque a la realidad, puede que haya diferencias concretas con la estructura real de la proteína F del MNVH debido a las características intrínsecas de ésta.

Una vez obtenido el volumen 3D generado a partir de las micrografías tomadas al microscopio electrónico, éste puede utilizarse para compararlo con el modelo informático

pdb de la estructura tridimensional de la proteína. Este análisis, conocido como “*Docking*”, permitirá establecer similitudes y diferencias entre ambos, y además dar una idea de la adecuación a la estructura real del modelo informático.

El *Docking* realizado con el modelo pdb y el volumen 3D de la proteína se muestra en la figura IV.14. En éste se observa que hay una gran similitud entre ambas estructuras. Los canales radiales y axiales se corresponden, así como también la torsión observada en el tallo en lo que correspondería a la región heptádica B. Otro dato significativo es que las proyecciones que aparecen en el lateral del volumen 3D, se corresponden con lo que sería el sitio de glicosilación N172 en la estructura de coordenadas (i).

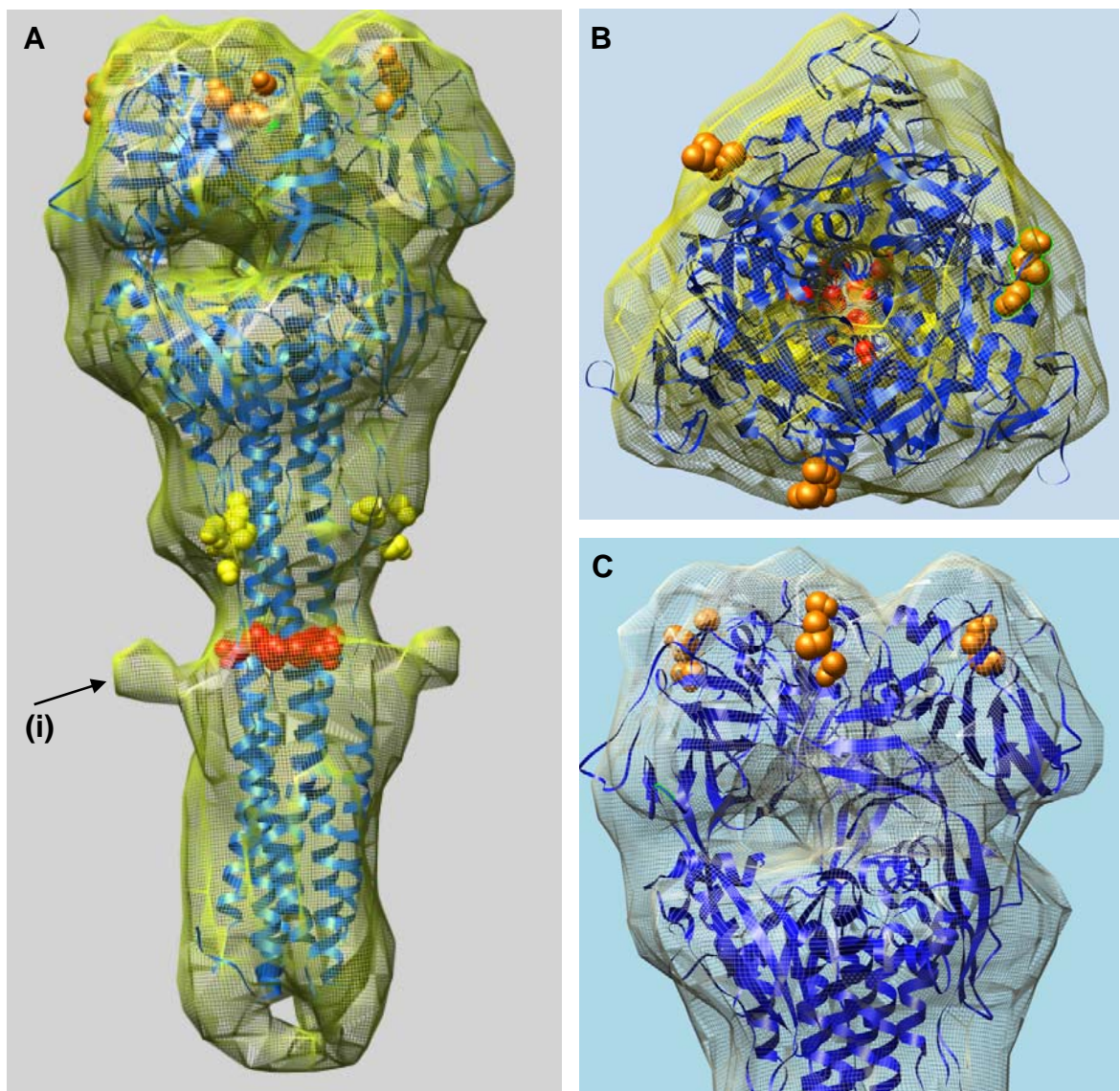


Figura IV.14. *Docking* realizado con el modelo informático de la forma post-fusión y el volumen 3D de la proteína F del MNVH obtenido a partir de la microscopía electrónica. Panel A vista lateral; panel B vista superior; panel C vista de la cabeza. En formato de bolas se muestran los sitios de glicosilación de la proteína: N57 (amarillo), N172 (rojo) y N353 (naranja). Las proyecciones que se ven en el lateral coinciden con el sitio de glicosilación N172 (i).

IV.3.D. Ensayo funcional de la proteína F del MNVH

Con la intención de comprobar la funcionalidad de la proteína F que se clonó en los distintos vectores, se pensó en poner a punto un ensayo funcional para esta proteína. Se trata de un ensayo de fusión característico de este tipo de proteínas, que permite evaluar los requisitos para su funcionalidad, simplemente transfectando el plásmido que lleva el gen que codifica para la proteína F y observando la aparición o no de células multinucleadas (sincitios). Además, este ensayo sería de mucha utilidad en el futuro para estudiar el efecto que diferentes mutaciones pueden tener en la capacidad fusogénica de la proteína.

Como se comentó al inicio de esta sección, la proteína fue clonada en el plásmido pTM1, que tiene un promotor para la polimerasa del fago T7, lo que permite, cuando se transfecta en células que expresan esta polimerasa (células BSR T7/5) la expresión del gen que lleva clonado. Aunque este plásmido se utiliza en el laboratorio para dos proteínas homólogas (las proteínas F del VRSH y del virus Sendai), y con ambas se obtiene aportando los requerimientos oportunos la formación de sincitios, con el pTM1-F de MNVH se consiguió expresar la proteína pero no la formación de sincitios. Se probó la transfección con diferentes cantidades de plásmido, y se fijaron las células hasta 72 horas después de la transfección. Dado que el MNVH necesita de la adición de tripsina al medio para producir una infección eficiente, se agregó a diferentes tiempos post-transfección una cantidad determinada de tripsina, obteniendo los mismos resultados. Además, y dado que el grupo de Rebecca Dutch (Schowalter et al., 2006) había publicado que esta proteína requería en sus ensayos pH ácido (pH=5) para fusionar, se sometió a las células transfectadas a pulsos de pH=5 (apartado III.2.2.8., Materiales y Métodos), sin embargo, tampoco se consiguió visualizar la formación de sincitios en estas condiciones.

En la figura IV.15 (paneles A y B) se muestra una inmunofluorescencia de un ensayo de formación de sincitios en células BSR T7/5 transfectadas con el pTM1-F de MNVH. Las células se sometieron al tratamiento de pH y tripsina, pero en ningún caso se observó la formación de sincitios. El resultado no varió si las células transfectadas con el pTM1-F de MNVH se trataron sólo con pH ácido o sólo con tripsina (no mostrado). Sin embargo, sí se observaron sincitios en las células BSR T7/5 transfectadas con el pTM1-F de VRSH (panel C).

Como ya se había observado en el caso de la proteína F del VRSH, la cantidad de proteína expresada en la superficie de la célula es determinante para su capacidad de fusión, de modo que el mismo gen clonado en pGEM4 no produce sincitios al ser transfectado en células, sin embargo si los produce si se encuentra clonado en pTM1.

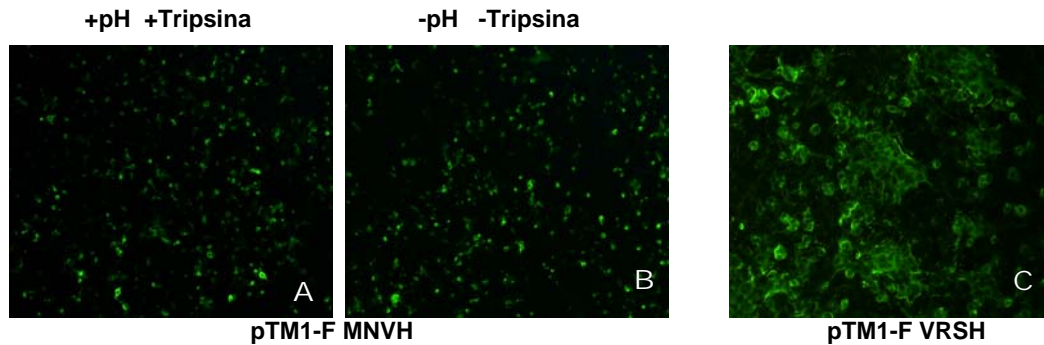


Figura IV.15. Ensayo de formación de sincitios con el pTM1-F de MNVH. Células BSR T7/5 fueron transfectadas con 1µg de pTM1-F. A las 16 horas se les agregó o no tripsina (0,5µg/ml) y se les sometió o no a 3 pulsos de pH=5 de 4 min. Cuarenta y ocho horas post-infección las células se fijaron y se revelaron con el suero anti-FTM diluido 1:1000. **Panel A:** células transfectadas con pTM1-F de MNVH, tratadas con pH y tripsina; **Panel B:** células transfectadas con pTM1-F de MNVH a las que no se les aplicó ningún tratamiento; **Panel C:** como control del procedimiento de transfección se utilizó el pTM1-F de VRSH, no se le aplicó ningún tratamiento.

Suponiendo que tal vez no se estuvieran alcanzando los niveles de expresión necesarios para que la proteína F del MNVH fusionara, se decidió subclonar el gen de la proteína en el plásmido pCAGGS (figura IV.16; Niwa *et al.*, 1991). Este plásmido tiene un alto grado de expresión porque cuenta con un promotor complejo fuerte (Miyazaki *et al.*, 1989), compuesto por una secuencia *enhancer* del citomegalovirus, el promotor fuerte de la β-actina de pollo y una secuencia intrón de este mismo gen, que hacen que las secuencias clonadas en este vector sean expresadas en mayor cantidad. En la región 3' del gen clonado tiene una secuencia poliA para estabilizar el mRNA transcrito. Por último y dado que la expresión del gen clonado, en este caso la proteína F, está ahora bajo el control de la RNA polimerasa II celular, este plásmido nos permitiría independizar el ensayo de fusión de las células BSR T7/5.

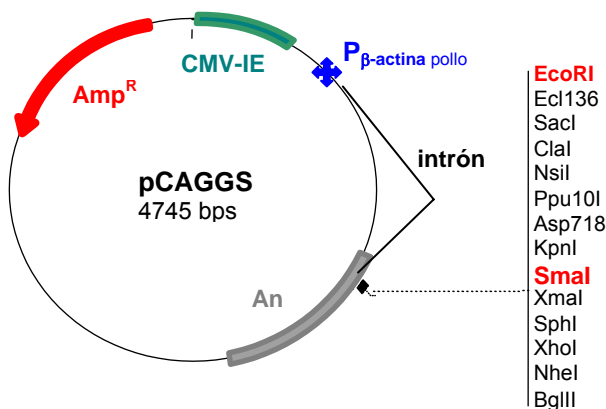


Figura IV.16. Esquema de la secuencia del plásmido pCAGGS. La proteína F del MNVH se subclonó en este plásmido utilizando las enzimas EcoRI y SmaI como se indica en Materiales y Métodos. **Amp^R:** resistencia a ampicilina; **CMV-IE:** secuencia *enhancer* del citomegalovirus; **P:** promotor β- actina; **An:** secuencia poliA.

Así, distintas cantidades de plásmido, el tiempo de expresión y los requerimientos de tripsina y/o pH se evaluaron en células Vero 118, BSR T7/5, BHK y LLC-MK2. Como resultado de esta puesta a punto se determinó que con $1\mu\text{g}$ de plásmido por cada 200.000 células se obtenía un nivel de expresión adecuado. Las células se sometieron (o no) al tratamiento de pH y tripsina.

En todos los tipos celulares se observó expresión de la proteína y formación de sincitios. La formación de sincitios estuvo supeditada a la adición de tripsina ($0,5\mu\text{g/ml}$ para las células BHK y BSR T7/5; $1\mu\text{g/ml}$ células Vero 118 y LLC-MK2). Los pulsos de pH ácido no influyeron de manera aparente en la capacidad fusogénica de la proteína F, dado que ésta fue capaz de fusionar incluso cuando no se sometió las células a dicho procedimiento (figura IV.17).

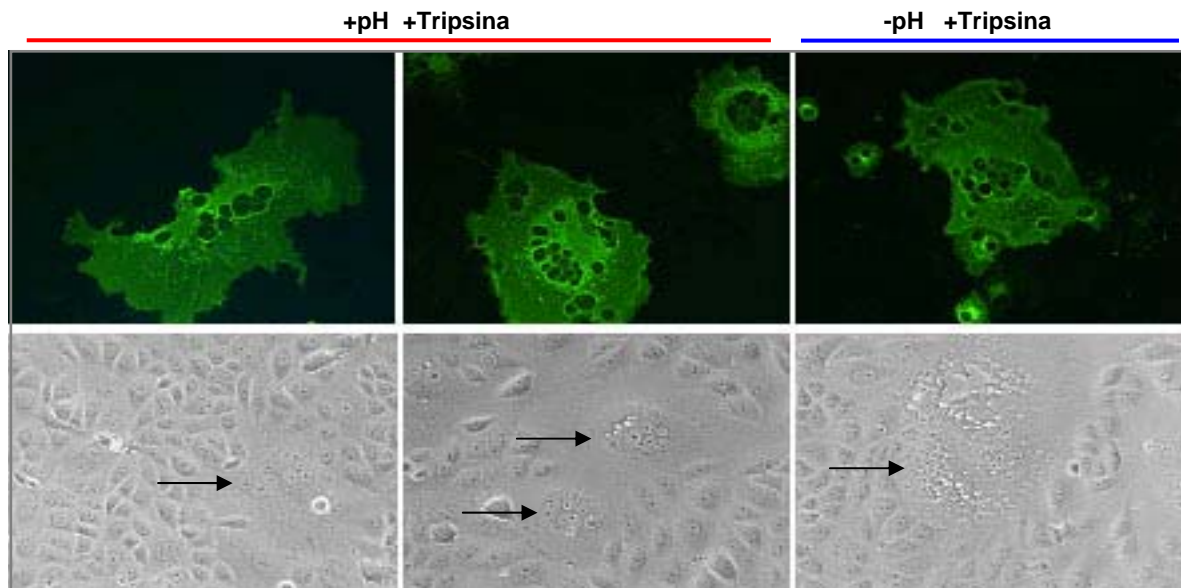


Figura IV.17. Ensayo de formación de sincitios. Células Vero 118 se transfectaron con $1\mu\text{g}$ de pCAGGS-F. A las 16 horas se les agregó DMEM-0 con tripsina ($1\mu\text{g/ml}$) y se las incubó durante 1 hora. Luego se sometió a las células a 3 pulsos de 4 minutos de $\text{pH}=5$, y nuevamente a 1 hora de medio DMEM-0 con $2\mu\text{g/ml}$ de tripsina. Se lavó con DMEM-2,5 y se incubó a 37°C durante 2 horas. Este procedimiento se repitió 3 veces. Se incubó por 16 horas más con DMEM-0 con $1\mu\text{g/ml}$ de tripsina y a las 48 horas post-transfección las células se fotografiaron al microscopio de contraste de fases (panel inferior). Luego se fijaron y se revelaron con un suero policlonal anti-F a una dilución 1:1000. Las flechas en la figura indican los sincitios formados.

IV.3.E. Análisis de la funcionalidad de la proteína F y su dependencia del pH

El grupo de Rebecca Dutch (Schowalter *et al.*, 2006) publicó recientemente que la proteína de fusión de la cepa CAN97-83, sólo mostraba funcionalidad cuando las

células transfectadas con un plásmido que expresaba la proteína F (pCAGGS-F), eran tratadas con tripsina y expuestas a pH ácido.

Dado que la cepa CAN97-83 (A2) pertenece a un linaje diferente al de la cepa a partir de la cual nosotros realizamos el clonaje de la proteína F (NL/1/99, B1), decidimos analizar más en detalle la dependencia de pH para la fusión de membranas promovida por el MNVH. Para esto, los plásmidos pCAGGS-F de las proteínas F de las cepas NL/1/00 (A1), NL/17/00 (A2), y NL/1/94 (B2) (cedidos por el Dr. Ron Fouchier, Holanda) se evaluaron también en el ensayo de formación de sincitios (apartado IV.3.F). En los paneles A y B de la figura IV.18 se muestra el resultado de dicho ensayo.

Como puede observarse en los paneles A y B de la figura IV.18, la proteína F de la cepa A1 (F_{A1-NL}) es claramente dependiente de pH, ya que fue capaz de producir grandes sincitios cuando se la expuso a pH=5, pero no cuando se la mantuvo a pH neutro. La proteína F de la cepa A2 (F_{A2-NL}) no formó sincitios en ninguna de las dos condiciones. Por su parte, las proteínas F de las cepas B (F_{B1-NL} y F_{B2-NL}) fueron independientes de pH, dado que mostraron una capacidad fusogénica similar a pH ácido o neutro. Cabe aclarar que el nivel de expresión fue similar en todos los casos y que estos mismos resultados se reprodujeron en células LLC-MK2 (no mostrado; Vicente Más, resultados no publicados).

Al comparar la secuencia de aminoácidos de la proteína F_{A2-NL} con la secuencia de la proteína F de la cepa CAN97-83 (F_{A2-CAN}), se encontró que en la cepa holandesa (F_{A2-NL}) los aminoácidos 270 y 294 eran una treonina y un glutámico respectivamente, mientras que en la cepa canadiense eran una metionina y una glicina. Para evaluar si la diferencia en los resultados obtenidos por nuestro laboratorio y el de Rebecca Dutch se debía a estos cambios de aminoácidos, se realizaron por mutagénesis dirigida los mutantes simple y doble en la cepa holandesa, para obtener una proteína F_{A2-NL} con la misma secuencia que la proteína F de la cepa CAN 97-83 (F_{A2-CAN}). Al evaluarlos en el ensayo de formación de sincitios, se observó que el mutante simple $F_{A2-NL-270M}$ se comportaba igual al tipo salvaje, esto es no inducía la formación de sincitios (no mostrado); el mutante simple $F_{A2-NL-294G}$ mostró una leve capacidad fusogénica (no mostrado), y el mutante doble $F_{A2-NL-270M,294G}$ fue capaz de formar grandes sincitios a pH ácido y no a pH neutro (paneles C y D, figura IV.18). Por lo tanto la proteína $F_{A2-NL-270M,294G}$ se volvía ahora dependiente de pH, coincidiendo con lo publicado por Rebecca Dutch.

Es interesante señalar que todas las secuencias de las proteínas F publicadas tienen una metionina en la posición 270. Además las proteínas cuya fusión es dependiente de pH (F_{A1-NL} y la proteína F_{A2-CAN}) tienen en la posición 294 una glicina, mientras que las proteínas independientes de pH (F_{B1-NL} y F_{B2-NL}) tienen un glutámico en la misma posición. Para determinar la relevancia del residuo en la ubicación 294, se realizaron por mutagénesis dirigida los mutantes inversos, es decir F_{A1-NL} G294E, F_{B1-NL} E294G y F_{B2-NL} E294G. Estos mutantes se evaluaron en el ensayo de formación de sincitios. En los paneles C y D de la figura IV.18, puede observarse que las proteínas $F_{A1-NL,294E}$ y $F_{B1-NL,294G}$ han perdido su capacidad fusogénica y ya no promueven

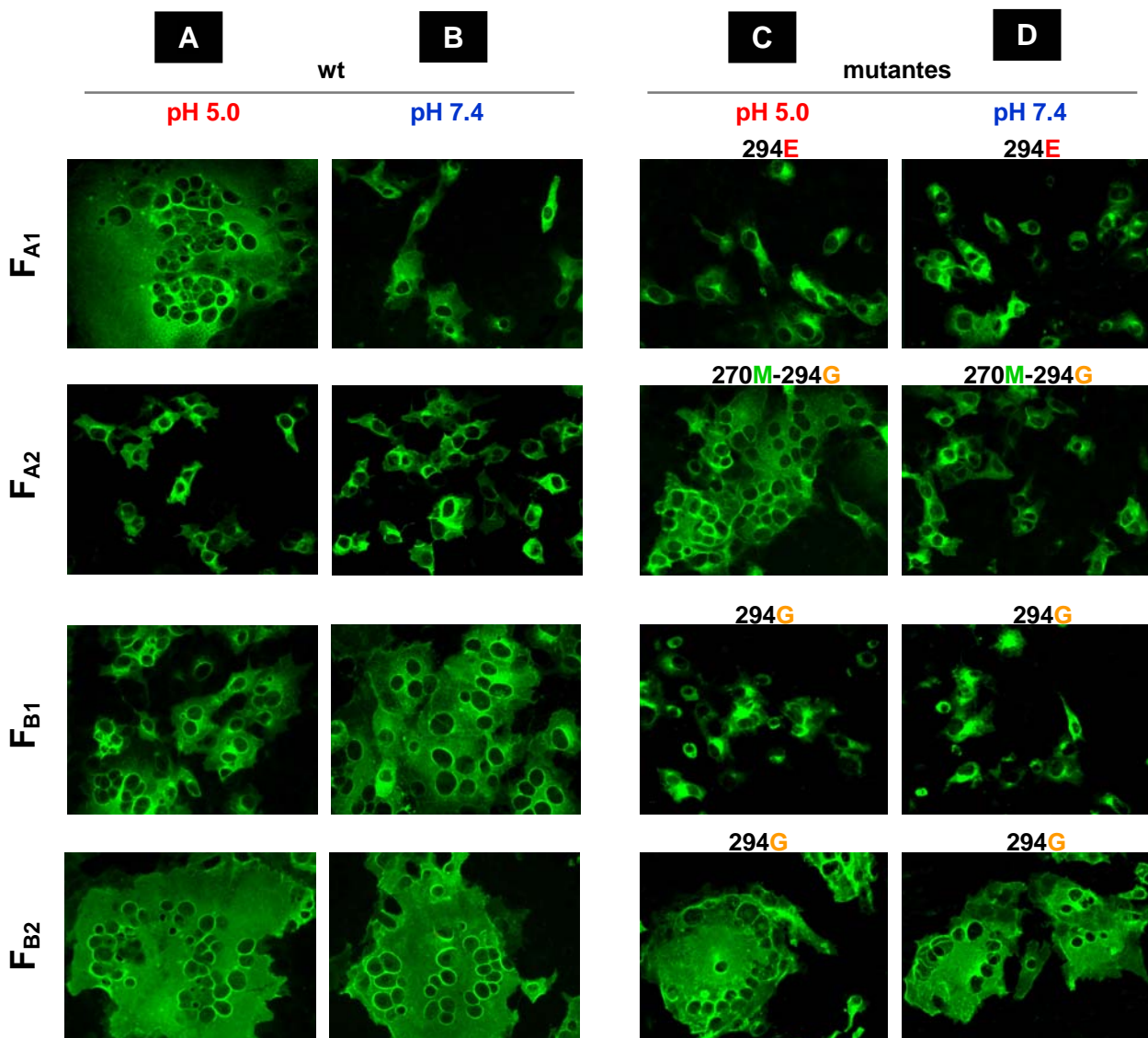


Figura IV.18. Evaluación de las propiedades fusogénicas de las proteínas F representativas de los cuatro linajes genéticos (A1, A2, B1 y B2), y mutantes en la posición 294 de cada una de ellas. Células Vero 118 fueron transfectadas con los plásmidos pCAGGS-F del linaje indicado en la parte derecha de la figura. Las células se sometieron o no a pH ácido. Posteriormente se revelaron con un suero policlonal anti-F a una dilución 1:1000. En los paneles de la izquierda se muestran los resultados obtenidos con las proteínas wt, y en los paneles de la derecha los resultados obtenidos con los mutantes en la posición 294.

fusión celular, se las exponga o no a pH ácido. La proteína F_{B2-NL,294G} induce una formación de sincitios similar a la tipo salvaje.

Estos resultados sugieren que la sustitución de glutámico a glicina en la posición 294, tiene un efecto de aumento de su capacidad fusogénica en las cepas pertenecientes al linaje A, no así en las cepas del linaje B.

IV.4. OBTENCIÓN DE REACTIVOS INMUNOQUÍMICOS FRENTE A LA PROTEÍNA F DEL MNVH.

Dado que en el laboratorio contábamos sólo con pequeñas cantidades de un suero de cobaya anti-MNVH y de escasas cantidades de anticuerpos monoclonales anti-proteína F de este virus, cedidos por el Dr. A.D.M Osterhaus, nos planteamos obtener anticuerpos que reconociesen al virus o a la proteína F en diferentes ensayos y de los que dispusiésemos en grandes cantidades. Para alcanzar este objetivo se plantearon las estrategias que se detallan a continuación.

- ☞ Evaluación de sueros humanos:
- ☞ Inoculación de conejos con péptidos sintéticos:
- ☞ Inoculación de conejos con virus vaccinia recombinantes que expresan la proteína F.
- ☞ Inoculación de conejos con proteína F purificada (FTM-6His).

IV.4.A. Pool de sueros humanos:

Según lo publicado, la mayoría de los individuos se han expuesto al MNVH antes de los 5-10 años de edad (van den Hoogen *et al.*, 2001; Ebihara *et al.*, 2003) y las infecciones por este virus se han descrito en los 5 continentes (Howe, 2002; Biacchesi *et al.*, 2003; Ebihara *et al.*, 2003; Esper *et al.*, 2003; Freymouth *et al.*, 2003; Madhi *et al.*, 2003; Galiano *et al.*, 2006). Es decir, este virus es muy ubicuo y la mayor parte de la población humana tiene anticuerpos frente al MNVH. Por ello se evaluaron para la

reactividad con este virus una serie de sueros humanos disponibles en el laboratorio. Se observó que de 15 sueros ensayados 12 fueron positivos por inmunofluorescencia en células LLC-MK2 infectadas con el MNVH (datos no mostrados). De ellos, 6 dieron una señal de inmunofluorescencia más intensa, por lo que se juntaron para formar un *pool* que se utilizó preferentemente en ensayos de inmunofluorescencia como el que se mostró en la figura IV.19 (Paneles B y C).

Para comprobar si el *pool* de sueros humanos contenía anticuerpos anti-proteína F se ensayó la reactividad de este *pool* por inmunofluorescencia, frente a células HEp-2 infectadas con un virus vaccinia recombinante que expresa la proteína F del MNVH (vv-F, ver apartado III.2.1.7). Como se observa en la figura IV.20, el *pool* reconoció a la proteína F, dando una señal claramente positiva en un foco de células infectadas, que no se observó en células HEp-2 sin infectar (fondo oscuro) o infectadas con el vaccinia parental vRB12 (no mostrado).

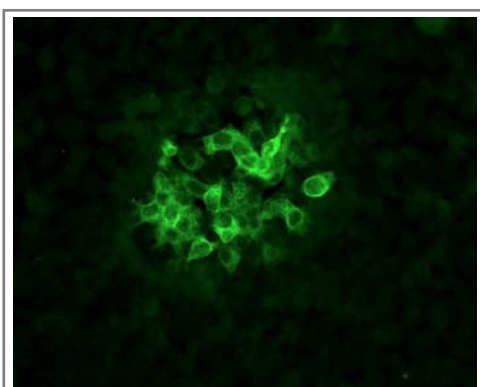


Figura IV.20. Inmunofluorescencia de células HEp-2 infectadas con el virus vaccinia recombinante vv-F. Las células se infectaron con una m.d.i. de 0,1ufp/cel. Veinticuatro horas post-infección las células se fijaron y se revelaron con el *pool* de sueros humanos positivos para el MNVH diluido 1:200.

IV.4.B. Sueros policlonales dirigidos frente a péptidos sintéticos:

Con el fin de diseñar péptidos de la proteína F del MNVH que permitieran la obtención de sueros policlonales que reconociesen a dicha proteína, se hizo una predicción informática del perfil de hidrofobicidad de la misma, basada en su secuencia de aminoácidos. En la figura IV.21 se muestra dicho perfil obtenido como se detalla en Materiales y Métodos (apartado III.2.6.2).

Teniendo en cuenta, por un lado las regiones más hidrofílicas, y por lo tanto presumiblemente más expuestas de la proteína, y por otro, los conocimientos previos de

la proteína homóloga del VRSH (Garcia-Barreno *et al.*, 1989; Baker *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000), se seleccionaron los siguientes péptidos para ser sintetizados.

Péptido F₈₃₋₁₀₂: Como se comentó en la Introducción, la proteína F se procesa proteolíticamente para dar lugar a dos cadenas, F2 (amino-terminal) y F1 (carboxi-terminal), que quedan unidas covalentemente por, al menos, un puente disulfuro. Teniendo en cuenta esto, se planteó la conveniencia de tener un reactivo que pudiera reconocer a la cadena F2 de la proteína. Como se observa en el perfil de hidrofobicidad de la figura IV.21, el segmento 83-102 (línea azul) resultó tener un alto nivel hidrofílico, por lo que teóricamente ésta debería ser una región bastante expuesta.

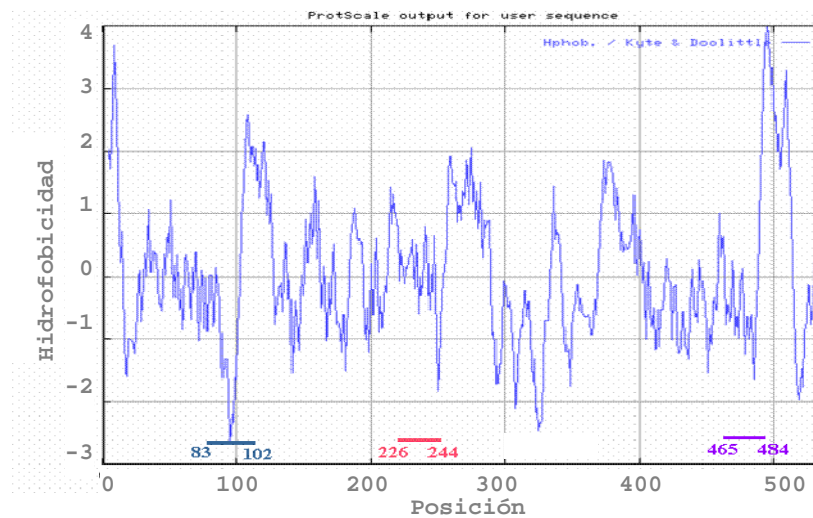


Figura IV.21. Perfil de hidrofobicidad de la proteína F del MNVH. En el eje de ordenadas se indica el valor de hidrofobicidad, y en el de abscisas se representa la posición de los residuos de la proteína F. Las líneas de colores indican los péptidos que se seleccionaron, indicando los límites de cada péptido.

Péptido F₂₂₆₋₂₄₄: Para el diseño de este péptido se tuvo en cuenta, que en el caso del VRSH, esta zona pertenece al área antigénica II de la proteína F donde mapea el epítipo reconocido por un anticuerpo monoclonal, (47F) que es altamente neutralizante (García Barreno *et al.*, 1989) altamente neutralizante. Por otro lado, la región que incluye los aminoácidos 226-244 en la proteína F mostró unos valores bajos de hidrofobicidad, según se ve en la figura IV.21, que sugieren que esta región podría estar expuesta en la proteína del MNVH.

Péptido F₄₆₅₋₄₈₄: Como se comentó en la Introducción, las regiones heptádicas RHA y

RHB de la proteína F de los paramixovirus son importantes para la estructura que adopta la proteína una vez producida la fusión de membranas (Lambert *et al.*, 1996; Golding *et al.*, 2002). En el caso del VRSH, tal como se había descrito previamente para la proteína F del VPI5 (Baker *et al.*, 1999), la cristalografía de rayos X de un complejo formado por las regiones heptádicas A y B mostró que la región heptádica amino-terminal (RHA) forma un trímero de α -hélices enrolladas entre sí, recubierto antiparalelamente por tres hélices de la RHB (Zhao *et al.*, 2000). Dado que la región heptádica B se localiza en la parte exterior del complejo de 6 hélices y tiene un valor hidrofílico alto (ver figura IV.21), se seleccionó el péptido F₄₆₅₋₄₈₄ que contiene secuencias parciales de esta región.

Los tres péptidos seleccionados se inocularon por duplicado en seis conejos (ver III.2.4) y los sueros obtenidos se evaluaron en los siguientes ensayos.

IV.4.B.1. ELISA

La presencia de anticuerpos anti-péptido en dichos sueros se evaluó por ELISA utilizando como antígeno el péptido usado en cada inmunización. En el mismo ELISA se evaluó si estos sueros reconocían también a una forma soluble de la proteína F purificada (FTM-6His). Como control positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal 132 que reconoce a la proteína F del MNVH (cedido por el laboratorio del Dr. A.D.M Osterhaus).

En la figura IV.22 se muestra el resultado de la titulación de cada uno de los seis sueros anti-péptido con el péptido correspondiente, en comparación con la señal obtenida para la proteína F. Como puede observarse, todos los conejos respondieron a la inmunización, y los sueros respectivos reconocieron en mayor o menor medida a los péptidos correspondientes. Sin embargo, no todos reaccionaron con la proteína F en las condiciones ensayadas.

Los dos sueros obtenidos a partir de los conejos inoculados con el péptido F₈₃₋₁₀₂ (gráfica superior izquierda) reconocieron a este péptido, y el del conejo B mostró un título ligeramente más alto. Ambos sueros reconocieron débilmente a la proteína F.

También los dos sueros anti-F₂₂₆₋₂₄₄ (gráfica superior derecha) reconocieron al

péptido correspondiente, y nuevamente se observó una diferencia entre los dos conejos: el suero del conejo C reconoció mejor al péptido que el suero del conejo 4, pero ninguno de estos sueros reconoció a la proteína F.

Por último los sueros anti-F₄₆₅₋₄₈₄ (panel inferior) reconocieron al péptido correspondiente, aunque el del conejo 6 mostró un título algo más alto que el del conejo D. Además, aunque reconocieron a la proteína F, la señal fue similar a la obtenida con los sueros anti-F₈₃₋₁₀₂.

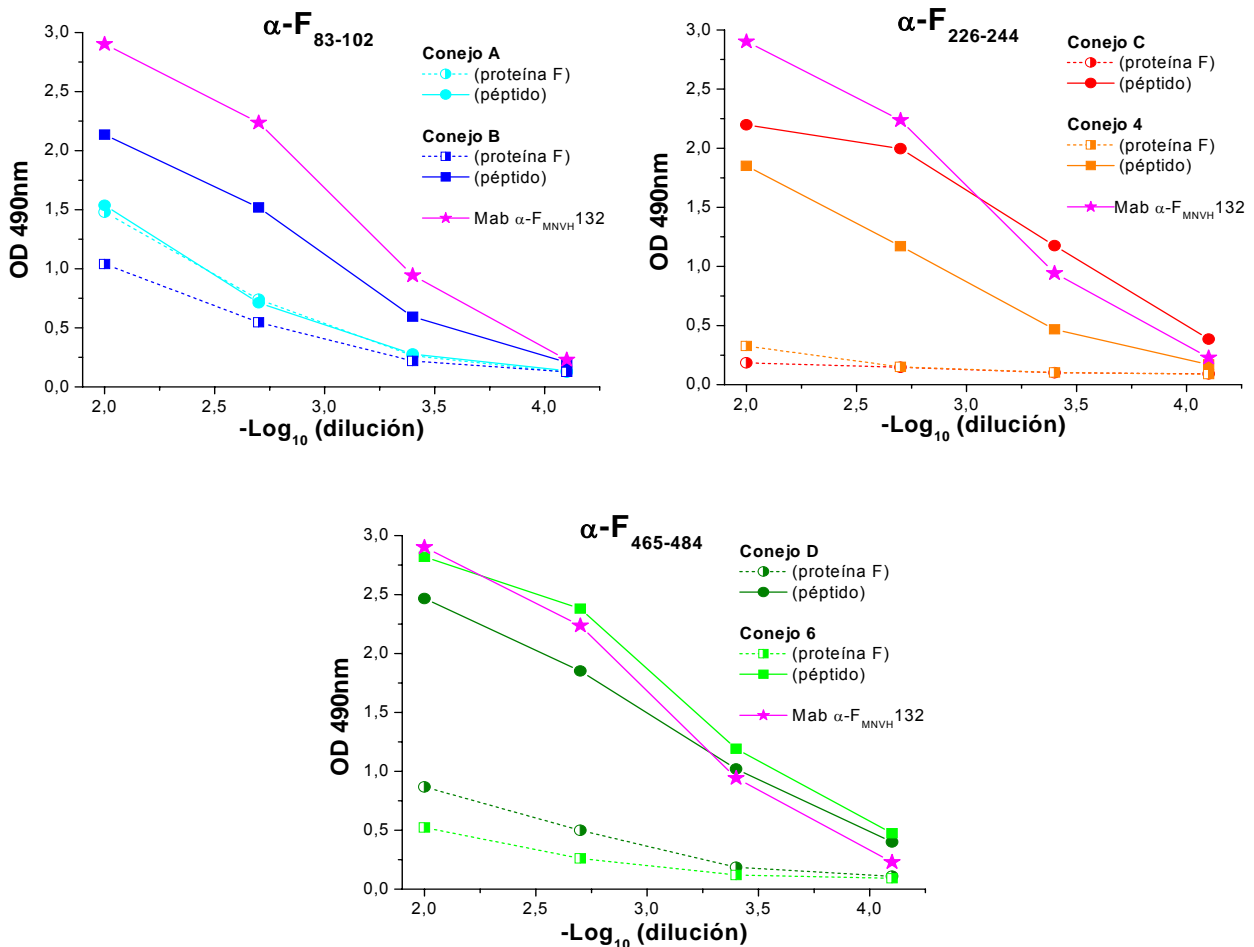


Figura IV.22. Titulación por ELISA de los sueros obtenidos frente a los péptidos de la proteína F. Diluciones seriadas de los sueros obtenidos frente a los péptidos indicados en cada panel, se ensayaron frente al péptido correspondiente (1µg/pocillo, líneas continuas), o frente a la proteína FTM-6 His (30ng/pocillo, líneas discontinuas). En cada panel, la línea en magenta indica la absorbancia obtenida con el anticuerpo monoclonal 132 enfrenteado a la proteína FTM-6His.

IV.4.B.2. Western Blot

Los sueros anti-péptido se ensayaron por *western blot* frente a una forma

soluble de la proteína F. Para esto, las proteínas del sobrenadante de células infectadas con un virus vaccinia (vv-FTM) que expresa una forma truncada de la proteína F desprovista de la región transmembrana, se separaron por SDS-PAGE y se electrotransfirieron a membranas que se revelaron con los distintos sueros (figura IV.23). Aunque todos los sueros reconocieron inespecíficamente bandas de proteínas presentes tanto en el sobrenadante de células infectadas con vv-FTM (canales +) como con un virus vaccinia control (canales -), todos ellos mostraron reactividad específica con la banda correspondiente al precursor F0 de la proteína.

El **suero anti-F₈₃₋₁₀₂** (panel A) reconoció, además del precursor F0 de la proteína una banda de aproximadamente 15KDa, que dado su peso molecular aparente podría corresponder a la cadena F2 de monómeros de la proteína F procesados proteolíticamente.

El suero **anti-F₂₂₆₋₂₄₄** (panel B) reconoció al precursor F0, pero dio una señal más débil que la de los otros dos anti-sueros probados.

El **suero anti-F₄₆₅₋₄₈₄** (panel C) reconoció, además del precursor F0, una banda de aproximadamente 50 kDa, que dado su peso molecular aparente podría corresponder a la cadena F1 de monómeros procesados proteolíticamente. La relación entre la cantidad de cadena F1 y la de precursor F0, detectada por el suero anti-F₄₆₅₋₄₈₄, está en consonancia con la relación de cadena F2 y precursor F0 detectada por el suero anti-F₈₃₋₁₀₂. La ausencia de la banda F1 en el *western blot* revelado con el suero anti-F₂₂₆₋₂₄₄ se debe, probablemente, a la débil señal que dio este suero.

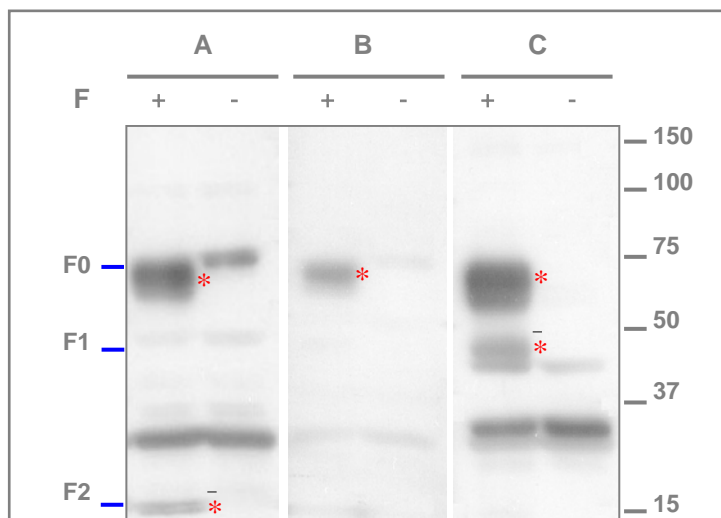


Figura IV.23. Western Blot con los sueros anti-péptidos. 30µl de sobrenadante de células infectadas con el vv-FTM (+) o de un vaccinia irrelevante (-) concentrados 10x se sometieron a SDS-PAGE. Posteriormente, se electrotransfirieron y revelaron con una dilución 1:5000 de los siguientes sueros: **A.** anti-F₈₃₋₁₀₄ (conejo B); **B.** anti-F₂₂₆₋₂₄₄ (conejo C); **C.** anti-F₄₆₅₋₄₈₄ (D). Las bandas específicas correspondientes a los polipéptidos F0, F1 y F2 se indican con un asterisco.

Los sueros anti-péptido se probaron también por inmunofluorescencia con células LLC-MK2 infectadas por el MNVH o con células HEp-2 infectadas con un virus vaccinia recombinante que expresaba la proteína F (vv-F). En ambos casos el resultado fue negativo (no mostrado). También se evaluó la capacidad de estos sueros para neutralizar la infectividad viral en un ensayo de reducción de número de focos infectivos, pero ninguno de los sueros mostró actividad en el ensayo (no mostrado).

IV.4.C. Sueros policlonales de conejos inoculados con virus vaccinia recombinantes.

Dado que los sueros anti-péptido parecían no reconocer a la proteína F en estado nativo (puesto que no neutralizaban la infectividad, ni mostraban reactividad por inmunofluorescencia y sólo alguno reconoció débilmente a la proteína F^{TM-} en ELISA), se inmunizaron conejos con virus vaccinia recombinantes que expresaban la forma completa de la proteína F (vv-F), o una forma soluble de esta proteína desprovista de las regiones transmembrana y citoplasmática (vv-F^{TM-}).

Así, dos pares de conejos se inocularon como se indica en Materiales y Métodos con 1×10^7 ufp/conejo de cada virus vaccinia. Posteriormente, los sueros obtenidos se evaluaron en varios ensayos para caracterizar los anticuerpos inducidos.

IV.4.C.1. ELISA

La presencia de anticuerpos anti-proteína en los sueros de los conejos inoculados con los virus vaccinia recombinantes se evaluó por ELISA utilizando como antígeno proteína F soluble purificada (F^{TM-} 6 His). Como se observa en la figura IV.24 todos los conejos respondieron a la inmunización, produciendo anticuerpos específicos que reconocieron a la proteína F. Los sueros de los conejos inoculados con el virus vaccinia recombinante vv-F reaccionaron 5-10 veces mejor con la proteína F que los sueros de los conejos inoculados con el virus vaccinia recombinante que expresa la forma truncada de la proteína (vv-F^{TM-}).

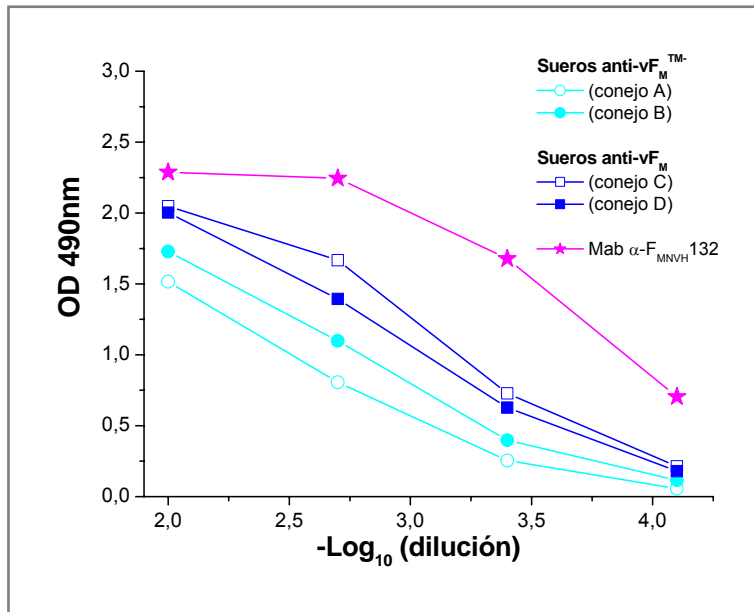


Figura IV.24. Titulación por ELISA de los sueros obtenidos frente a los virus vaccinia recombinantes. Diluciones seriadas de los sueros obtenidos frente a los virus vaccinia recombinantes vv-F^{TM-} (conejos A y B) o vv-F (conejos C y D), se ensayaron frente a la proteína F^{TM-} 6His purificada (30ng/pocillo). En magenta se indica el resultado obtenido con el anticuerpo monoclonal 132 utilizado como control.

IV.4.C.2. Western blot

Los sueros de los conejos mencionados en el apartado anterior se ensayaron también por *western blot* frente a la proteína F^{TM-} 6His purificada. Como se observa en la figura IV.25, todos los sueros reconocieron una banda que corresponde al precursor F0 de la proteína y que no fue reconocida por el suero preinmune (no mostrado). Por otra parte se observa que, aunque en ELISA los sueros anti-vv-F (conejos C y D) reconocieron mejor a la proteína que los sueros anti-vv-F^{TM-} (conejos A y B), la señal en *western blot* fue más intensa con los sueros de los conejos inoculados con estos últimos virus vaccinia recombinantes.

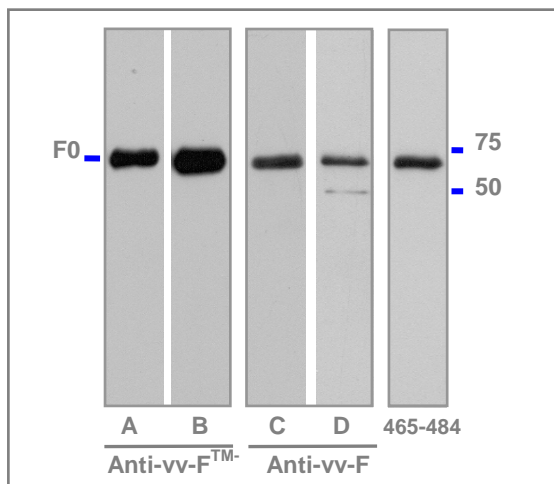


Figura IV.25. Western blot con los sueros anti-vaccinias. A y B: Sueros anti-vv-F^{TM-}, conejo A y B diluidos 1:3000; C y D: sueros anti-vv-F, conejo C y D diluidos 1:3000; 465-484: suero antipeptido anti-F₄₆₅₋₄₈₄ diluido 1:5000. En cada canal se aplicaron ~5ng de proteína F^{TM-} 6His purificada (apartado IV.3.B).

IV.4.C.3. Inmunofluorescencia

Los sueros anti-vv-F y anti-vv-F^{TM-} se probaron por inmunofluorescencia con células infectadas con virus vaccinia recombinantes que expresaban bien la forma completa de la proteína F (vv-F), o formas solubles de la misma (vv-F^{TM-} y vv-F^{TM-} 6His), o con un virus vaccinia irrelevante (vv-P_{RSVH}: vaccinia que expresa la proteína P del VRSH). Como se esperaba, todos los sueros dieron una señal positiva incluso con las células infectadas con el virus vaccinia que no expresaba ninguna forma de la proteína F, aunque ninguno dio una señal apreciable con las células sin infectar (no mostrado). Es decir, todos los sueros tenían anticuerpos frente a proteínas del virus vaccinia, lo que indicaba que las inmunizaciones habían sido eficaces.

Para poder discernir la señal debida al reconocimiento de la proteína F de la señal debida a la reactividad de los anticuerpos con proteínas del virus vaccinia, los sueros se ensayaron por inmunofluorescencia frente a células LLC-MK2 infectadas con el MNVH. Como se observa en la figura IV.26, todos los sueros dieron una señal positiva, indicando la presencia de anticuerpos frente a las formas de proteína F expresadas por los virus vaccinia recombinantes utilizados en las distintas inmunizaciones.

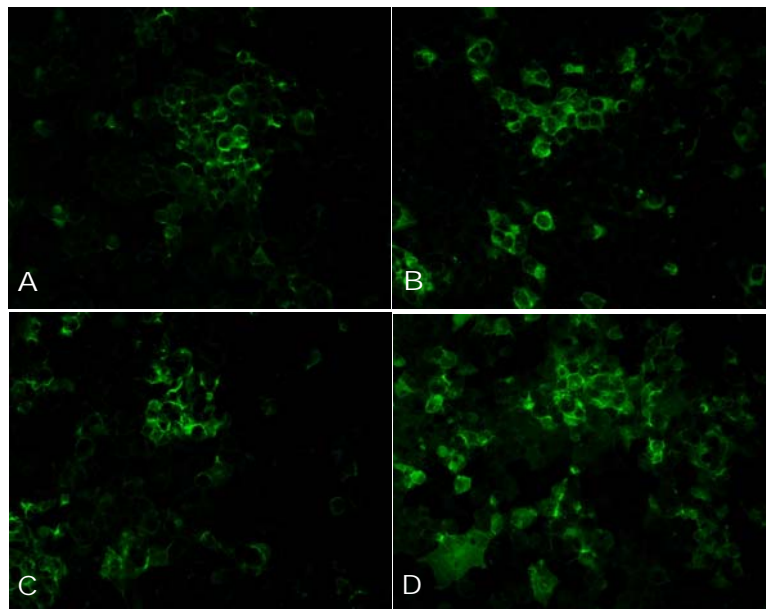


Figura IV.26. Inmunofluorescencia con los sueros anti-vaccinia. Células LLC-MK2 se infectaron con MNVH (m.d.i. de 0,2uff/cel). Cuarenta y ocho horas post-infección las células se fijaron y se revelaron con los sueros anti-vv-F^{TM-} (A) conejo A, (B) conejo B, o con los sueros anti- vv-F (C) conejo C, y (D) conejo D, diluidos 1:1000.

IV.4.C.4. Neutralización

Para determinar si los sueros inoculados con los virus vaccinia recombinantes eran capaces de neutralizar al MNVH, se probaron en ensayos de reducción del número de focos infectivos.

En la figura IV.271 se muestra el resultado de un ensayo representativo de 3 experimentos. Como se observa en la gráfica, todos los sueros inmunes redujeron considerablemente el número de focos infectivos, incluso a las diluciones más altas utilizadas en el ensayo. Los sueros preinmunes de los conejos B, C y D disminuyeron inespecíficamente el número de focos infectivos a las diluciones más bajas, pero esa inhibición desapareció a diluciones más altas.

En resumen, los sueros de los conejos inoculados con los virus vv-F o vv-FTM contenían anticuerpos específicos que reconocieron tanto a formas desnaturalizadas de la proteína F, como lo demuestra los resultados de *western blot* de la figura IV.25, como a la forma nativa de esta proteína, puesto que son capaces de neutralizar la infectividad viral. Ésta última característica es una diferencia importante con respecto a los sueros obtenidos frente a péptidos de la proteína F del MNVH.

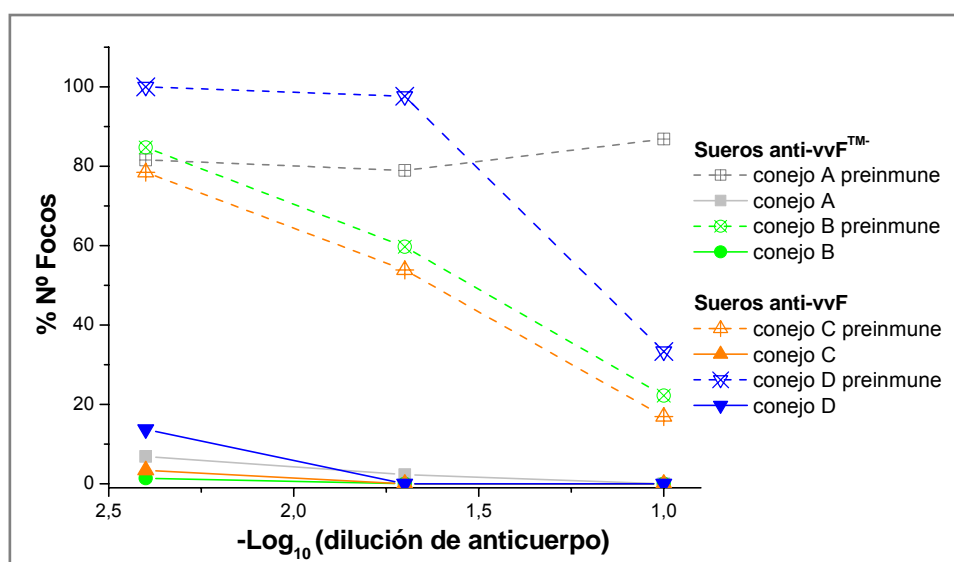


Figura IV.27. Neutralización del MNVH con los sueros anti-vaccinia. Una cantidad determinada de virus (50uff) se incubó con diluciones seriadas de los distintos sueros. La mezcla de virus y sueros se empleó para infectar células Vero 118 y el número de focos de virus se cuantificó a los 4 días como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran como porcentaje del número de focos infectivos observados en ausencia de sueros.

IV.4.D. Sueros policlonales de conejos inoculados con proteína FTM-6His purificada

La inmunización con virus vaccinia recombinante tiene la ventaja de inducir una buena respuesta inmune sin tener que purificar el antígeno deseado. Sin embargo, como se ha visto en el apartado anterior, esos sueros tienen altos niveles de anticuerpos frente a antígenos del virus vaccinia. Por esto, decidimos inocular conejos con proteína FTM-6His purificada. La inoculación se llevó a cabo como se indica en Materiales y Métodos, utilizando ~70µg de proteína FTM-6His para cada conejo. Posteriormente los sueros se evaluaron en varios ensayos para caracterizar los anticuerpos obtenidos.

IV.4.D.1. ELISA

La presencia de anticuerpos anti-F en estos sueros se evaluó por ELISA utilizando como antígeno la forma soluble de la proteína F purificada (FTM-6His) utilizada en la inoculación.

Como se observa en la figura IV.28 los dos conejos respondieron a la inmunización produciendo altos títulos de anticuerpos específicos que reconocieron a esa proteína, incluso a una dilución de 1:12.500. Estos sueros policlonales tienen incluso mayores títulos que el anticuerpo monoclonal 132 (control positivo).

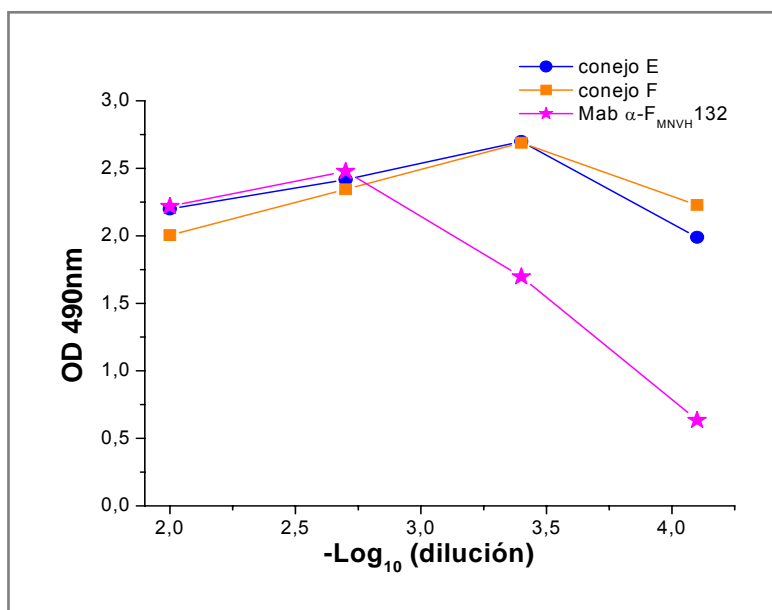


Figura IV.28. Titulación por ELISA de los sueros anti-proteína FTM-6 His. Diluciones seriadas de los sueros anti-FTM-6His (conejo E y F, respectivamente) se ensayaron por ELISA, utilizando como antígeno ~30ng/pocillo de proteína FTM purificada. La línea en magenta indica el resultado obtenido con el anticuerpo monoclonal 132 utilizado como control.

IV.4.D.2. Western blot

Los sueros anti-FTM-6His se ensayaron en *western blot* frente a la proteína FTM-6His purificada. Como se observa en la figura IV.29, los dos sueros reconocieron una banda que corresponde al precursor F0 de la proteína, que no fue reconocido por el suero preinmune (no mostrado). Estos sueros dieron una señal similar a la de uno de los sueros obtenidos frente al péptido 465-484, descrito en apartados anteriores. El suero del conejo E mostró una señal algo más intensa que la del conejo F.

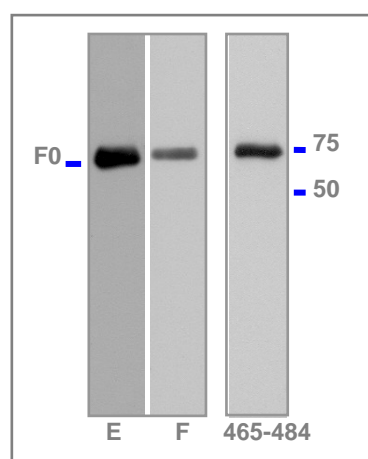


Figura IV.29. Western blot con los sueros anti-FTM-6His. E y F: Sueros anti-FTM-6His, conejos E y F diluidos 1:5000; **465-484**: suero antipéptido como control positivo del ensayo, diluido 1:5000. En cada canal se aplicaron ~5ng de proteína FTM-6His purificada.

IV.4.D.3. Inmunofluorescencia

Los sueros anti-FTM-6His se probaron también por inmunofluorescencia con células infectadas con virus vaccinia recombinantes que expresaban la forma completa de la proteína F (vv-F), o con un vaccinia control que expresaba la proteína P del VRSH, utilizado como control negativo. En la figura IV.30 se observa que el suero del conejo E (Panel A) y el suero del conejo F (Panel B) tiñeron focos de células infectadas por el vv-F sobre un fondo oscuro de células no infectadas. Esos mismos sueros no dieron señal apreciable con células infectadas con el virus vaccinia control (no mostrado).

Los mismos sueros se ensayaron también por inmunofluorescencia con células LLC-MK2 infectadas con el MNVH. Como se observa en la figura IV.30 (paneles C y D), los dos sueros dieron una señal positiva con focos de células infectadas sobre un fondo oscuro de células sin infectar.

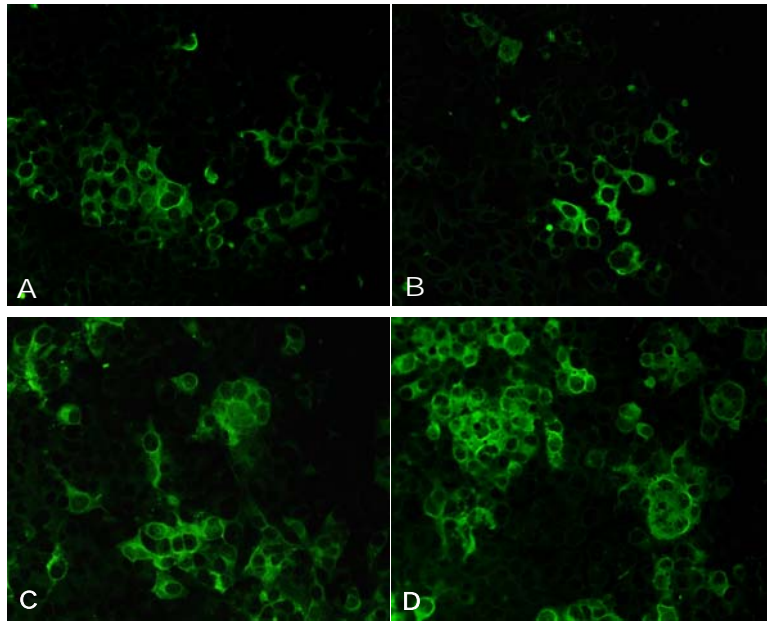


Figura IV.30. Inmunofluorescencia con los sueros anti-FTM-6His.
Paneles A y B: Células Hep-2 se infectaron con vv-F a una m.d.i. de 0,1ufp/cel. Veinticuatro horas más tarde las células se fijaron y se revelaron con los sueros anti-FTM-6His conejo E (**A**) o conejo F (**B**) diluidos 1:1000.
Paneles C y D: Células LLC-MK2 se infectaron con MNVH a una m.d.i. de 0,2uff/cel. Cuarenta y ocho horas post-infección las células se fijaron y se revelaron con los sueros anti-FTM-6His conejo E (**C**), o conejo F (**D**) diluidos

IV.4.D.4. Neutralización

Para determinar si los sueros inoculados con la proteína FTM-6His eran capaces de neutralizar la infectividad viral, se ensayaron como en el apartado IV.2.C.4 para la reducción del número de focos infecciosos.

En la figura IV.31 se muestra el resultado de un ensayo representativo de 3 experimentos. Como se observa en la gráfica los dos sueros fueron capaces de neutralizar al virus, incluso a las diluciones más altas utilizadas en el ensayo. Los sueros preinmunes mostraron una neutralización inespecífica a la dilución más baja que desapareció a las diluciones más altas.

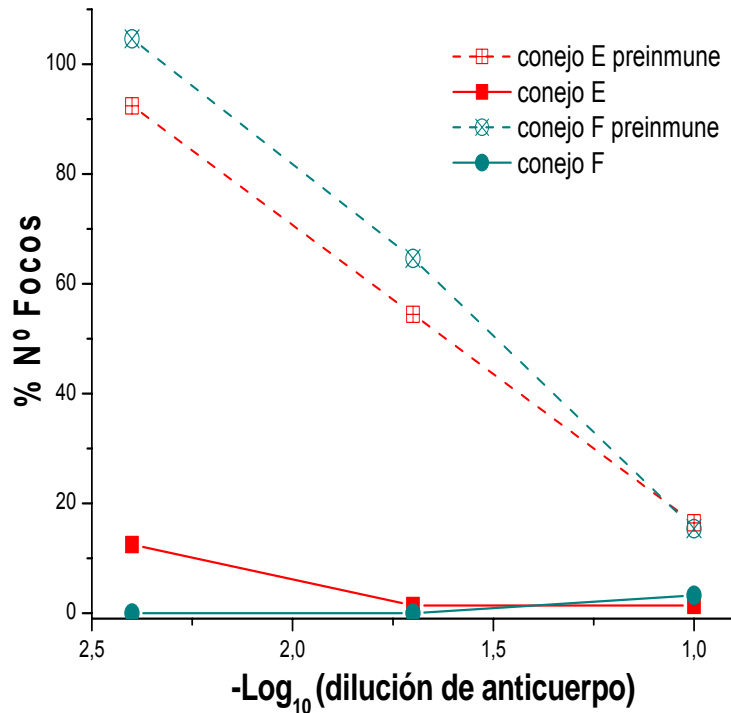


Figura IV.31. Neutralización del MNVH con los sueros anti-FTM-6His. Una cantidad determinada de virus (50uff) se incubó con diluciones seriadas de los dos sueros. La mezcla de virus y sueros se empleó para infectar células Vero y el número de placas de virus se cuantificó a los 4 días como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran como porcentaje del número de focos infectivos observados en ausencia de sueros.

En resumen, los sueros de los conejos inoculados con la proteína FTM-6His mostraron una mayor reactividad con la proteína F en los ensayos de ELISA que los demás sueros obtenidos frente a péptidos de la proteína F o frente a virus vaccinia recombinantes. También los sueros anti-FTM-6His dieron una señal más intensa en los ensayos de *western blot* y de inmunofluorescencia y, en general, se mostraron superiores a los demás sueros en los ensayos de neutralización.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

V.1. CRECIMIENTO Y TITULACIÓN DEL MNVH EN CULTIVOS CELULARES

V.1.1. Condiciones de crecimiento para el MNVH en cultivos celulares

El MNVH mostró ser un virus difícil de crecer, dado que replica lentamente y que esta replicación depende de la adición de tripsina. Además tiene un rango limitado de líneas celulares susceptibles y el desarrollo de efecto citopático producido por el virus es muy lento y no tan evidente como en el caso del virus respiratorio sincitial humano (VRSH). van den Hoogen y colaboradores reportaron que en las células tMK (cultivo terciario de células de riñón de mono), las células en las que se aisló el virus, el efecto citopático era indistinguible del VRSH (van den Hoogen *et al.*, 2001). Sin embargo, ellos también observaron que la cepa del MNVH sobre la que se realizaron los primeros estudios (NL/01/00; A1), mostraba un efecto citopático más claro en estas células que la cepa (NL/01/99; B1) con la que nosotros trabajamos. Otro grupo ha publicado también que podría haber una diferencia en el efecto citopático producido por unas cepas u otras en una misma línea celular (Hamelin *et al.*, 2004), sin embargo no está claro qué cepas producen sincitios y cuáles no.

En nuestro laboratorio la infección por MNVH en células Vero 118 o LLC-MK2 fue visible a los 3-4 días postinfección. Estos resultados coinciden con lo publicado por Biacchesi y colaboradores (Biacchesi *et al.*, 2004a), y es similar a lo reportado por Herfst y colaboradores (Herfst *et al.*, 2004) que empiezan a ver efecto citopático en estas células entre los 3 y 6 días, respectivamente. Sin embargo está en desacuerdo con lo publicado por el grupo de Guy Boivin, que ve un efecto citopático a los 10-14 días o incluso después de 17 días (Boivin *et al.*, 2002; Hamelin *et al.*, 2004).

Por otro lado, el virus creció mejor en las células LLC-MK2 o Vero 118, y siempre con el suplemento de tripsina en el medio de cultivo. En el caso de las células BSR T7/5, BHK y HEp-2, el que la replicación del virus haya sido peor puede ser debido simplemente a que éstas no sean células tan permisivas como las LLC-MK2 o Vero 118 para el MNVH,

o también que esos tres tipos celulares mostraron una sensibilidad mayor a la tripsina que se agrega al medio para la propagación viral.

En cuanto al hecho de que el virus creció mejor cuando se añadió tripsina en el medio en días posteriores durante la infección, es consistente con lo observado por Kaverin, que publicó una rápida inactivación de la tripsina en células Vero 118 por un factor que estas células secretan al medio (Kaverin *et al.*, 1995). En este mismo estudio los autores comentaron que un efecto similar, aunque menor, se observaba en las células LLC-MK2.

El título viral obtenido al crecer el virus en estas condiciones (10^5 uff/ml) es similar al obtenido por los distintos grupos que trabajan con este virus a estos tiempos de infección (Biacchesi *et al.*, 2004a; Biacchesi *et al.*, 2004b; Herfst *et al.*, 2004; Pham *et al.*, 2005). Sin embargo, alguno de estos grupos han podido llevar a cabo cinéticas de 10-12 días (algo que en nuestro caso ha sido imposible dado que después de 7 días las células se desprendieron totalmente) y alcanzar títulos del orden del 10^7 uff/ml (Biacchesi *et al.*, 2004a; Biacchesi *et al.*, 2004b).

V.1.2. Ensayo de formación de focos infecciosos por el MNVH

Dado que el efecto citopático no es claro y parece ser dependiente de cepa, una manera sencilla de ver los focos infecciosos del MNVH es utilizando inmunotinción. El ensayo de formación de focos infecciosos utilizando como sustrato cromógeno 3-amino-9-etil-carbazol (AEC), ha sido de utilidad para una fácil titulación de semillas virales, así como para la cuantificación del efecto producido por los distintos anticuerpos en los ensayos de neutralización. Además, aunque la adición de tripsina implica un paso más, aumentó considerablemente el tamaño del foco, haciendo más fácil y más fiable el conteo.

Otros grupos han utilizado este tipo de ensayo para titulación viral o ensayos de neutralización viral convencional (van den Hoogen *et al.*, 2001; Biacchesi *et al.*, 2004a; MacPhail *et al.*, 2004; Graaf de *et al.*, 2007); pero en estos el tiempo de incubación post-infección fue de 6-7 días, por lo tanto nuestro ensayo tiene una ventaja adicional al poder revelarse a los 4 días.

Un ensayo de este tipo, rápido y fiable para detectar anticuerpos neutralizantes puede ser importante para ensayar posibles candidatos a vacunas. También puede ser útil para realizar estudios epidemiológicos en sueros de pacientes infectados.

V.2. CLONAJE, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA F DEL MNVH

V.2.1. Clonaje y expresión

Con respecto al clonaje de la proteína F, resultó llamativo el hecho de que el gen clonado en los plásmidos pGEM-4 y pTM1 tuviera una secuencia nucleotídica, y el gen clonado en el plásmido pRB21 tuviera algunos cambios de nucleótidos, que llevaban en algunos casos a cambios en la secuencia de aminoácidos. El gen F clonado en pGEM-4 y pTM1 fue amplificado en una RT-PCR, y el gen F clonado en pRB21 fue amplificado en una RT-PCR posterior. Estas diferencias de secuencia podrían haberse originado por cambios introducidos por la DNA polimerasa durante la amplificación, cosa poco probable, dado que la polimerasa utilizada (*Taq Plus Long, Stratagene*) es una mezcla de las polimerasas *Taq* y *Pfu*, y ésta última tiene una capacidad procesiva y de corrección de prueba muy alta. Es probable que esas diferencias se deban simplemente a la variabilidad genética que caracteriza a una población de virus RNA y a que el virus del que se partió para obtener el RNA que se amplificó no se había purificado por plaqueo.

El gen de la proteína se clonó en distintos sistemas (pTM1, pGEM-4, pRB21 y pCAGGS) sin embargo, el nivel de expresión varió de unos a otros: se consiguió un nivel de expresión mayor con el pCaggs > pTM1 > pGEM4. El plásmido pRB21 se utilizó para originar los virus vaccinia recombinantes.

V.2.2. Purificación de la proteína F^{TM-} o de la proteína F^{TM-} 6His; implicaciones estructurales.

Los mutantes F^{TM-} y F^{TM-}6His al carecer de la región transmembrana son

secretados al sobrenadante, por lo que su manejo, concentración y purificación resultó mucho más sencilla que una purificación a partir de extractos celulares, o de membranas de células infectadas con los virus vaccinia recombinantes o con el MNVH.

En primer lugar, y dado que no contábamos con anticuerpos monoclonales para una purificación mediante columnas de inmunoafinidad, se decidió intentar purificar la proteína F^{TM-} del MNVH mediante intercambio iónico. Se determinó, probando varias condiciones que lo óptimo era utilizar un tampón Tris-HCl 20mM pH=7.5 en una columna de intercambio aniónico. En estas condiciones la proteína F^{TM-} se eluyó con 100mM de NaCl, lo que permitió purificar la proteína F y separarla de la seroalbúmina, contaminante mayoritario que acarreamos de la producción en células.

En el paso posterior de purificación por filtración en gel, esperábamos que la proteína F^{TM-} eluyera antes que la SAB como la proteína F^{TM-} del VRSH, dado que se supone ambas (F^{TM-} de MNVH y del VRSH) tienen una conformación trimérica. Sin embargo la proteína F^{TM-} eluyó después de la SAB, aparentando un tamaño menor. Una explicación es que se hubiera degradado, pero en el *western blot* que se muestra en la figura IV.7 se observa claramente que la proteína está mayoritariamente no degradada.

Al mirar esta preparación al microscopio electrónico no pudo distinguirse ninguna molécula de proteína F^{TM-}, lo cual indica que efectivamente la proteína podría no tener la conformación correcta.

El hecho de que la proteína se unió a una membrana de intercambio aniónico a un pH=7.5, indica que la proteína a este pH tendría una carga negativa, osea que su punto isoeléctrico (pI) debería ser menor a 7.5. Esta estimación está de acuerdo con el pI teórico (pI=5.9) predicho sobre la secuencia de la proteína F del MNVH (ProtParam, de Expassy Proteomic Server).

Dado que no conseguimos por intercambio iónico y filtración en gel una preparación que nos permitiera, entre otras cosas, su observación al microscopio electrónico, decidimos añadir una cola de 6 histidinas al mutante F^{TM-} (F^{TM-}6His), para purificar esta proteína por cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC) y luego por filtración en gel. La purificación por estos dos métodos nos permitió conseguir una

preparación lo suficientemente pura y con la proteína FTM-6His en una conformación adecuada, que utilizamos para hacer estudios de microscopía electrónica y para la producción de anticuerpos en conejos.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente comentado, no podemos afirmar ni descartar que el mutante FTM- de la proteína del MNVH se esté plegando de una manera correcta. Hay que tener en cuenta que, aunque han podido expresarse y purificarse mutantes sin las regiones transmembrana y citoplasmática de varios virus de la misma familia (FTM- del virus respiratorio sincitial humano, del virus de la parainfluenza humana tipo 3 y del virus de la enfermedad de Newcastle), existe por lo menos un caso publicado en el que este mutante no oligomerizó eficientemente (virus de la parainfluenza tipo 5; Yin *et al.*, 2006), hasta que no se le agregó un dominio de trimerización (GCN). Puede ser que el mutante FTM- del MNVH necesite, como en el caso del virus de la parainfluenza tipo 5, una secuencia estabilizadora para formar de manera eficiente una estructura trimérica estable. Sin embargo, parece poco probable que el mutante FTM- del MNVH no pueda plegarse correctamente y que, el mutante FTM-6His al que sólo se le ha adicionado una cola de 6 histidinas sea capaz de oligomerizar.

Por otro lado, si la proteína FTM- no tiene la conformación trimérica adecuada en la etapa de filtración en gel, no podemos descartar que el mutante FTM- la haya perdido durante la purificación por intercambio iónico, donde una interacción con la membrana o con los tampones podría haber desestabilizado a la proteína. Esto es poco probable ya que la conformación post-fusión es una estructura altamente estable. Además, sabemos que la proteína homóloga FTM- de VRSH, se expresa en forma trimérica y tampoco pierde su conformación en una purificación por intercambio iónico. Por último, no se puede descartar una interacción inespecífica con la superosa de la columna de exclusión molecular, que pudiera retrasar su elución.

La producción de la proteína utilizando el sistema de virus vaccinia recombinantes y su purificación posterior, por cromatografía de unión a iones metálicos y filtración en gel, nos permitió conseguir una muestra en condiciones adecuadas para los estudios detallados en esta tesis. Sin embargo, dado que sería conveniente disponer de grandes cantidades de proteína purificada (para producción de anticuerpos, más estudios de microscopía o criomicroscopía, etc), en el laboratorio se puso a punto un sistema de

expresión de proteínas solubles en huevos embrionados (Corral *et al.*, 2007). Este es un sistema de producción más eficiente en cuanto a cantidad de proteína producida, facilidad en el manejo del sistema y costos de producción. El protocolo de purificación puesto a punto en esta tesis será utilizado también para purificar y caracterizar la proteína FTM-6His producida en el sistema de huevos.

V. 3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA PROTEÍNA F DEL MNVH

V.3. Análisis de la reconstrucción de la estructura 3D del ectodominio de la proteína F del MNVH; comparación con los datos estructurales publicados hasta el momento para otros paramixovirus.

El volumen 3D mostrado en la figura IV.24 de Resultados representa la primera información estructural disponible hasta la fecha para la proteína de fusión del MNVH.

La reconstrucción 3D del ectodominio de la proteína F del MNVH, reveló una organización homotrimérica de la proteína. Estos resultados concuerdan con estudios previos que mostraron una organización trimérica en la proteína de fusión de otros paramixovirus como el virus de la parainfluenza 5 (Russell *et al.*, 1994), VRSH (Calder *et al.*, 2000) y el virus de la enfermedad de Newcastle (Chen *et al.*, 2001b).

La apariencia de la imagen promedio del ectodominio de la proteína F del MNVH (figura IV.23, panel C) es similar a la obtenida por microscopía electrónica para la proteína F del VRSH (Calder *et al.*, 2000). El volumen 3D es similar a la obtenida para la proteína F_{TM}- del VRSH (no publicado) y la proteína F_{TM}- del virus Sendai (Ludwig *et al.*, 2003), y a la estructura obtenida por rayos X de la proteína FTM- del virus de la enfermedad de Newcastle (Chen *et al.*, 2001b) o el virus de la parainfluenza humana tipo 3 (Yin *et al.*, 2005).

Una comparación de la estructura primaria de la proteína F del MNVH con la de los paramixovirus de los que tenemos información estructural, (los virus de la enfermedad de Newcastle, de la parainfluenza humana tipo 3, o Sendai;(Chen *et al.*, 2001b; Ludwig *et al.*,

2003; Yin *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2006), revela una identidad de secuencia de aproximadamente el 15% en todos los casos, y una similitud que alcanza hasta el ~40%. Ambos valores pueden ser considerados como relativamente altos para proteínas de fusión viral. Por ejemplo, en el caso de dos proteínas muy similares en cuanto a plegamiento como son las proteínas E1 del virus del bosque Semliki o la proteína E del virus TBE (*tick-borne encephalitis*), su identidad de secuencia es sólo del 12% (Rey *et al.*, 1995; Lescar *et al.*, 2001). Como se comentó anteriormente la identidad de secuencia de la proteína F del MNVH con respecto al VRSH es mayor, 33%. De todas maneras si uno compara la secuencia entre las cuatro proteínas de fusión de esos paramixovirus, se observa que la identidad de secuencia está homogéneamente distribuida. Además, se encuentra el hecho de que todas estas proteínas de fusión comparten una distribución de dominios (regiones heptádicas, regiones hidrofóbicas, distribución de cisteínas, etc) similar, por lo que es de esperar una estructura 3D similar en todos los casos.

Aparte de diferencias evidentes en la longitud del cuello, o de la cabeza debido a las diferencias en la longitud de la secuencia, las estructuras de las proteínas de fusión (determinadas hasta el momento) en el que se propone es el estado post-fusión, es para todos estos paramixovirus muy similar. En todos los casos puede distinguirse una organización en tallo, cuello y cabeza, donde la cabeza tiene una forma triangular, un canal axial en la parte central superior y 3 canales axiales en la parte lateral de la misma.

V.3.2. Modelo informático de la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína F del MNVH.

El contar con un buen modelo de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína F del MNVH es una herramienta que nos permitirá avanzar en el análisis estructural y funcional de la proteína, así como también en la posible interpretación de resultados experimentales obtenidos. Cualquier programa de cómputos para visualización de archivos “.pdb” (Rasmol, SPDBViewer, Chimera, Pymol, etc) nos permite una visualización parcial o completa de la proteína, pudiéndola rotar en el espacio para analizar sus dominios, características de sus aminoácidos, interacciones intra o extramoleculares, etc. También es posible realizar cambios de aminoácidos y analizar las implicaciones que estos cambios pueden tener (aumento/disminución de energía libre,

interacciones con aminoácidos adyacentes, etc) en regiones cercanas.

De hecho este modelo nos ha permitido plantear una mutagénesis de la proteína F para dar una explicación plausible a las diferencias observadas en la capacidad fusogénica de las proteínas de fusión de los diferentes linajes genéticos del MNVH.

V.3.3. Docking, adecuación del modelo informático con el volumen 3D del ectodominio de la proteína F del MNVH.

A primera vista se observa que algunas características como las dimensiones promedio y la localización de los canales axiales y radiales se ajustan perfectamente (figura V.1).

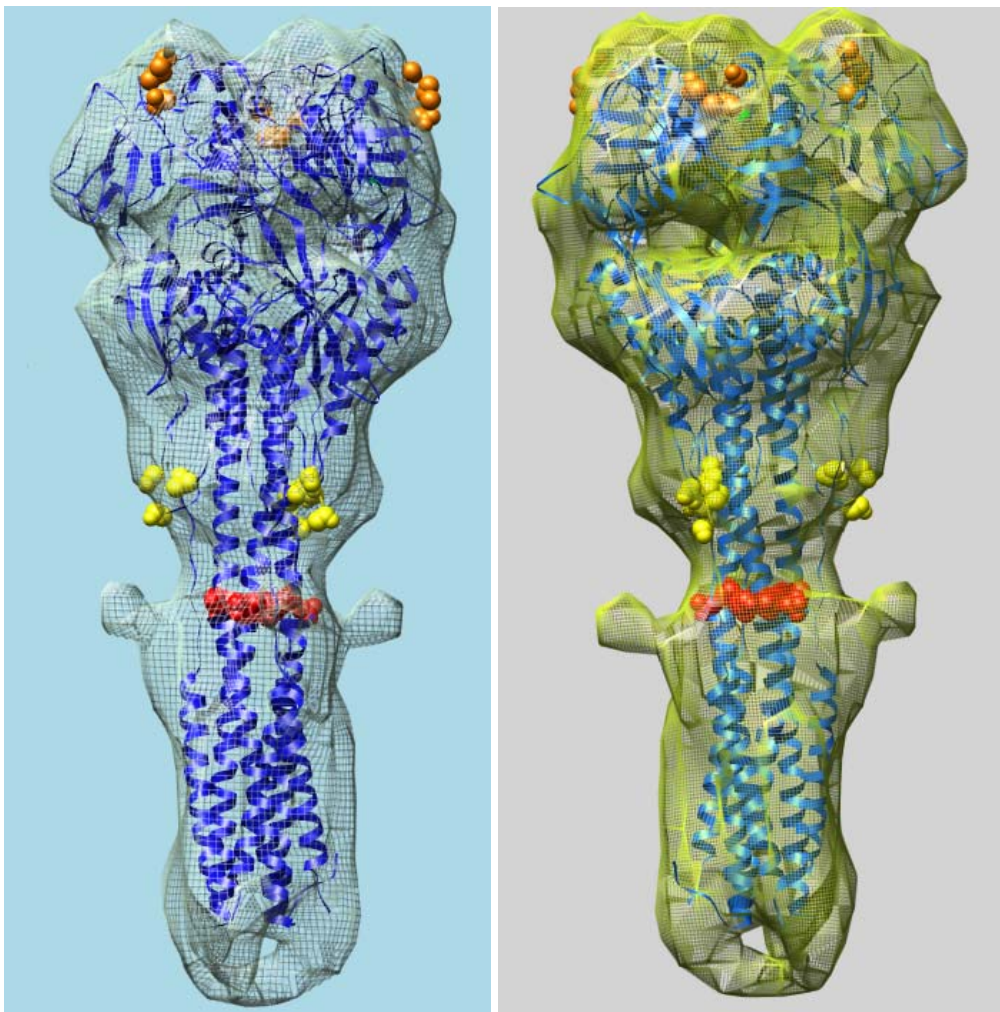


Figura V.1. Docking del volumen 3D y el modelo informático de la estructura del ectodominio de la proteína F del MNVH. En la figura se muestra dos vistas laterales diferentes del docking. Se utilizan diferentes colores en el volumen 3D y en el fondo para resaltar la adecuación del modelo informático. En formato de bolas (rojo, amarillo y naranja) se muestran los tres sitios de glicosilación que tiene la proteína.

La torsión que se observa en el tallo concuerda con las regiones RHB de los 3 monómeros que se encuentran cubriendo a las RHA de los mismos (figura V.2). Las proyecciones laterales que tiene el tallo (i), coinciden con el sitio de glicosilación N172 que se sabe es modificado en la proteína (Schowalter *et al.*, 2006). Por encima de estas proyecciones el tallo se afina, lo que concuerda con que en esta zona sólo las regiones HRA están en forma de hélices, mientras que las RHB (entre los aminoácidos 436-456) tienen una conformación elongada. Las extensiones del tallo en la parte inferior del mismo (ii) que no se ven en el modelo informático, podrían deberse a la cola de 6 histidinas que cada tiene cada monómero y que no interaccionan entre sí. La unión de estas 3 extensiones se origina por el tratamiento de simetría de la reconstrucción, aunque no es probable que exista en la realidad.

En el cuello existe un engrosamiento que coincide con lo que sería el sitio de glicosilación N57, que se sitúa en el modelo informático justo en la parte inferior del bucle (iii; aminoácido 53-64), y que se sabe también es modificado (figura V.2).

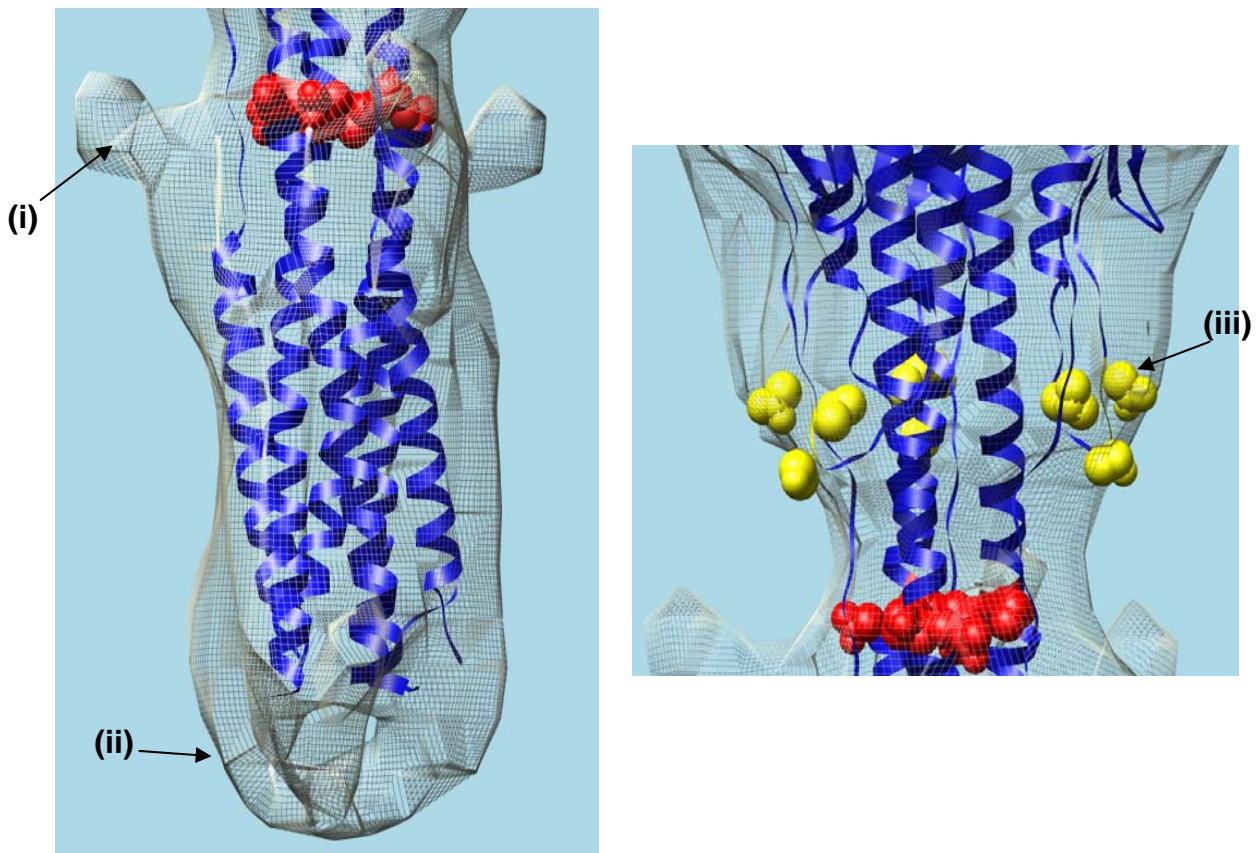


Figura V.2. Docking del volumen 3D y el modelo informático de la estructura del ectodominio de la proteína F del MNVH. En el panel de la izquierda se muestra con más detalle la parte del tallo del ectodominio de la proteína y el sitio de glicosilación N172 remarcado en color rojo, que coincide con las proyecciones que salen perpendiculares (i) de la proteína en el volumen 3D. (ii) Proyecciones que se supone corresponden con la cola de 6 histidinas. En el panel de la derecha se muestra con más detalle la parte del cuello del ectodominio de la proteína y el sitio de glicosilación N57 (iii) remarcado en amarillo, que coincide con el engrosamiento que se observa en esta parte en el volumen 3D.

Los azúcares unidos a los sitios de glicosilación N57 (iii) y N172 (i) se pueden vislumbrar en el promedio bidimensional originado a partir de la colección de imágenes (figura V.3).

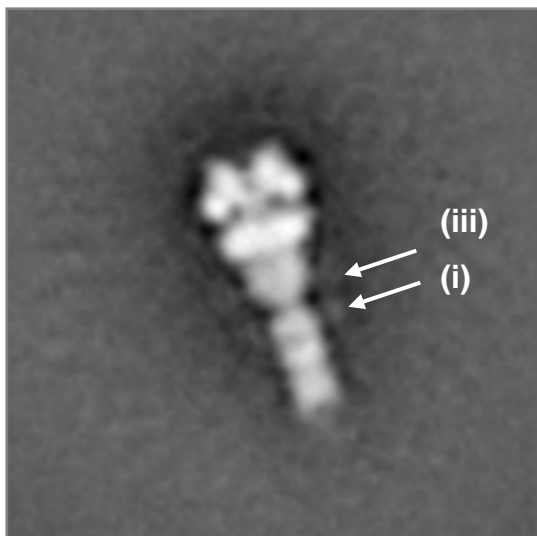


Figura V.3. Promedio bidimensional originado a partir de la colección de imágenes. Las flechas indican las densidades que se corresponden con la ubicación de los sitios de glicosilación N57(iii) y 172-174 (i).

El docking encaja muy bien en la región de la cabeza (figura V.4). Los canales axiales observados en el volumen 3D originado a partir de la microscopía electrónica, se ajustan con los canales axiales formados en el modelo informático sobre lo que sería la región heptádica C (RHC) y el DIII. Además, como ya se había observado en la estructura cristalina de la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle (Chen *et al.*, 2001a) o en las reconstrucciones hechas a partir de crio-electromicroscopía para la proteína F del virus Sendai (Ludwig *et al.*, 2003), estos canales convergen en el centro del trímero con el canal axial.

En la figura V.4 se observa que sólo un bucle formado por los aminoácidos 393-405 no encaja del todo en el volumen 3D (i). Puede ser que esta zona sea localmente diferente a la misma región en la proteína F del PIVH3, de la que se tomaron las coordenadas para hacer el modelo informático. Además en este caso el sitio de glicosilación N353 (bolas naranjas en la figura V.4), que se sabe que es modificado (Schowalter *et al.*, 2006), no se observa como una proyección en el volumen 3D.

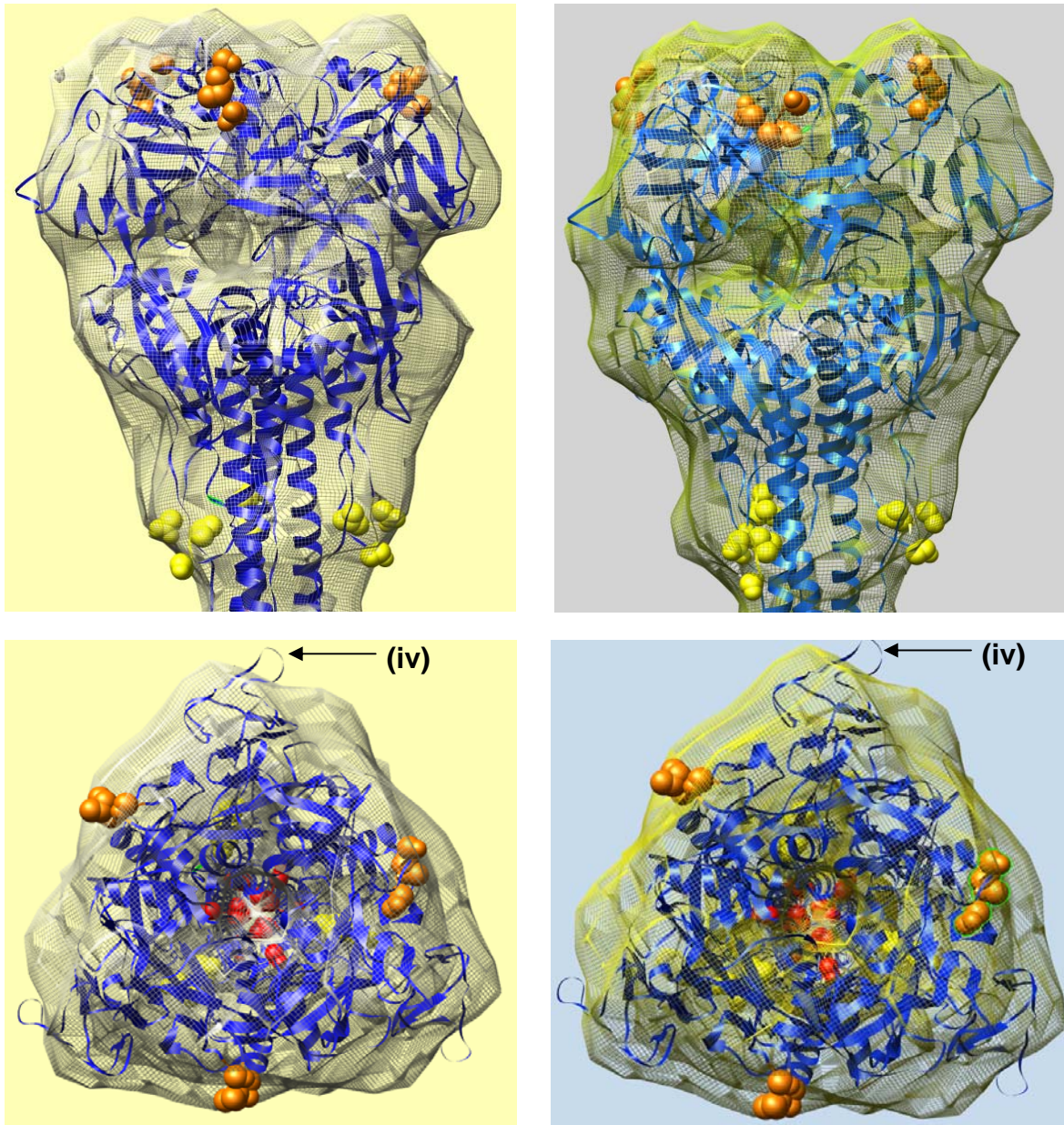


Figura V.4. Docking del volumen 3D y el modelo informático de la estructura del ectodominio de la proteína F del MNVH. En los paneles superiores se muestra una vista lateral de la cabeza en diferentes colores para poder apreciar mejor diferencias en la adecuación del modelo informático. En los paneles inferiores se muestran vistas superiores del trímero, en este se indica el segmento de los aminoácidos 393-405 que queda fuera del volumen 3D (iv). En formato de bolas naranjas se muestra el sitio de glicosilación N353

De esta manera, el perfil de elución en la columna de filtración en gel de la proteína FTM del MNVH purificada, así como las imágenes de microscopía y, el promedio bidimensional y el volumen 3D originado a partir de éstas, apoyan que la proteína tiene una conformación trimérica, lo que parece general en las proteínas de fusión de los paramixovirus. En otras proteínas de fusión (gp41 del VIH-1; gp41 del VIS, HA del virus de la gripe A, GP2 del virus ébola, Env-TM del virus de la leucemia murina de Moloney, y

la proteína gp64 de baculovirus, entre otras) también se ha podido determinar que su estructura tridimensional es de trímero (Weissenhorn *et al.*, 1999). Todo ello sugiere la existencia de un alto grado de similitud en la estructura cuaternaria de las proteínas virales de fusión.

V.3.4. Requerimientos funcionales de la proteína F del MNVH; comparación con los requerimientos necesarios para otras proteínas de fusión.

En cuanto a la funcionalidad de la proteína F del MNVH, los resultados detallados en esta tesis indican que esta proteína requiere, a diferencia del resto de los neumovirus, la adición de tripsina al medio para fusionar, y que esta fusión ocurre a pH neutro. Además, como el resto de los miembros de esta subfamilia no requiere de la co-transfección de la proteína de adhesión G para formar sincitios.

El hecho de que la proteína pueda fusionar a pH neutro concuerda con la idea de que la entrada de los paramixovirus ocurre por la fusión de la membrana viral y celular.

El análisis de las proteínas F de los diferentes linajes en los ensayos de formación de sincitios, sugiere que la glicina en la posición 294 es un determinante para que la fusión sea dependiente de pH, al menos para las proteínas F del linaje A.

Se sabe que la protonación de los residuos histidina es importante en la activación de ciertas proteínas de fusión que requieren pH ácido para fusionar (Carneiro. *et al.*, 2003). Dado que el residuo 294 está localizado en la base de la cabeza en el modelo “pre-activo” de la proteína F del MNVH, en las proximidades de una histidina (H368), proponemos que los aminoácidos glutámico o glicina podrían influir de manera diferente en la protonación de la histidina 368. Es decir, que el glutámico en la posición 294 facilite la protonación de la histidina 368 incluso a pH neutro, mientras que la protonación de esta histidina requiera pH ácido cuando el aminoácido en dicha posición es una glicina. Sin embargo este no parece ser el caso para las proteínas F del linaje B. Estas diferencias podrían ser debidas a la influencia de otros aminoácidos, diferentes en las proteínas F del linaje B, en las proximidades de esta histidina 368 (figura V.5).

La ausencia de glicina en la posición 294 de la secuencia de las proteínas F del linaje B publicadas, apoya la hipótesis de que la fusión dependiente de pH ácido se restringe a las proteínas F del linaje A. Por otra parte, dado que las cepas que tienen una glicina en la posición 294 representan sólo una pequeña proporción de las secuencias de proteínas F del linaje A publicadas (27 de 433), la dependencia del pH ácido es probablemente una peculiaridad de ciertas proteínas F del MNVH, más que un mecanismo general de fusión.

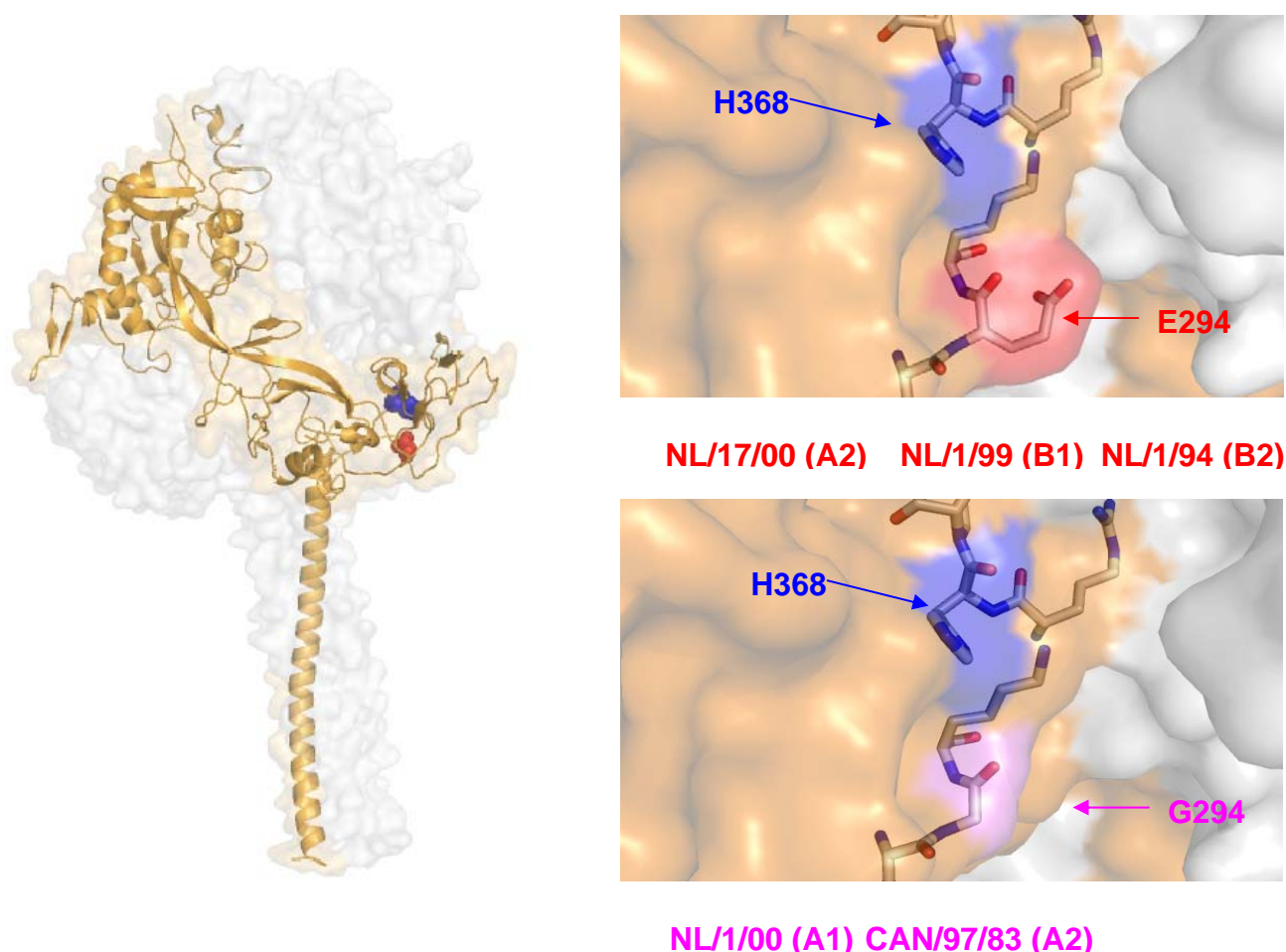


Figura V.5. Localización de los residuos 294 y la histidina 368 en el modelo “pre-fusión” de la proteína F del MNVH. En el panel de la izquierda se muestra su ubicación en la estructura de la proteína. En los paneles de la derecha se muestra la proximidad que existe entre el residuo en la posición 294 y la histidina de la posición 368.

Es interesante destacar que se ha observado que la cepa NL/1/94(B2), a partir de la cual se clonó la proteína F_{NL-B2} utilizada en este trabajo, adquiere ciertas mutaciones en la proteína de fusión del virus a medida que este se pasa en cultivo (células Vero 118). Al comparar en ensayos de formación de sincitios la proteína F tipo salvaje y la proteína F

mutante obtenida luego de los pases, se observa que esta última tiene una capacidad fusogénica mayor (Herfst y colaboradores; artículo enviado). Un comportamiento similar fue observado cuando virus de la cepa NL/1/99(B1) se pasó rutinariamente a bajas temperaturas (Ron Fouchier, comunicación personal). Es posible que los pasajes *in vitro* pudieran seleccionar mutaciones en la proteína F, que mejoraran la replicación viral y también la capacidad fusogénica de esta proteína.

Tanto la proteína F_{CAN-A2} como la F_{NL-A1} fueron clonadas a partir de cepas que han sido aisladas a partir de células en cultivos, mientras que la mayoría de las secuencias disponibles para la proteína F en las bases de datos derivan del secuenciamiento directo de muestras clínicas. Así, la mutación 294G presente en ambas proteínas podría haberse seleccionado por su pase repetitivo en cultivos celulares.

V.4. OBTENCIÓN DE REACTIVOS INMUNOQUÍMICOS FRENTE A LA PROTEÍNA F DEL MNVH

V.4.1. Pool de sueros humanos

Estos sueros se consideraron como primera opción para la detección del MNVH, y como se esperaba dada la alta incidencia de este virus en la población mundial, fueron positivos.

Un resultado hasta ahora no descrito es que estos sueros que reconocen al MNVH, reconocieron también a la glicoproteína F en células infectadas por los vaccinia recombinantes vv-F y vv-FTM. Estos sueros constituyen por tanto una importante herramienta para detección del MNVH y de las distintas formas de la proteína F del virus.

Teniendo en cuenta la poca variabilidad genética que existe entre los dos linajes (diferencia que es mayor entre los sublinajes) en la proteína F (94-97% de identidad aminoacídica) y que además, se sabe que las otras dos proteínas de membrana (las proteínas G y SH) son aparentemente poco inmunogénicas y en cambio la proteína F es muy inmunogénica (Skiadopoulos *et al.*, 2006), es factible pensar que

independientemente de la cepa tipo del MNVH que hubiese infectado a las personas de las que se extrajeron los sueros, reconocerían a la proteína F clonada en nuestro laboratorio.

No se puede inferir nada concluyente del porcentaje de individuos que presentan serología positiva para el virus ya que sólo se analizaron 15 muestras. Sería interesante realizar un análisis con un mayor número de muestras, de distintos años, para poder dilucidar rangos de edades de seropositividad y seroprevalencia en España.

V.4.2. Sueros policlonales dirigidos frente a péptidos sintéticos

Teniendo en cuenta los resultados presentados en el apartado IV.4.B todos los péptidos indujeron una respuesta inmune en los conejos inoculados, aunque el título alcanzado, incluso con el mismo péptido fue distinto en cada uno de los conejos. Sin embargo, aunque todos los sueros reconocieron a los péptidos a partir de los cuales fueron originados y a la proteína F del MNVH en estado desnaturalizado (*western blot*), no fueron capaces de reconocer a la proteína en ensayos de ELISA, inmunofluorescencia o neutralización, donde la proteína tiene un estado nativo o cuasi-nativo.

Según el perfil hidrofóbico realizado sobre la secuencia de la proteína F del MNVH, todos los péptidos mostraron un carácter hidrofílico por lo que estarían presumiblemente expuestos. Una correlación con esta predicción se observa si ubicamos los tres péptidos en los modelos informáticos presentados en el apartado IV.3.B de los Resultados. Los péptidos F₈₃₋₁₀₂ (rojo) y F₄₆₅₋₄₈₄ (azul) están muy expuestos en el modelo pre-fusión (Paneles A y B figura V.6), en cambio el péptido F₂₂₆₋₂₄₄ (amarillo) se encuentra más escondido. En el modelo que se propone como estado post-fusión, todos los péptidos aparecen expuestos (Paneles C y D figura V.6). El péptido F₈₃₋₁₀₂ se divide menos porque este modelo carece de los aminoácidos 91 a 125. Estas predicciones apuntan a que la falta de reconocimiento no sería debido a que estas zonas no estén expuestas en la proteína.

En los paneles E, F y G de la figura V.6 se muestra la conformación que se propone para los diferentes péptidos en la proteína. Dado que los péptidos son cortos

(aproximadamente 20 aminoácidos), es muy probable que no estén adoptando la conformación que tienen en la proteína F del MNVH y por esto los sueros obtenidos no los reconocen en la proteína nativa. Estos resultados coinciden con un trabajo previo realizado con péptidos de la proteína F del VRSH en nuestro laboratorio (López *et al.*, 1993). En este estudio los péptidos F255-275 (21 residuos), F235-275 (41 residuos) y F215-275 (61 residuos), se inocularon en conejos y ratones obteniendo altos títulos de anticuerpos anti-péptidos en todos los casos. Sin embargo, ninguno de los sueros obtenidos en conejos reconoció a la proteína F nativa, y de los sueros obtenidos en ratones, solo el suero anti-péptido F215-275 (61 residuos) reconoció débilmente a la proteína F nativa. Estudios estructurales de estos péptidos mostraron que el incremento en la antigenicidad del péptido más largo, se correlacionaba con la conformación adoptada por los péptidos en solución, ya que el espectro de dicroísmo circular de los péptidos F255-275 y F235-275 fue similar, y con un alto contenido de estructuras aperiódicas, en cambio el péptido F215-275 mostró un alto contenido de estructuras periódicas (α -hélices y/o hojas β).

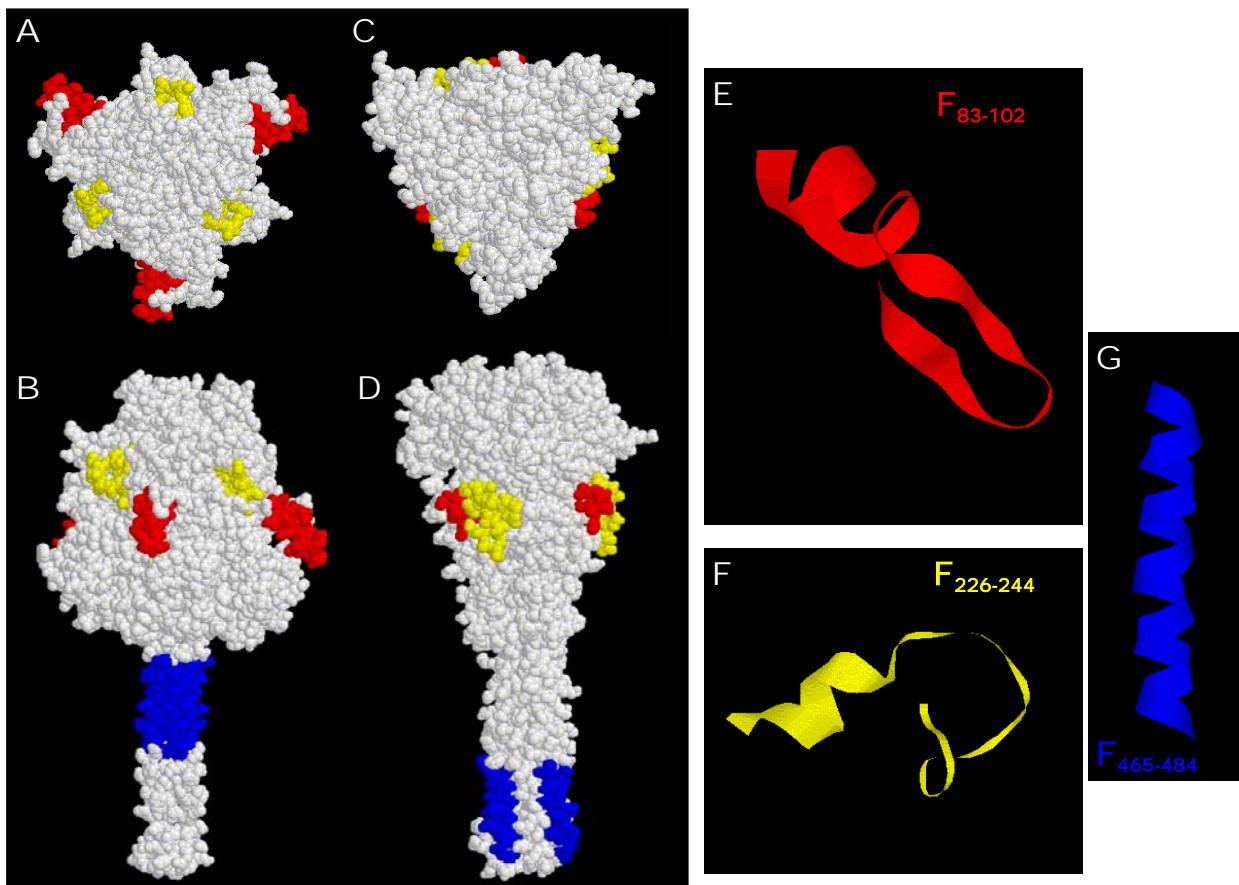


Figura V.6. Ubicación en el modelo estructural informático de los péptidos utilizados para la inoculación (paneles A a D) y estructura de los péptidos en este modelo (Panel E a G). Los 3 péptidos se han resaltado en los modelos informáticos que se propone pertenecen a los estados pre (izquierda) y post-fusión (derecha) presentados en Resultados. Los paneles E, F y G muestran la estructura que los péptidos adoptan en estos modelos **Péptido 82-103:** color rojo; **Péptido 226-244:** color amarillo; **Péptido 464-485:** color azul.

V.4.3. Sueros policlonales de conejos inoculados con virus vaccinia recombinantes.

Los sueros de conejos inoculados con los virus vv-F o vvFTM- contienen anticuerpos específicos que reconocieron tanto a las formas desnaturalizadas de la proteína F del MNVH, como a la forma nativa, ya que fueron capaces de neutralizar la infección viral. Estos resultados indican que como en el caso de la proteína F del VRSH, la proteína F del MNVH adoptó una conformación similar a la forma existente en la membrana viral (Olmsted *et al.*, 1986; Stott *et al.*, 1987; Wertz *et al.*, 1987).

El sistema de virus vaccinia recombinantes fue escogido para la inoculación de conejos, porque ha sido una herramienta muy utilizada desde su desarrollo en la década de los 80 (Mackett *et al.*, 1982), para la expresión y caracterización de una multitud de genes virales o no. De hecho, los virus vaccinia recombinantes han sido ampliamente utilizados para la caracterización de proteínas homólogas a la F del MNVH, en virus tan relacionados como el virus de la parainfluenza humana tipo 3 (Spriggs *et al.*, 1987) o el virus respiratorio sincitial. Las glicoproteínas de membrana F y G del VRSH que han sido expresadas utilizando este sistema, fueron indistinguibles de las producidas en una infección por el VRSH en lo que respecta a glicosilación, puentes disulfuros, distribución celular, expresión en la superficie celular, antigenicidad o movilidad electroforética (Ball *et al.*, 1986; Olmsted *et al.*, 1986; Stott *et al.*, 1987; Wertz *et al.*, 1987). Por otro lado, la inoculación de estos recombinantes en una gran variedad de animales dio como resultado antisueros específicos para estas proteínas, con altas concentraciones de anticuerpos neutralizantes para el VRSH.

Bembridge y colaboradores publicaron que la respuesta inducida al inocular ratones con virus vaccinia recombinantes que expresaban la forma completa o soluble de la proteína F del virus respiratorio sincitial humano, no había mostrado diferencias cuantitativas o cualitativas importantes (Bembridge *et al.*, 1999). En nuestro caso no se hicieron ensayos para determinar qué tipo de anticuerpos fueron inducidos, pero del ELISA de la figura IV.8 de Resultados se desprende que aparentemente, los sueros de los conejos inoculados con el virus vaccinia recombinante que expresa la proteína soluble tienen un título levemente inferior.

Por último, dado que tanto los sueros originados a partir del virus vaccinia que

expresa la proteína completa, como los originados a partir del virus vaccinia que expresa la proteína sin la región transmembrana y citoplasmática, pudieron neutralizar la infectividad viral, la conformación que ambas adoptan debe, o ser similar o compartir epítomos con la proteína que se encuentra en la membrana viral.

V.4.4. Sueros policlonales de conejos inoculados con proteína FTM-6His purificada.

La proteína FTM-6His inoculada en conejos originó unos sueros que mostraron una mayor reactividad con la proteína F en los ensayos de ELISA en comparación con los sueros obtenidos frente a péptidos de la proteína F o frente a virus vaccinia recombinantes. También dieron una señal más intensa en los ensayos de *western blot* y de inmunofluorescencia y, en general, se mostraron superiores a los demás antisueros en los ensayos de neutralización.

Es destacable el hecho de que la proteína purificada, que no tiene la región transmembrana, ni se le ha agregado ninguna secuencia estabilizadora homóloga a la secuencia GCNt (Yin *et al.*, 2006), y que por tanto estaría en el que se supone estado de post-fusión, sea capaz de neutralizar la infectividad del MNVH, seguramente a través de una interacción con la proteína F (en estado pre-activo). Estos resultados sugieren que podrían existir epítomos comunes entre la forma pre-activa o los intermediarios y la forma post-activa de la proteína.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- 1.- El MNVH (cepa NL/1/99) crece mejor en células Vero118 o LLC-MK2 y siempre en presencia de tripsina (2µg/ml). El efecto citopático se observa a partir de los 3 días, y a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los paramixovirus, no existe una formación clara de sincitios, sino más bien la formación de cúmulos de células redondeadas que se desprenden de la placa en los estadíos avanzados de la infección.
- 2.- Se ha puesto a punto un ensayo de formación de focos infecciosos que será de utilidad para seguir la infección por el MNVH. Este ensayo podrá utilizarse entre otros para titulación del MNVH, y para la evaluación de reactivos en ensayos de neutralización viral. Este ensayo sería también de utilidad para el seguimiento del rescate del MNVH en sistemas de genética reversa.
- 3.- Se han producido anticuerpos que permiten la detección del MNVH y de la proteína de fusión (F) del mismo en los diferentes ensayos que se utilizan de manera rutinaria en el laboratorio (ensayos de inmunofluorescencia, *western blot* y ELISA). Además, varios de los sueros originados son capaces de neutralizar la infección viral.
- 4.- Se han generado virus vaccinia recombinantes que permiten la expresión de una forma soluble de la proteína F que, teniendo en cuenta los ensayos de neutralización viral realizados con los sueros de los conejos inoculados con la proteína purificada, indican que esta proteína debe adoptar una conformación muy similar o compartir epítomos con la proteína que se encuentra en la membrana viral.
- 5.- Se ha puesto a punto un protocolo de purificación de la proteína FTM-6His, que nos permitió alcanzar una pureza suficiente para analizar esta proteína al microscopio electrónico.
- 6.- El volumen 3D de la proteína FTM-6His se determinó a partir de micrográficas tomadas al microscopio electrónico. El procesamiento y análisis de estas imágenes muestra que la proteína FTM-6His, como sus proteínas homólogas de la familia de los paramixovirus, es un trímero y tiene una estructura en forma de cono de aproximadamente 17nm de longitud

en la que pueden diferenciarse tres partes: cabeza, cuello y tallo.

7.- Se ha elaborado un modelo de la estructura tridimensional de la proteína F del MNVH, en el que se supone es el estado post-fusión, basado en la estructura atómica de la proteína F del virus de la parainfluenza humana tipo 3. Este modelo se puede encajar en el volumen 3D generado a partir de la microscopía electrónica.

8.- La proteína F del MNVH de la cepa NL/1/99 clonada en el pCAGGs es capaz de inducir la formación de sincitios independiente del pH en células transfectadas. Como en el caso del VRSH no requiere de la co-expresión de la proteína G para la formación de sincitios, pero sin embargo, sí requiere de la adición de tripsina.

9.- El aminoácido en la posición 294 de la proteína F del linaje A del MNVH parece ser importante para su capacidad fusogénica. Un residuo de glicina en esta posición determina que la proteína sea dependiente de pH para inducir la formación de sincitios en las proteínas del linaje A, aunque no para las proteínas F del linaje B. Dado que, el residuo glicina en la posición 294 se encuentra sólo en una pequeña proporción de las secuencias de proteína F del linaje A publicadas (27 de las 433), la dependencia del pH ácido para fusionar es probablemente una característica poco común entre las proteínas de fusión del MNVH.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Baker, K.A., Dutch, R.E., Lamb, R.A. y Jardetzky, T.S. (1999) Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Mol Cell* 3(3), 309-19.
- Ball, L.A., Young, K.K., Anderson, K., Collins, P.L. y Wertz, G.W. (1986) Expression of the major glycoprotein G of human respiratory syncytial virus from recombinant vaccinia virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(2), 246-50.
- Bastien, N., Ward, D., Van Caesele, P., Brandt, K., Lee, S.H., McNabb, G., Klisko, B., Chan, E. y Li, Y. (2003) Human metapneumovirus infection in the Canadian population. *J Clin Microbiol* 41(10), 4642-6.
- Bembridge, G.P., Lopez, J.A., Bustos, R., Melero, J.A., Cook, R., Mason, H. y Taylor, G. (1999) Priming with a secreted form of the fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV) promotes interleukin-4 (IL-4) and IL-5 production but not pulmonary eosinophilia following RSV challenge. *J Virol* 73(12), 10086-94.
- Biacchesi, S., Pham, Q.N., Skiadopoulos, M.H., Murphy, B.R., Collins, P.L. y Buchholz, U.J. (2005) Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. *J Virol* 79(19), 12608-13.
- Biacchesi, S., Skiadopoulos, M.H., Boivin, G., Hanson, C.T., Murphy, B.R., Collins, P.L. y Buchholz, U.J. (2003) Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology* 315(1), 1-9.
- Biacchesi, S., Skiadopoulos, M.H., Tran, K.C., Murphy, B.R., Collins, P.L. y Buchholz, U.J. (2004a) Recovery of human metapneumovirus from cDNA: optimization of growth in vitro and expression of additional genes. *Virology* 321, 247-259.
- Biacchesi, S., Skiadopoulos, M.H., Yang, L., Lamirande, E.W., Tran, K.C., Murphy, B.R., Collins, P.L. y Buchholz, U.J. (2004b) Recombinant human Metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate. *J Virol* 78(23), 12877-87.
- Blasco, R. y Moss, B. (1995) Selection of recombinant vaccinia viruses on the basis of plaque formation. *Gene* 158(2), 157-62.
- Boivin, G., Abed, Y., Pelletier, G., Ruel, L., Moisan, D., Cote, S., Peret, T.C., Erdman, D.D. y Anderson, L.J. (2002) Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 186(9), 1330-4.
- Boivin, G., De Serres, G., Cote, S., Gilca, R., Abed, Y., Rochette, L., Bergeron, M.G. y Dery, P. (2003) Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis* 9(6), 634-40.
- Buchholz, U.J., Biacchesi, S., Pham, Q.N., Tran, K.C., Yang, L., Luongo, C.L., Skiadopoulos, M.H., Murphy, B.R. y Collins, P.L. (2005) Deletion of M2 gene open reading frames 1 and 2 of human metapneumovirus: effects on RNA synthesis, attenuation, and immunogenicity. *J Virol* 79(11), 6588-97.
- Buchholz, U.J., Finke, S. y Conzelmann, K.K. (1999) Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *J Virol* 73(1), 251-9.
- Calder, L.J., Gonzalez-Reyes, L., García-Barreno, B., Wharton, S.A., Skehel, J.J., Wiley, D.C. y Melero, J.A. (2000) Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. *Virology* 271(1), 122-31.

- Cantín, C., Holguera, J., Ferreira, L., Villar, E. y Muñoz-Barroso, I. (2007) Newcastle disease virus may enter cells by caveolae-mediated endocytosis. *J Gen Virol* 88, 559-569.
- Carneiro, F.A., Stauffer, F., Lima, C.S., Juliano, M.A., Juliano, L. y Da Poian, A.T. (2003) Membrane fusion induced by the Vesicular Stomatitis Virus depends on histidine protonation. *J.Biol. Chem* 278, 13789-13794.
- Collins, P.L., and Crowe, James E. Jr. (2006) En "Fields Virology", 5ta Ed. Chapter 46. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. pág 1601-1646. Editado por D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lipopincott Williams & Wilkins.
- Collins, P.L., Hill, M.G., Camargo, E., Grosfeld, H., Chanock, R.M. y Murphy, B.R. (1995) Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(25), 11563-7.
- Collins, P.L., Hill, M.G., Cristina, J. y Grosfeld, H. (1996) Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1), 81-5.
- Connolly, S.A., Leser, G.P., Yin, H.S., Jardetzky, T.S. y Lamb, R.A. (2006) Refolding of a paramyxovirus F protein from prefusion to postfusion conformations observed by liposome binding and electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(47), 17903-8.
- Corpet, F. (1988) "Multiple sequence alignment with hierarchical clustering" ; (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>).
- Corral, T., Ver, L.S., Mottet, G., Cano, O., García-Barreno, B., Calder, L.J., Skehel, J.J., Roux, L. y Melero, J.A. (2007) High level expression of soluble glycoproteins in the allantoic fluid of embryonated chicken eggs using a Sendai virus minigenome system. *BMC Biotechnol* 7, 17.
- Cseke, G., Wright, D.W., Tollefson, S.J., Johnson, J.E., Crowe, J.E., Jr. y Williams, J.V. (2007) Human metapneumovirus fusion protein vaccines that are immunogenic and protective in cotton rats. *J Virol* 81(2), 698-707.
- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M. y Kim, P.S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89(2), 263-73.
- Chan, D.C. y Kim, P.S. (1998) HIV entry and its inhibition. *Cell* 93(5), 681-4.
- Chen, L., Colman, P.M., Cosgrove, L.J., Lawrence, M.C., Lawrence, L.J., Tulloch, P.A. y Gorman, J.J. (2001a) Cloning, expression, and crystallization of the fusion protein of Newcastle disease virus. *Virology* 290(2), 290-9.
- Chen, L., Gorman, J.J., McKimm-Breschkin, J., Lawrence, L.J., Tulloch, P.A., Smith, B.J., Colman, P.M. y Lawrence, M.C. (2001b) The structure of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus suggests a novel paradigm for the molecular mechanism of membrane fusion. *Structure* 9(3), 255-66.
- Daecke, J., Fackler, O.T., Dittmar, M.T. y Krausslich, H.G. (2005) Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immuno-deficiency virus type 1 entry. *J Virol* 79, 1581-1594.
- de Swart, R.L., van den Hoogen, B.G., Kuiken, T., Herfst, S., van Amerongen, G., Yuksel, S., Sprong, L. y Osterhaus, A.D. (2007) Immunization of macaques with formalin-inactivated human metapneumovirus induces hypersensitivity to hMPV infection. *Vaccine* 25(51), 8518-28.
- Dollner, H., Risnes, K., Radtke, A. y Nordbo, S.A. (2004) Outbreak of human metapneumovirus infection in norwegian children. *Pediatr Infect Dis J* 23(5), 436-40.

- Dunn, K. y Maxfield, F.R. (1998) Ratio imaging instrumentation. *Methods Cell Biol* 56, 217-36.
- Dutch, R.E., Jardetzky, T.S. y Lamb, R.A. (2000) Virus membrane fusion proteins: biological machines that undergo a metamorphosis. *Biosci Rep* 20(6), 597-612.
- Ebihara, T., Endo, R., Kikuta, H., Ishiguro, N., Yoshioka, M., Ma, X. y Kobayashi, K. (2003) Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan. *J Med Virol* 70(2), 281-3.
- Ebihara, T., Endo, R., Ma, X., Ishiguro, N. y Kikuta, H. (2005) Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent-antibody test. *J Clin Microbiol* 43(3), 1138-41.
- Escribano-Romero, E., Rawling, J., García-Barreno, B. y Melero, J.A. (2004) The soluble form of human respiratory syncytial virus attachment protein differs from the membrane-bound form in its oligomeric state but is still capable of binding to cell surface proteoglycans. *J Virol* 78(7), 3524-32.
- Esper, F., Boucher, D., Weibel, C., Martinello, R.A. y Kahn, J.S. (2003) Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* 111(6 Pt 1), 1407-10.
- Esper, F., Martinello, R.A., Boucher, D., Weibel, C., Ferguson, D., Landry, M.L. y Kahn, J.S. (2004) A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. *J Infect Dis* 189(8), 1388-96.
- Falsey, A.R., Erdman, D., Anderson, L.J. y Walsh, E.E. (2003) Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis* 187(5), 785-90.
- Frank, J. (1996) Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies. Academic Press (publisher), Inc.
- Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M. y Leith, A. (1996) SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol* 116(1), 190-9.
- Freymouth, F., Vabret, A., Legrand, L., Eterradossi, N., Lafay-Delaire, F., Brouard, J. y Guillois, B. (2003) Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 22(1), 92-4.
- Fuentes, S., Tran, K.C., Luthra, P., Teng, M.N. y He, B. (2007) Function of the respiratory syncytial virus small hydrophobic protein. *J Virol* 81(15), 8361-6.
- Fuerst, T.R., Niles, E.G., Studier, F.W. y Moss, B. (1986) Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(21), 8122-6.
- Galiano, M., Trento, A., Ver, L., Carballal, G. y Videla, C. (2006) Genetic heterogeneity of G and F protein genes from Argentinean human metapneumovirus strains. *J Med Virol* 78(5), 631-7.
- García-Barreno, B., Delgado, T. y Melero, J.A. (1996) Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. *J Virol* 70(2), 801-8.
- García-Barreno, B., Palomo, C., Penas, C., Delgado, T., Perez-Brena, P. y Melero, J.A. (1989) Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J Virol* 63(2), 925-32.
- García, J., García-Barreno, B., Vivo, A. y Melero, J.A. (1993) Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology* 195(1), 243-7.

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; in John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>).
- Glaser, C.A., Honarmand, S., Anderson, L.J., Schnurr, D.P., Forghani, B., Cossen, C.K., Schuster, F.L., Christie, L.J. y Tureen, J.H. (2006) Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis* 43(12), 1565-77.
- González-Reyes, L., Ruiz-Arguello, M.B., García-Barreno, B., Calder, L., López, J.A., Albar, J.P., Skehel, J.J., Wiley, D.C. y Melero, J.A. (2001) Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17), 9859-64.
- Graaf de, M., Herfst, S., Schrauwen, E.J.A., van den Hoogen, B., Osterhaus, A.D.M.E. y Fouchier, R.A.M. (2007) An improved plaque reduction virus neutralization assay for human metapneumovirus. *Journal of Virological Methods* 143(2), 169-74.
- Greensill, J., McNamara, P.S., Dove, W., Flanagan, B., Smyth, R.L. y Hart, C.A. (2003) Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis* 9(3), 372-5.
- Hallak, L.K., Collins, P.L., Knudson, W. y Peeples, M.E. (2000) Iduronic acid-containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection. *Virology* 271(2), 264-75.
- Hamelin, M.E., Abed, Y. y Boivin, G. (2004) Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 38(7), 983-90.
- Hamelin, M.E., Prince, G.A. y Boivin, G. (2006) Effect of ribavirin and glucocorticoid treatment in a mouse model of human metapneumovirus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 50(2), 774-7.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4), 557-80.
- Hardy, R.W., Harmon, S.B. y Wertz, G.W. (1999) Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. *J Virol* 73(1), 170-6.
- He, B., Lin, G.Y., Durbin, J.E., Durbin, R.K. y Lamb, R.A. (2001) The SH integral membrane protein of the paramyxovirus simian virus 5 is required to block apoptosis in MDBK cells. *J Virol* 75(9), 4068-79.
- Herfst, S., de Graaf, M., Schickli, J.H., Tang, R.S., Kaur, J., Yang, C.F., Spaete, R.R., Haller, A.A., van den Hoogen, B.G., Osterhaus, A.D. y Fouchier, R.A. (2004) Recovery of human metapneumovirus genetic lineages a and B from cloned cDNA. *J Virol* 78(15), 8264-70.
- Herfst, S., de Graaf, M., Schrauwen, E.J., Ulbrandt, N.D., Barnes, A.S., Senthil, K., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A. y van den Hoogen, B.G. (2007) Immunization of Syrian golden hamsters with F subunit vaccine of human metapneumovirus induces protection against challenge with homologous or heterologous strains. *J Gen Virol* 88(Pt 10), 2702-9.
- Hernandez, L.D., Hoffman, L.R., Wolfsberg, T.G. y White, J.M. (1996) Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 627-61.
- Howe, M. (2002) Australian find suggests worldwide reach for metapneumovirus. *Lancet Infect Dis* 2(4), 202.
- Johnson, S., Oliver, C., Prince, G.A., Hemming, V.G., Pfarr, D.S., Wang, S.C., Dormitzer, M., O'Grady, J., Koenig, S., Tamura, J.K., Woods, R., Bansal, G., Couchenour, D., Tsao, E., Hall, W.C. y Young, J.F. (1997) Development of a humanized monoclonal

- antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 176(5), 1215-24.
- Kaida, A., Iritani, N., Kubo, H., Shiomi, M., Kohdera, U. y Murakami, T. (2006) Seasonal distribution and phylogenetic analysis of human metapneumovirus among children in Osaka City, Japan. *J Clin Virol* 35(4), 394-9.
- Kaverin, N.V. y Webster, R.G. (1995) Impairment of multicycle influenza virus growth in Vero (WHO) cells by loss of trypsin activity. *J Virol* 69(4), 2700-3.
- Kim, H.W., Canchola, J.G., Brandt, C.D., Pyles, G., Chanock, R.M., Jensen, K. y Parrott, R.H. (1969) Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol* 89(4), 422-34.
- Kuo, L., Grosfeld, H., Cristina, J., Hill, M.G. y Collins, P.L. (1996) Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *J Virol* 70(10), 6892-901.
- Kyte, J. y Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* 157(1), 105-32.
- Lamb, R.A. (1993) Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology* 197(1), 1-11.
- Lamb, R.A. y Friffith, D P. (2006) En "Fields Virology", 5ta Ed. Chapter 41. Paramyxoviridae: The Viruses and their replication. pág 1449-1497. Editado por D.M. Knipe & P.M. Howley. Philadelphia: Lipopincott Williams & Wilkins.
- Lamb, R.A. y Jardetzky, T.S. (2007) Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus. *F. Curr Opin Struct Biol* 17(4), 427-36.
- Lambert, D.M., Barney, S., Lambert, A.L., Guthrie, K., Medinas, R., Davis, D.E., Bucy, T., Erickson, J., Merutka, G. y Petteway, S.R., Jr. (1996) Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(5), 2186-91.
- Landry, M.L., Ferguson, D., Cohen, S., Peret, T.C. y Erdman, D.D. (2005) Detection of human metapneumovirus in clinical samples by immunofluorescence staining of shell vial centrifugation cultures prepared from three different cell lines. *J Clin Microbiol* 43(4), 1950-2.
- Lawrence, M.C., Borg, N.A., Streltsov, V.A., Pilling, P.A., Epa, V.C., Varghese, J.N., McKimm-Breschkin, J.L. y Colman, P.M. (2004) Structure of the haemagglutinin-neuraminidase from human parainfluenza virus type III. *J Mol Biol* 335(5), 1343-57.
- Lescar, J., Roussel, A., Wien, M.W., Navaza, J., Fuller, S.D., Wengler, G. y Rey, F.A. (2001) The fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell* 105, 137-148.
- Lin, Y., Bright, A.C., Rothermel, T.A. y He, B. (2003) Induction of apoptosis by paramyxovirus simian virus 5 lacking a small hydrophobic gene. *J Virol* 77(6), 3371-83.
- Ling, R., Davis, P.J., Yu, Q., Wood, C.M., Pringle, C.R., Cavanagh, D. y Easton, A.J. (1995) Sequence and in vitro expression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus. *Virus Res* 36(2-3), 247-57.
- López, J.A., Andreu, D., Carreno, C., Whyte, P., Taylor, G. y Melero, J.A. (1993) Conformational constraints of conserved neutralizing epitopes from a major antigenic area of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J Gen Virol* 74 (Pt 12), 2567-77.
- Ludtke, S.J., Baldwin, P.R. y Chiu, W. (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol* 128(1), 82-97.

- Ludwig, K., Baljinnyam, B., Herrmann, A. y Böttcher, C. (2003) The 3D structure of the fusion pimed Sendai F-protein determined by electron cryomicroscopy. *Embo J* 22 No.15, 3761-3771.
- Mackett, M., Smith, G.L. y Moss, B. (1982) Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(23), 7415-9.
- MacPhail, M., Schickli, J.H., Tang, R.S., Kaur, J., Robinson, C., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., Spaete, R.R. y Haller, A.A. (2004) Identification of small-animal and primate models for evaluation of vaccine candidates for human metapneumovirus (hMPV) and implications for hMPV vaccine design. *J Gen Virol* 85(Pt 6), 1655-63.
- Madhi, S.A., Ludewick, H., Abed, Y., Klugman, K.P. y Boivin, G. (2003) Human metapneumovirus-associated lower respiratory tract infections among hospitalized human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected and HIV-1-uninfected African infants. *Clin Infect Dis* 37(12), 1705-10.
- Maertzdorf, J., Wang, C.K., Brown, J.B., Quinto, J.D., Chu, M., de Graaf, M., van den Hoogen, B.G., Spaete, R., Osterhaus, A.D. y Fouchier, R.A. (2004) Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *J Clin Microbiol* 42(3), 981-6.
- Maggi, F., Pifferi, M., Vatteroni, M., Fornai, C., Tempestini, E., Anzilotti, S., Lanini, L., Andreoli, E., Ragazzo, V., Pistello, M., Specter, S. y Bendinelli, M. (2003) Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. *J Clin Microbiol* 41(7), 2987-91.
- Manoha, C., Espinosa, S., Aho, S.L., Huet, F. y Pothier, P. (2007) Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *J Clin Virol* 38(3), 221-6.
- Martinez, I. y Melero, J.A. (2000) Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J Gen Virol* 81(Pt 11), 2715-22.
- Melikyan, G.B., Barnard, R.J., Abrahamyan, L.G., Mothes, W. y Young, J.A. (2005) Imaging individual retroviral fusion events: from hemifusion to pore formation and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(24), 8728-33.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetic*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Mink, M.A., Stec, D.S. y Collins, P.L. (1991) Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* 185(2), 615-24.
- Miyazaki, J., Takaki, S., Araki, K., Tashiro, F., Tominaga, A., Takatsu, K. y Yamamura, K. (1989) Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene* 79(2), 269-77.
- Morrison, T.G. (1988) Structure, function, and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res* 10(2-3), 113-35.
- Moss, B., Elroy-Stein, O., Mizukami, T., Alexander, W.A. y Fuerst, T.R. (1990) Product review. New mammalian expression vectors. *Nature* 348(6296), 91-2.
- Mullins, J.A., Erdman, D.D., Weinberg, G.A., Edwards, K., Hall, C.B., Walker, F.J., Iwane, M. y Anderson, L.J. (2004) Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 10(4), 700-5.
- NCMI-EMAN. National Center for Macromolecular Imaging. <http://ncmi.bcm.tmc.edu/ncmi>
- Niwa, H., Yamamura, K. y Miyazaki, J. (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108(2), 193-9.
- Olmsted, R.A., Elango, N., Prince, G.A., Murphy, B.R., Johnson, P.R., Moss, B., Chanock, R.M. y Collins, P.L. (1986) Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of

- the F and G glycoproteins to host immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(19), 7462-6.
- Peiris, J.S., Tang, W.H., Chan, K.H., Khong, P.L., Guan, Y., Lau, Y.L. y Chiu, S.S. (2003) Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis* 9(6), 628-33.
- Pelletier, G., Dery, P., Abed, Y. y Boivin, G. (2002) Respiratory tract reinfections by the new human Metapneumovirus in an immunocompromised child. *Emerg Infect Dis* 8(9), 976-8.
- Percivalle, E., Sarasini, A., Visai, L., Revello, M.G. y Gerna, G. (2005) Rapid detection of human metapneumovirus strains in nasopharyngeal aspirates and shell vial cultures by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 43(7), 3443-6.
- Peret, T.C., Boivin, G., Li, Y., Couillard, M., Humphrey, C., Osterhaus, A.D., Erdman, D.D. y Anderson, L.J. (2002) Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis* 185(11), 1660-3.
- Pham, Q.N., Biacchesi, S., Skiadopoulos, M.H., Murphy, B.R., Collins, P.L. y Buchholz, U.J. (2005) Chimeric recombinant human metapneumoviruses with the nucleoprotein or phosphoprotein open reading frame replaced by that of avian metapneumovirus exhibit improved growth in vitro and attenuation in vivo. *J Virol* 79(24), 15114-22.
- Randhawa, J.S., Wilson, S.D., Tolley, K.P., Cavanagh, D., Pringle, C.R. y Easton, A.J. (1996) Nucleotide sequence of the gene encoding the viral polymerase of avian pneumovirus. *J Gen Virol* 77 (Pt 12), 3047-51.
- Raza, K., Ismailjee, S.B., Crespo, M., Studer, S.M., Sanghavi, S., Paterson, D.L., Kwak, E.J., Rinaldo, C.R., Jr., Pilewski, J.M., McCurry, K.R. y Husain, S. (2007) Successful outcome of human metapneumovirus (hMPV) pneumonia in a lung transplant recipient treated with intravenous ribavirin. *J Heart Lung Transplant* 26(8), 862-4.
- Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C. y Harrison, S.C. (1995) The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2A resolution. *Nature* 375, 291-298.
- Roberts, S.R., Lichtenstein, D., Ball, L.A. y Wertz, G.W. (1994) The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J Virol* 68(7), 4538-46.
- Ruprecht, J. y Nield, J. (2001) Determining the structure of biological macromolecules by transmission electron microscopy, single particle analysis and 3D reconstruction. *Prog Biophys Mol Biol* 75(3), 121-64.
- Russell, C.J., Jardetzky, T.S. y Lamb, R.A. (2001) Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion. *Embo J* 20(15), 4024-34.
- Russell, C.J. y Luque, L.E. (2006) The structural basis of paramyxovirus invasion. *Trends Microbiol* 14(6), 243-6.
- Russell, R., Paterson, R.G. y Lamb, R.A. (1994) Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein. *Virology* 199(1), 160-8.
- Sachse, C., Chen, J.Z., Coureux, P.D., Stroupe, M.E., Fandrich, M. y Grigorieff, N. (2007) High-resolution electron microscopy of helical specimens: a fresh look at tobacco mosaic virus. *J Mol Biol* 371(3), 812-35.
- Samal, S.K. y Zamora, M. (1991) Nucleotide sequence analysis of a matrix and small hydrophobic protein dicistronic mRNA of bovine respiratory syncytial virus

- demonstrates extensive sequence divergence of the small hydrophobic protein from that of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 72 (Pt 7), 1715-20.
- Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. . (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 21-69 pp. . Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Scheltinga, S.A., Templeton, K.E., Beersma, M.F. y Claas, E.C. (2005) Diagnosis of human metapneumovirus and rhinovirus in patients with respiratory tract infections by an internally controlled multiplex real-time RNA PCR. *J Clin Virol* 33(4), 306-11.
- Schildgen, O., Glatzel, T., Geikowski, T., Scheibner, B., Matz, B., Bindl, L., Born, M., Viazov, S., Wilkesmann, A., Knopfle, G., Roggendorf, M. y Simon, A. (2005) Human metapneumovirus RNA in encephalitis patient. *Emerg Infect Dis* 11(3), 467-70.
- Schowalter, R.M., Smith, S.E. y Dutch, R.E. (2006) Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH. *J Virol* 80(22), 10931-41.
- Skehel, J.J. y Wiley, D.C. (1998) Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell* 95(7), 871-4.
- Skehel, J.J. y Wiley, D.C. (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69, 531-69.
- Skiadopoulos, M.H., Biacchesi, S., Buchholz, U.J., Amaro-Carambot, E., Surman, S.R., Collins, P.L. y Murphy, B.R. (2006) Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *Virology* 345(2), 492-501.
- Skiadopoulos, M.H., Biacchesi, S., Buchholz, U.J., Riggs, J.M., Surman, S.R., Amaro-Carambot, E., McAuliffe, J.M., Elkins, W.R., St Claire, M., Collins, P.L. y Murphy, B.R. (2004) The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. *J Virol* 78(13), 6927-37.
- Spider Web. http://www.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/spider.html
- Spriggs, M.K., Murphy, B.R., Prince, G.A., Olmsted, R.A. y Collins, P.L. (1987) Expression of the F and HN glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by recombinant vaccinia viruses: contributions of the individual proteins to host immunity. *J Virol* 61(11), 3416-23.
- Stockton, J., Stephenson, I., Fleming, D. y Zambon, M. (2002) Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 8(9), 897-901.
- Stott, E.J., Taylor, G., Ball, L.A., Anderson, K., Young, K.K., King, A.M. y Wertz, G.W. (1987) Immune and histopathological responses in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express individual genes of human respiratory syncytial virus. *J Virol* 61(12), 3855-61.
- Stowell, M.H., Miyazawa, A. y Unwin, N. (1998) Macromolecular structure determination by electron microscopy: new advances and recent results. *Curr Opin Struct Biol* 8(5), 595-600.
- Tang, R.S., Mahmood, K., Macphail, M., Guzzetta, J.M., Haller, A.A., Liu, H., Kaur, J., Lawlor, H.A., Stillman, E.A., Schickli, J.H., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D. y Spaete, R.R. (2005) A host-range restricted parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the human metapneumovirus (hMPV) fusion protein elicits protective immunity in African green monkeys. *Vaccine* 23(14), 1657-67.
- Tatusova, T.A., Madden, T.L. (1999) EXPASY Proteomics Server (Expert Protein Analysis System) , (<http://genopole.toulouse.inra.fr/blast/wblats2.html>).

- Teng, M.N. y Collins, P.L. (1998) Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J Virol* 72(7), 5707-16.
- Thuman-Commike, P.A. (2001) Single particle macromolecular structure determination via electron microscopy. *FEBS Lett* 505(2), 199-205.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9), 4350-4.
- Ulbrandt, N.D., Ji, H., Patel, N.K., Riggs, J.M., Brewah, Y.A., Ready, S., Donacki, N.E., Folliot, K., Barnes, A.S., Senthil, K., Wilson, S., Chen, M., Clarke, L., MacPhail, M., Li, J., Woods, R.M., Coelingh, K., Reed, J.L., McCarthy, M.P., Pfarr, D.S., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., Kiener, P.A. y Suzich, J.A. (2006) Isolation and characterization of monoclonal antibodies which neutralize human metapneumovirus in vitro and in vivo. *J Virol* 80(16), 7799-806.
- van den Hoogen, B.G., Bestebroer, T.M., Osterhaus, A.D. y Fouchier, R.A. (2002) Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology* 295(1), 119-32.
- van den Hoogen, B.G., de Jong, J.C., Groen, J., Kuiken, T., de Groot, R., Fouchier, R.A. y Osterhaus, A.D. (2001) A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 7(6), 719-24.
- van den Hoogen, B.G., Herfst, S., Sprong, L., Cane, P.A., Forleo-Neto, E., de Swart, R.L., Osterhaus, A.D. y Fouchier, R.A. (2004a) Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis* 10(4), 658-66.
- van den Hoogen, B.G., Osterhaus, D.M. y Fouchier, R.A. (2004b) Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 23(1 Suppl), S25-32.
- Viazov, S., Ratjen, F., Scheidhauer, R., Fiedler, M. y Roggendorf, M. (2003) High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J Clin Microbiol* 41(7), 3043-5.
- Walsh, E.E. y Hruska, J. (1983) Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J Virol* 47(1), 171-7.
- Weissenhorn, W., Carfi, A., Lee, K.H., Skehel, J.J. y Wiley, D.C. (1998) Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Mol Cell* 2(5), 605-16.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Calder, L.J., Harrison, S.C., Skehel, J.J. y Wiley, D.C. (1999) Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol Membr Biol* 16(1), 3-9.
- Wertz, G.W., Stott, E.J., Young, K.K., Anderson, K. y Ball, L.A. (1987) Expression of the fusion protein of human respiratory syncytial virus from recombinant vaccinia virus vectors and protection of vaccinated mice. *J Virol* 61(2), 293-301.
- Williams, J.V., Harris, P.A., Tollefson, S.J., Halburnt-Rush, L.L., Pingsterhaus, J.M., Edwards, K.M., Wright, P.F. y Crowe, J.E., Jr. (2004) Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 350(5), 443-50.
- Wrigley, N.G., Brown, E.B., Skehel, J.J. (1986) Electron microscopy of influenza virus. *Electron microscopy of proteins*, 103-163 pp, 5 *Viral Structure*. Academic Press, Londres.
- Wyde, P.R., Chetty, S.N., Jewell, A.M., Boivin, G. y Piedra, P.A. (2003) Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res* 60(1), 51-9.

- Wyde, P.R., Moylett, E.H., Chetty, S.N., Jewell, A., Bowlin, T.L. y Piedra, P.A. (2004) Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by NMSO3 in tissue culture assays. *Antiviral Res* 63(1), 51-9.
- Yin, H.S., Paterson, R.G., Wen, X., Lamb, R.A. y Jardetzky, T.S. (2005) Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(26), 9288-93.
- Yin, H.S., Wen, X., Paterson, R.G., Lamb, R.A. y Jardetzky, T.S. (2006) Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature* 439(7072), 38-44.
- Yu, Q., Davis, P.J., Li, J. y Cavanagh, D. (1992) Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus. *Virology* 186(2), 426-34.
- Yuan, P., Thompson, T.B., Wurzburg, B.A., Paterson, R.G., Lamb, R.A. y Jardetzky, T.S. (2005) Structural studies of the parainfluenza virus 5 hemagglutinin-neuraminidase tetramer in complex with its receptor, sialyllactose. *Structure* 13(5), 803-15.
- Zaitsev, V., von Itzstein, M., Groves, D., Kiefel, M., Takimoto, T., Portner, A. y Taylor, G. (2004) Second sialic acid binding site in Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase: implications for fusion. *J Virol* 78(7), 3733-41.
- Zhao, X., Singh, M., Malashkevich, V.N. y Kim, P.S. (2000) Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26), 14172-7.
- Zhou, Z.H., Hardt, S., Wang, B., Sherman, M.B., Jakana, J. y Chiu, W. (1996) CTF determination of images of ice-embedded single particles using a graphics interface. *J Struct Biol* 116(1), 216-22.
- Zimmer, G., Budz, L. y Herrler, G. (2001) Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *J Biol Chem* 276(34), 31642-50.

VIII. ANEXO