

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**CARACTERÍSTICAS Y LOCALIZACIÓN DE LA REGIÓN
DE FUSIÓN DEL RABDOVIRUS DE LA SEPTICEMIA
HEMORRÁGICA DE LA TRUCHA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Isabel Rocha Roso

Bajo la dirección de los doctores

Julio Coll Morales

María Amparo Estepa Pérez

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2476-0

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR1.

**CARACTERÍSTICAS Y LOCALIZACION DE LA
REGION DE FUSIÓN DEL RABDOVIRUS DE LA
SEPTICEMIA HEMORRÁGICA DE LA TRUCHA**

VºBº Tutor

VºBº Director y Codirector de tesis

MEMORIA PRESENTADA POR ANA ISABEL ROCHA ROSO PARA OPTAR AL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS POR LA UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA), bajo la dirección del **Dr. Julio Coll Morales** y de la **Dra. M^o Amparo Estepa Pérez**, y financiado por los proyectos SC0046, RTA03-217, CPE03-016C4 y el proyecto europeo CT984398

<u>ABREVIATURAS</u>	5
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	
1.1. LAS RABDOVIROSIS EN LA ACUICULTURA	7
1.2. LOS RABDOVIRUS DE PECES	10
1.2.1. Los rabdovirus más importantes: VSHV e VNHI.....	10
1.2.2. Estructura molecular.....	11
1.3. ESTRUCTURA DE LA GLICOPROTEÍNA	13
1.3.1. Función general y estructura.....	13
1.3.2. Heptadas hidrófobas repetidas.....	13
1.3.3. Puentes disulfuro.....	14
1.4. INTERACCIÓN DE RABDOVIRUS Y CÉLULAS	16
1.4.1. Importancia del estudio de las fases tempranas de la infección...	16
1.4.2. Receptores celulares.....	17
1.4.3. Mutantes resistentes a la neutralización con AcM (MAR).....	18
1.5. FUSION ENTRE LAS MEMBRANAS RABDOVIRALES Y CELULARES	19
1.5.1. Dependencia de la fusión con la disminución de pH.....	19
1.5.2. Cambios conformacionales inducidos en la proteína G por la disminución de pH.....	19
1.5.3. Interacciones con fosfolípidos.....	20
1.5.4. Mutantes MAR relacionados con fusión.....	21
1.5.5. Mutantes deficientes en la fusión.....	21
1.5.6. Péptidos inhibidores de la fusión.....	21
1.5.7. Ensayos de fusión en rabdovirus.....	23
1.6. ANALISIS COMPARATIVO DE MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN	24
1.6.1. La transfección de células eucariotas.....	24
1.6.2. Ruta del ADN foráneo dentro de la célula.....	26
1.6.3. Utilización de liposomas catiónicos para transfección de ADN..	26
1.6.4. Modificaciones en el ADN para aumentar la eficiencia de transfección.....	26
1.6.5. Ultrasonidos para translocar la membrana plasmática.....	27
1.6.6. Electroporación para translocar la membrana plasmática.....	28
1.6.7. Bombardeo para translocar la membrana plasmática.....	29

1.6.8. Control de pH en la ruta endosoma/lisosoma.....	29
1.6.9. Adición de calcio.....	30
1.6.10. Influencia de la mitosis: ausencia de membrana nuclear.....	31
1.6.11. Señales de localización nuclear (NLS) en péptidos y en ADN....	31
1.6.12. Péptidos quiméricos.....	32
1.6.13. Resumen de métodos para aumentar la eficiencia de la transfección.....	34
2. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA.....	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. CULTIVOS CELULARES.....	38
3.1.1. Línea celular EPC.....	38
3.1.2. Transfección de células EPC.....	38
3.1.3. Detección de la expresión de GFP.....	39
3.1.4. Detección de la expresión de β galactosidasa (β gal).....	39
3.1.5. Tinción histológica de β gal.....	40
3.1.6. Ensayos de luciferasa.....	40
3.1.7. Ensayos de fusión basados en transferencia de energía de fluorescencia.....	40
3.1.8. Ensayos de fusión basados en la activación de la transcripción por T7.....	40
3.1.9. Ensayos de formación de sincitios.....	41
3.2. INMUNOENSAYOS.....	42
3.2.1. Enzimoimmunoensayos (ELISA).....	42
3.2.2. Inmunotransferencias.....	43
3.2.3. Microensayos de neutralización de VSHV	44
3.2.4. Ensayos por citometría de flujo (FACS)	45
3.2.5. Obtención de anticuerpos policlonales (AcP) en ascitis de ratón.	45
3.2.6. Obtención de anticuerpos policlonales (AcP) en trucha.....	46
3.3. BIOLOGÍA MOLECULAR.....	47
3.3.1. Virus de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV).....	47
3.3.2. Plásmidos utilizados.....	48
3.3.3. Mutagenesis dirigida en la construcción pGEMTeasy-G.....	50

3.3.4. Subclonajes del plásmido pGEMTeasy-G al pMCV1.4.....	50
3.3.5. Expresión del frg#11 recombinante.....	52
3.3.6. Purificación de plásmidos.....	53
3.3.7. Análisis de secuencias de la proteína G de rabdovirus.....	54
3.3.8. Síntesis de péptidos y pepsan.....	54
3.3.9. Ensayo de ligamiento de fosfolípidos en fase sólida.....	55
4. RESULTADOS	
4.1. ESTUDIOS COMPARATIVOS DE SECUENCIAS.....	56
4.1.1. Comparación de las regiones de la proteína G implicadas en fusión de distintos rabdovirus.....	56
4.1.2. Perfiles de hidrofiliidad/hidrofobicidad.....	60
4.1.3. Comparación entre cepas de VSHV.....	62
4.1.4. Selección de segmentos en la región 56-144 de la proteína G para su estudio.....	63
4.1.5. Selección de mutantes para su estudio.....	64
4.2. PROPIEDADES DE LA REGIÓN 56-144.....	67
4.2.1. Interacción de péptidos de un pepsan de la proteína G con fosfolípidos marcados.....	67
4.2.2. Inducción de sincitios por frg#11.....	68
4.2.3. Conformaciones del frg#11 dependientes de pH.....	70
4.2.4. Inhibición de la fusión inducida por pH ácido entre células transfectadas con la proteína G con anticuerpos anti-pG y anti-péptidos sintéticos localizados en su dominio de unión a fosfolípidos	70
4.2.5. Respuestas inmunológicas de las truchas al dominio del frg#11.	71
4.3 PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO DE FUSIÓN EN CÉLULAS EPC.	74
4.3.1. Agentes de transfección y concentración óptima de plásmido....	74
4.3.2. Transfección a varias concentraciones celulares y tiempos.....	76
4.3.3. Influencia de la mitosis en la transfección.....	78
4.3.4. Influencia de la adición de agentes lisosomotrópicos.....	79
4.3.5. Uso de promotores de CMV de varias longitudes.....	79
4.3.6. Transfección con diferentes promotores y tratamientos celulares	81
4.3.7. Expresión de proteína G en las membranas de las células transfectadas.....	82

4.3.8. Puesta apunto de ensayos de fusión.....	83
4.3.9. Formación de sincitios.....	85
4.3.10. Inhibición de los sincitios con anticuerpos anti-VSHV.....	87
4.4. ANALISIS DE MUTANTES.....	89
4.4.1. Péptidos mutantes en la secuencia del p2.....	89
4.4.2. Mutantes de la proteína G de VSHV obtenidos y utilizados.....	91
4.4.3. Expresión en EPC de los mutantes de la proteína G.....	93
4.4.4. Dependencia de pH en la fusión de mutantes proteína G.....	95
<u>5. DISCUSIÓN</u>	
5.1. PUESTA A PUNTO DE UN ENSAYO DE FUSIÓN.....	97
5.1.1. Selección de células, agente transfectante y variables de transfección.....	97
5.1.2. Mejora de las eficiencias de transfección.....	98
5.1.3. Eficiencia de distintos promotores.....	99
5.1.4. Optimización del ensayo de formación de sincitios.....	100
5,1,5 Aplicación a la detección de anticuerpos anti-VSHV en ausencia de VSHV.....	101
5.2. SELECCIÓN DE LOS SEGMENTOS Y MUTANTES	102
5.3. PROPIEDADES DE LOS SEGMENTOS SELECCIONADOS.....	104
5.3.1 Evidencias anteriores de las relaciones de los segmentos con la fusión.....	104
5.3.2 Participación del frg#11/p2 en la fusión del VSHV.....	105
5.3.3 Respuesta inmunológica de la trucha al frg#11.....	107
5.4. ANÁLISIS DE LOS MUTANTES.....	109
5.5. MODELO PROPUESTO.....	111
<u>6. CONCLUSIONES</u>.....	116
<u>7. BIBLIOGRAFÍA</u>.....	117
<u>8. TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS</u>.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS

ε	Épsilon, factor de conversión en cantidad de proteína
βgal	βgalactosidasa
Å	Amstrong
aa	amino ácido
Ac	Anticuerpo
AchR	Receptor de la Acetilcolina
AcM	Anticuerpo monoclonal
AcP	Anticuerpo policlonal
cADN	Ácido desoxirribonucleico copia
CHSE	<i>Chinook salmo embryo</i> (línea celular)
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
CpG	Secuencias de ADN con varias repeticiones de Citosina Guanina
cps	Cuentas por segundo
DICT ₅₀	Dosis infectiva en cultivo de tejidos que infecta la mitad de los cultivos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DOTAP	1,2,dioleoyl-3-4-trimethyl ammonio propano
EDTA	Etilen diamino tetra-Acético
ELISA	Ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas
EPC	<i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (línea celular)
EVEX	Virus X de la anguila
FHM	<i>Fathead minnow</i> (línea celular)
frg#11	Fragmento #11 de la proteína G de VSHV
g	Fuerza centrífuga
pG	Proteína G de VSHV
G4	Proteína recombinante, parte de la G, producida en levaduras
GFP	Proteína verde fluorescente
h	Hora
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
Ig	Inmunoglobulina
IgM	Inmunoglobulina M
IL	Interleucina
Kpb	Kilo pares de bases
kDa	Kilodalton
m.o.i.	Multiplicidad de infección viral
MAR	Mutantes de escape a la neutralización con anticuerpos monoclonales

min	Minuto
NHI	Necrosis hematopoyética infecciosa
nt	Nucleótido
O.D.	Densidad óptica
O.I.E.	Organización Internacional de Epizootías
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFR	Rabdovirus de la tenca
poc	Pocillo
PRSV	Rabdovirus del langostino
PVP	Polivinil pirrolidona
ARN	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RTG-2	<i>Rainbow trout gonad</i> (línea celular)
s	Segundo
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SFB	Suero fetal bovino
<i>Sp.</i>	Especies
TAE	Tampón Tris Acético EDTA
U	Unidad de actividad enzimática
UFP	Unidades formadoras de placa
VNHI	Virus de la necrosis hematopoyética infecciosa
VNPI	Virus de la necrosis pancreática infecciosa
VR	Virus de la rabia
VSHV	Virus de la septicemia hemorrágica vírica
VSV	Virus de la estomatitis vesicular del cerdo
VVPC	Virus de la viremia primaveral de la carpa

1.1. LAS RABDOVIROSIS EN LA ACUICULTURA

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta la piscicultura intensiva, como por ejemplo, en el cultivo de trucha en Europa y EE.UU, de salmón del Pacífico en EE.UU, de salmón del Atlántico en Noruega, de carpa en Europa central, o de anguilas en Japón, son las patologías infecciosas. Entre estas patologías cabe destacar las de origen vírico. De todas ellas, las provocadas por rhabdovirus, (Leong et al., 1995) birnavirus (McAllister et al., 1991) son las más frecuentes. Los rhabdovirus tienen mayor incidencia económica que los birnavirus porque causan elevada mortalidad en adultos. Se han descrito más de 20 tipos de rhabdovirus de peces (Frerichs, 1989) (Tabla 1).

Para estas enfermedades víricas actualmente no existen vacunas (Boudinot, Boubekour, y Benmansour, 2001; DeKinkelin et al., 1995; Fernandez-Alonso, Rocha, y Coll, 2001; LaPatra et al., 2001; Leong et al., 1995; Lorenzen et al., 2000; Lorenzen et al., 2002a; Lorenzen et al., 2002b), ni métodos terapéuticos eficaces y además no es posible la detección de portadores asintomáticos (Leong y Fryer, 1993). A pesar de los esfuerzos por desarrollar vacunas ADN (Boudinot, Boubekour, y Benmansour, 2001; Fernandez-Alonso, Rocha, y Coll, 2001; LaPatra et al., 2001; Lorenzen et al., 2000; Lorenzen et al., 2002a; Lorenzen et al., 2002b) o métodos terapéuticos que impidan la entrada del virus, todavía no se han conseguido resultados positivos.

En 1991 en Estados Unidos, el 52% de la producción (30,8 millones de dólares) se perdió como resultado de enfermedades, la mayoría de origen vírico (Leong et al., 1995) y en Europa se calculan pérdidas de 50 millones de euros anuales por septicemia hemorrágica vírica (SHV) (Olesen y Korsholm, 1997) y otras patologías similares como la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI). En Japón las pérdidas económicas producidas por rhabdovirus alcanzan el mismo orden de magnitud.

Tabla 1.
Cepas y aislados de rhabdovirus de peces.

Virus	Origen	Tamaño ^a (nm)	Temp ^b (°C)	Línea celular ^c
VSHV				
Virus de la Septicemia Hemorrágica Vírica	Trucha Arco iris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	198x68	6-18	R,F,E,C
VNHI				
Virus de la Necrosis Hematopoyética Infecciosa	Salmón Sockeye <i>Oncorhynchus nerka</i>	156x82	13-18	R,F,E,C
VVPC				
Virus de la Viremia Primavera de la Carpa	Carpa común <i>Cyprinus carpio</i>	140x77	4-32	R,F,E,C
PFRV				
Rhabdovirus de la Tenca	Tenca <i>Exos lucius</i>	125x80	21-28	R,F,E
EVA				
Virus A de la Anguila	Anguila americana <i>Anguilla rostrata</i>	134x79	0-29	R,F,E,B
EVEX				
Virus X de la Anguila Europea	Anguila europea <i>Anguilla anguilla</i>	134x79	10-29	R,F,E,B
CUSR				
Rhabdovirus del Síndrome Ulcus del Bacalao	Bacalao Atlántico <i>Gadus morhua</i>	155x65	14-16	(R,F,B)
RGPR				
Rhabdovirus de la Perca Río Grande	Perca Río Grande <i>Cichlasoma cyanogutatum</i>	-	23-33	R,F,B
EVB				
Virus B ₁₂ de la anguila	Anguila europea <i>Anguilla anguilla</i>	185x75	10-20	E (R)
RS				
Rhabdovirus del Salmón	Trucha Arco iris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	135x65	18-20	R,F,E
PR				
Rhabdovirus de la Perca	Perca <i>Perca fluviatilis</i>	200x100	13-15	R (E)
HRV				
Rhabdovirus de la Platija (<i>R. olivaceus</i>)	Platija Japonesa <i>Paralichthys olivaceus</i>	190x80	5-20	R,F,E,B (C)
UDRV				
Rhabdovirus de la Enfermedad Ulcerativa	<i>Striped snakehead</i> <i>Ophicephalus striatus</i>	120x80	25-30	B (C,E)

^a, Los tamaños se dan como medias de varios autores según datos recopilados por Frerichs (Frerichs, 1989).

^b, Rango de temperaturas de replicación e infección viral.

^c, Líneas celulares susceptibles (sin paréntesis) y refractarias (con paréntesis). R=RTG-2, E=EPC, F=FHM, C=CHSE, B=BF2.

En la UE existen unas 1.700 piscifactorías dedicadas al cultivo de salmónidos con una producción total superior a las 200.000 Tm/año. Sólo en Francia la SHV causa un 30-50% de pérdidas anuales en tonelaje en las áreas infectadas, por lo que la amenaza de los rhabdovirus sobre la producción europea es tal que la UE puso en marcha un programa de erradicación (Doc. 90/495/EF) (Hattenberg-Baudoy et al., 1995), cuyo resultado se muestra en la Figura 1 (Olesen, Ariel, y Slierendrecht, 1998).

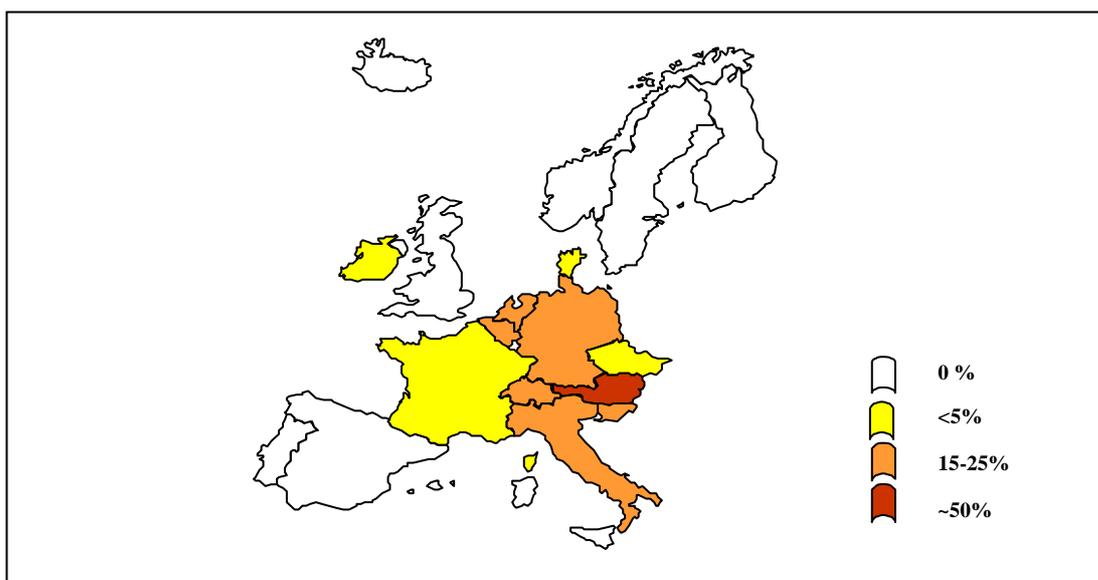


Figura 1. Grado de infección por rhabdovirus de los Estados Europeos participantes en el informe de situación de las enfermedades víricas en Europa de 1998 (Coll, 1999b; Olesen, Ariel, y Slierendrecht, 1998). Se han clasificado los países según el porcentaje de granjas positivas para rhabdovirus (VSHV + VNHI + SVCV + EVX) en cuatro colores: blanco (0%), amarillo (<5%), naranja (15-25%) y rojo (~50%).

El mercado potencial de una posible vacuna y/o método terapéutico para la enfermedad producida por el VSHV en Europa está estimado en unos 5 millones de €/año (se supone que serían necesarias $\sim 7 \times 10^8$ dosis, con un coste unitario de 7 €). Una repercusión similar tendría una posible vacuna y/o método terapéutico frente a la enfermedad producida por el VNHI.

La producción actual anual de la Acuicultura en España está concentrada fundamentalmente entre la piscicultura de la trucha (20.000 Tm/año) y el cultivo del mejillón (200.000 Tm/año) (Coll, 1988). El resto de la producción se reparte entre la Acuicultura marina: cultivo de peces (lubina, dorada, rodaballo y salmón), otros moluscos (ostra) y crustáceos (langostino) y la repoblación de ríos y lagos con especies como la tenca, la carpa o el cangrejo de río (Coll, 2001). El potencial futuro de la producción de la Acuicultura en España se estima en unas 865.000 Tm/año. En España

la producción anual de salmónidos supone aproximadamente 100 millones de truchas y una importación anual de 200-400 millones de huevos que entran en España procedentes de otros países sin apenas controles sanitarios. Este hecho supone una grave amenaza, ya que en nuestro país no se han detectado brotes de rabdovirus en los últimos 10 años.

1.2 LOS RABDOVIRUS DE PECES.

1.2.1. Los rabdovirus más importantes: VSHV e VNHI. El VSHV y el VNHI pertenecen al género *Novirhabdovirus* (caracterizado por la presencia de la proteína no estructural Nv), dentro de la familia *Rabdoviridae*, compuesta por virus con ARN monocatenario no segmentado y de polaridad negativa (Biacchesi et al., 2000a; Walker y Kongsuwan, 1999). La familia *Rabdoviridae* comprende cinco géneros, según el rango del hospedador, la presencia de genes suplementarios y el lugar de replicación del virus dentro de la célula. Están más ampliamente distribuidos en la naturaleza que otras familias (infectan tanto vertebrados como invertebrados y plantas).

El virus VSHV es endémico en Europa y afecta a varias especies cultivables tales como la trucha, el salmón coho, el salmón chinook, el rodaballo y la anguila y a otras con potencial de cultivo como el bacalao y el arenque (Schlotfeldt et al., 1991). Experimentalmente, se han demostrado infecciones en lubina y rodaballo (Brañas, Coll, y Estepa, 1994) y se ha aislado en cultivos de rodaballo (Schlotfeldt et al., 1991), anguila, lenguado y langostino (Liu, Hilleman, y Kurth, 1995). Aunque es endémico en Europa, en la década de los 80 se detectaron brotes de VSHV en Norteamérica, concretamente en salmón, bacalao y arenque (Brunson, True, y Yancey, 1989; Hopper, 1989; King et al., 2001; Snow y Smail, 1999; Winton et al., 1991). Uno de los últimos brotes de VSHV se detectó en el 2001 en Japón, en poblaciones acuicultivadas de platija japonesa (Isshiki et al., 2001). Con este brote ya son tres los lugares afectados: Europa, Norte América y Japón.

Se han podido definir varios serotipos de referencia (F1, F2 y 23.75) de VSHV por seroneutralización con anticuerpos policlonales (AcP) (DeKinkelin et al., 1977; Hattenberg-Baudoy et al., 1995; Olesen, Lorenzen, y Jorgensen, 1993; Vestergaard-Jorgensen, 1972).

En España se aislaron y estudiaron cinco brotes de VSHV F1 (Basurco y Coll, 1989; Basurco y Coll, 1992).

1.2.2. Estructura molecular. La partícula viral tiene un tamaño de aproximadamente 170x80 nm (Figura 2). Se compone de una nucleocápsida interna con simetría helicoidal que encierra una molécula de ARN monocatenario de polaridad negativa y una envuelta exterior formada por una membrana lipídica procedente de la célula huésped. En su conjunto la partícula viral posee una morfología en forma de bala compuesta por 5 proteínas, L, pG, N, M1 y M2. La proteína L (190 kDa), asociada al ARN vírico, es una ARN polimerasa ARN dependiente y tiene actividad transcriptasa y replicasa. La proteína G (pG, 65 kDa) es una glicoproteína que forma las espículas triméricas de la membrana del virus y es responsable de la unión del virus a su receptor y la única capaz de inducir la producción de anticuerpos (Ac) neutralizantes en el huésped. La nucleoproteína N (40 kDa) forma la nucleocápsida y es la proteína mayoritaria del virus. En VSHV se ha descrito además una proteína NZ relacionada antigénicamente con la proteína N, cuya función se desconoce (Basurco et al., 1991).

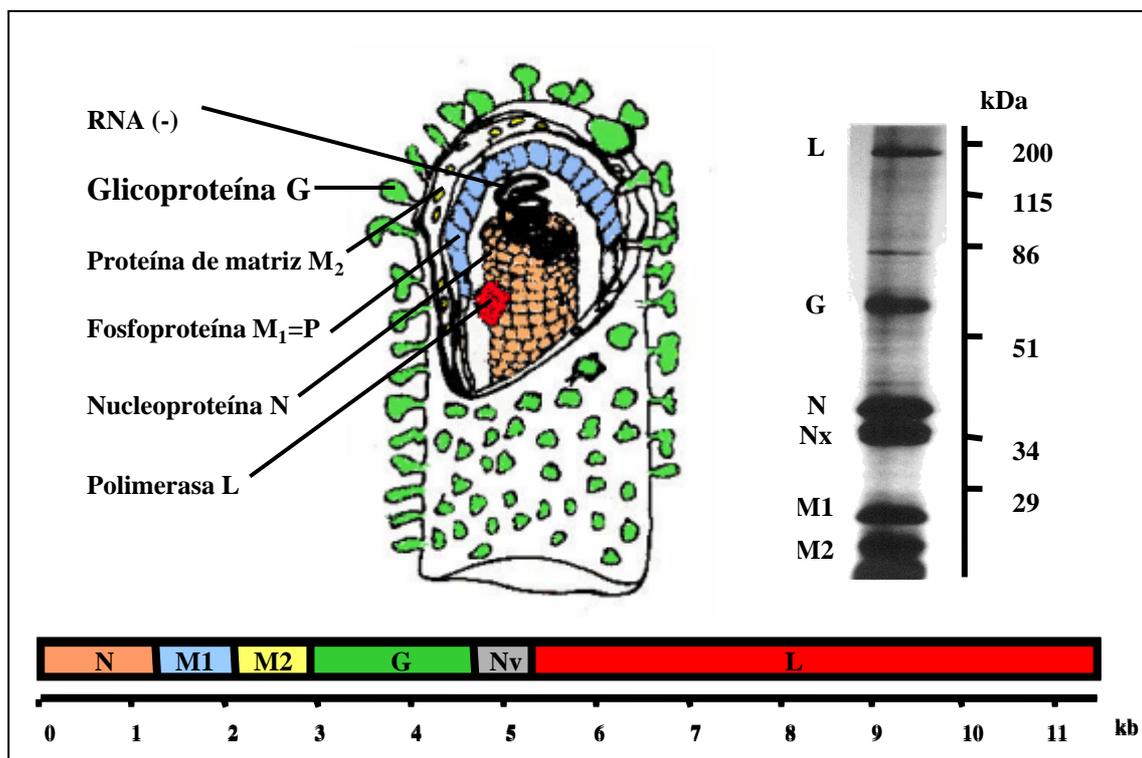


Figura 2. Estructura y genoma de VSHV. Izquierda, esquema de la morfología de VSHV. Derecha, perfil de proteínas de VSHV en gel de poliacrilamida, con sus pesos moleculares en KDa. Nz, variante génica de N (Basurco y Coll, 1991). Abajo, disposición de los genes en el ARN viral y tamaño aproximado. N_v, proteína no estructural.

La fosfoproteína M1 o P (19 kDa) está asociada a la polimerasa L. La proteína M2 o M (25 kDa) puede estar situada o alrededor de la membrana lipídica o en el interior de la nucleocápsida (Barge et al., 1993). En VSHV e VNHI existe además una proteína no estructural Nv (12 kDa) no descrita en otros rabdovirus (Basurco et al., 1995; Basurco, Yun, y Hedrick, 1993; Kurath, Higman, y Bjorklund, 1995) y que da nombre al género *Novirhabdovirus*.

Como ya se ha mencionado antes, el genoma está constituido por una molécula de ARN monocatenario de polaridad negativa, que en el caso del VSHV tiene aproximadamente 11.000 bases (Hill et al., 1975) y un peso molecular de $5-6,4 \times 10^6$ KDa (Enzmann, Maier, y Bigott, 1981). El orden de los genes en el ARN es 3' N-M₁-M₂-G-NV-L 5'. Se ha secuenciado el genoma completo tanto del VSHV (Heike, Egbert, y Mettenleiter, 1999; Nishizawa et al., 2002) como del VNHI (Jorgensen et al., 1995; Morzunov, Winton, y Nichol, 1995; Nichol, Rowe, y Winton, 1995; Oshima et al., 1995; Schuetze et al., 1995) y partes importantes del VVPC y del HRV (Bjorklund, Higman, y Kurath, 1996). Además ya se han publicado varios estudios comparativos de secuencias (Kurath, Higman, y Bjorklund, 1995; Morzunov, Winton, y Nichol, 1995; Nichol, Rowe, y Winton, 1995) y se han obtenido recientemente virus infectivos de VNHI a partir de cADN mediante tecnologías de genética reversa, lo que permite su manipulación genética e introducción de mutantes (Biacchesi et al., 2002; Biacchesi et al., 2000a; Biacchesi et al., 2000b; Estepa et al., 1999).

La infección de un rabdovirus comienza por la unión de la glicoproteína G de la envuelta del virus a receptores específicos en la membrana plasmática de la célula huésped que induce un proceso de endocitosis. A continuación tiene lugar la fusión de la membrana viral y la del endosoma que es dependiente de pH. Tras la fusión, la nucleocápsida libera el ARN en el citoplasma celular (Coll, 1999a). La replicación tiene lugar en el citoplasma de las células infectadas y los viriones maduran y brotan por gemación de la superficie celular llegando a lisar la célula.

1.3 ESTRUCTURA DE LA PROTEINA G

1.3.1. Función general y estructura. Como término medio una partícula de rabdovirus contiene unos 450 trímeros de pG (Gaudin et al., 1999a), cada uno de los cuales forma una espícula que sobresale 84 Å (Gaudin et al., 1993; Gaudin et al., 1992) del virión. La proteína G (pG) inicia el reconocimiento del rabdovirus a su receptor(es) celular(es) (Wunner, Reagan, y Koprowski, 1984) y contiene las propiedades de fusión del virus detectables a $\text{pH} < 6$ en el virus de la estomatitis vesicular, VSV (Konieczko, Whitaker-Dowling, y Widnell, 1994; Whitt et al., 1991; Whitt et al., 1990), en el virus de la rabia, VR (Gaudin et al., 1993) y en el virus VSHV (Estepa y Coll, 1996a; Lecocq-Xhonneux et al., 1994). La pG es la diana de los anticuerpos neutralizantes inducidos en el huésped en VSV (Kelley, Emersom, y Wagner, 1972), VSHV (Cupit et al., 2001; Lorenzen, Olesen, y Vestergaard-Jorgensen, 1990), el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, VNHI (Engelking y Leong, 1989) y el VR (Benmansour et al., 1991; Dietzschold et al., 1987).

La secuencia de la pG de los rabdovirus de mamíferos y peces está formada por aproximadamente 500 amino ácidos (aa). Contiene 2-6 sitios de glicosilación, 6-8 puentes disulfuro altamente conservados (Einer-Jensen et al., 1998; Walker y Kongsuwan, 1999), una región que contiene 2-3 heptadas hidrófobas repetidas (Coll, 1995b), una región transmembranal carboxi-terminal, un dominio citoplasmático carboxi-terminal y un péptido señal (Coll, 1995a).

Un alineamiento reciente que incluye las secuencias de pG de varios rabdovirus, VSV, VR, VSHV, hirame rabdovirus (HRV), VNHI y el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) ha puesto de manifiesto que existe tan solo un 18-26% de homología de secuencia y una identidad de únicamente del 5% (Einer-Jensen et al., 1998). La pG del Sonchus Yellow Net Virus y del Rice Transitory Yellowing Virus, 2 de los rabdovirus de plantas más estudiados (números de acceso de secuencias en GenBank L32603 y ABO11257), tampoco poseen mucha homología de secuencias con los rabdovirus animales. Mientras que todavía se espera la resolución de la estructura de la pG de rabdovirus por cristalografía de rayos X, los continuos avances en la estructura de la pG son relevantes a la hora de estudiar las etapas tempranas de la infección rabdoviral.

1.3.2. Héptadas hidrófobas repetidas. Muchos virus con envuelta tienen heptadas hidrófobas repetidas en sus pG. Dichas heptadas están relacionadas con la fusión (Skehel y Wiley, 1998) y forman hélices superenrolladas, tal y como se

demuestra por cristalografía de rayos X su estructura. Las heptadas encontradas en estas estructuras tienen 3-4 secuencias contiguas de 7 aa (**abcdefg**) en las cuales los aa situados en cada posición de la heptada se pueden determinar por una matriz de probabilidades según los criterios establecidos por Lupas (Lupas, Van Dyke, y Stock, 1991). Los aa que se encuentran con más frecuencia en las posiciones a-d son F, Y, I, L, V, M, o A (Lupas, Van Dyke, y Stock, 1991). Sin embargo, las heptadas definidas por Lupas no están presentes en las pG de los rabdovirus. Sólo después de considerar en a-d todos los aa hidrófobos (los arriba mencionados y además W, H, T) (Schulz y Schimer, 1984), se pueden encontrar heptadas hidrófobas repetidas en la pG de los rabdovirus de mamíferos (VSV y VR), de peces (VSHV, VNHI, SVCV) y de plantas (Coll, 1995b).

Estas heptadas difieren de las publicadas por Lupas (Lupas, Van Dyke, y Stock, 1991) no solo por la inclusión de todos los aa hidrófobos en los sitios a-d, sino también porque no se han impuesto restricciones al resto de las posiciones de aa. Las secuencias de las heptadas tienen muy poca variabilidad entre los miembros de cada género de rabdovirus pero no tienen ninguna similitud de secuencias entre los diferentes géneros. Se desconoce si estas heptadas se estructuran en la pG nativa como alfa hélices, hélices superenrolladas u otra estructura. La presencia de numerosos residuos de prolina que rompen las alfa hélices, entre las secuencias de las heptadas repetidas de rabdovirus, es un factor para suponer que estas no se encuentren formando alfa hélices. Sus estructuras permanecerán desconocidas hasta que no se diluciden por cristalografía de rayos X.

1.3.3. Puentes disulfuro. La pG de los rabdovirus posee 12-16 cisteínas (C) dependiendo de los géneros (Coll, 1995a), pero a pesar de las diferencias de secuencias entre géneros, las posiciones relativas de la mayoría de las cisteínas están conservadas.

Sólo existe un trabajo en el que se ha dilucidado la estructura de los puentes disulfuro de la pG de rabdovirus y es precisamente el del VSHV (Einer-Jensen et al., 1998). Para la pG de VSHV se han asignado los 6 puentes disulfuro a sus 12 cisteínas; 2 puentes disulfuro forman bucles entre aa situados a gran distancia en la secuencia de pG (C29-C339 y C44-C295). Entre los dos doblan la estructura de la pG poniendo juntas la región amino-terminal y la central (Figura 3 y 4). Otros dos puentes disulfuro forman bucles pequeños situados dentro de los bucles mayores. El bucle C90-C132 contiene la región donde se sitúan algunos mutantes resistentes al anticuerpo monoclonal (AcM) neutralizante C10 (Bearzotti et al., 1995) y el bucle C195-C265 contiene la región donde se localiza el anticuerpo monoclonal neutralizante 3F1A12 (Cupit et al., 2001; Lorenzen et

al., 1998a). Los otros dos puentes disulfuro (C172-C177 y C231-C236) son muy estables debido a que unen dos cisteínas localizadas muy cerca una de la otra en la estructura de la pG.

La existencia de al menos un gran bucle formado por un puente disulfuro se ha propuesto para la pG de VSV (Grigera, Keil, y Wagner, 1992). Además para la pG de VR, se han propuesto 3 puentes disulfuro (Dietzschold et al., 1982), corroborando la estructura propuesta para VSHV (Figura 4). También el alineamiento de la secuencia de pG de VSHV con las de otros rabdovirus (incluyendo VR, VSV y VNHI) (Einer-Jensen et al., 1998), indican una estructura de puentes disulfuro común (Figuras 3 y 4).

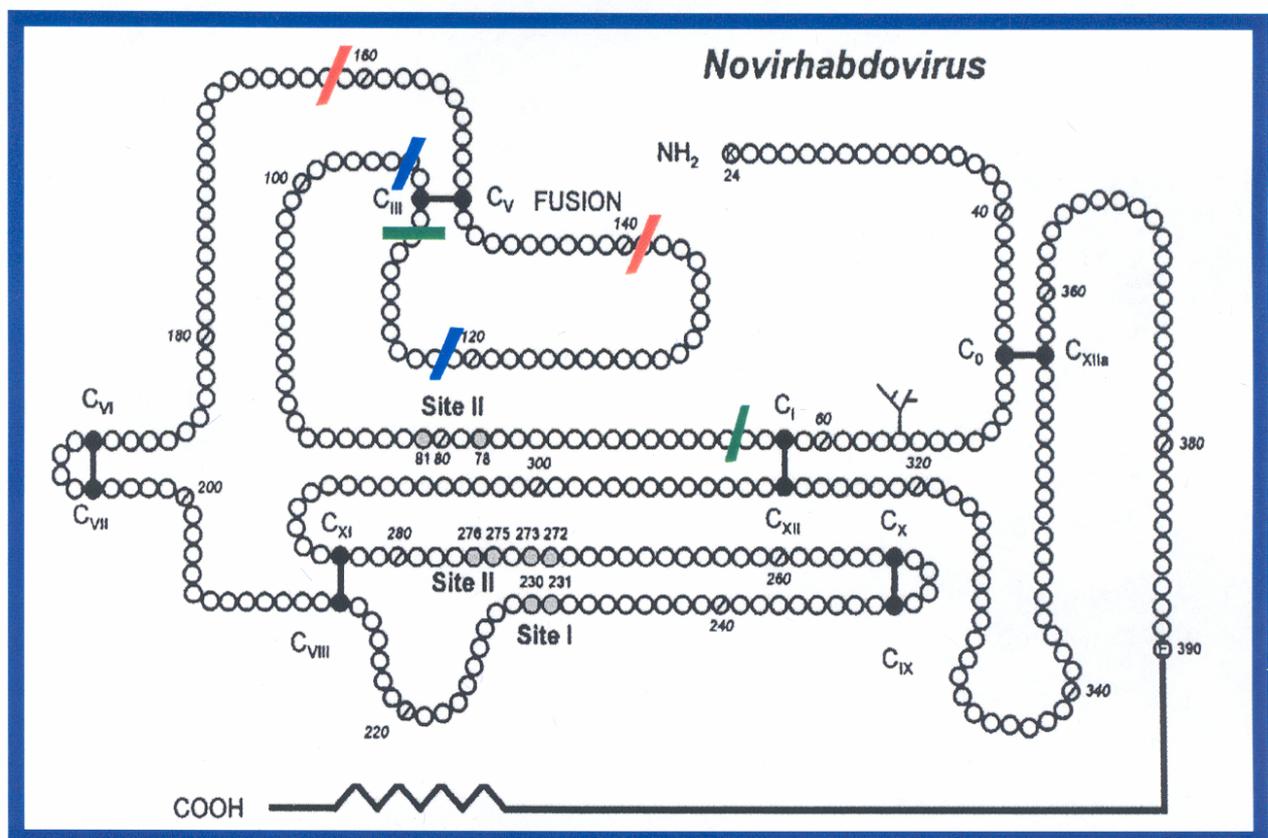


Figura 3. Esquema de la estructura tridimensional de la pG de rabdovirus propuesta por Walker (Walker y Kongsuwan, 1999). Del estudio de mutantes deficientes en fusión se ha localizado la región entre los aa 140 a 160 del VSV como directamente implicados en la fusión (Shokralla et al., 1998; Zhang y Ghosh, 1994). Se ha comprobado que esta región aparece en todos los rabdovirus incluidos los rabdovirus de peces o Novirhabdovirus (Walker y Kongsuwan, 1999). Aquí se esquematiza entre las líneas rojas. El análisis de la dependencia de pH en los mutantes resistentes a neutralización de VSHV indica que en este rabdovirus la región de fusión está constituida por al menos dos dominios (110-118 y 144-154) unidos por un puente disulfuro entre las cisteínas 110 y 152 (líneas azules) (Gaudin, DeKinkelin, y Benmansour, 1999). Entre las líneas verdes se ha esquematizado la posición aproximada del frg#11 según se ha definido en este trabajo.

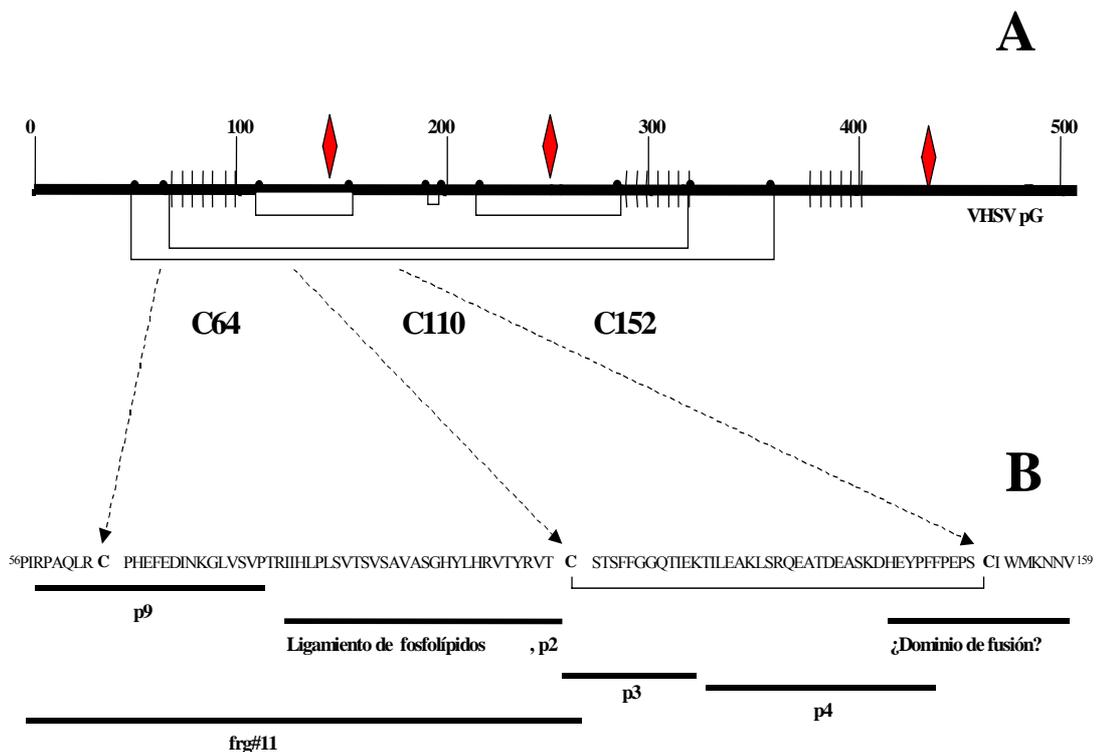


Figura 4. Localización de puentes disulfuro, heptadas hidrófobas repetidas, posiciones mutadas en los mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales neutralizantes y localización de p9, p2, p3, p4 y frg#11 en la pG de VSHV. A □, secuencia de la pG de VSHV; ●, Cisteínas conectadas por líneas horizontales que esquematizan los puentes disulfuro (Einer-Jensen et al., 1998). Las cisteínas alrededor del dominio de ligamiento a fosfolípidos son C64, C110 y C152; la C110 está ligada a la C152 (línea horizontal). ||||, heptadas repetidas hidrófobas de acuerdo con Coll (Coll, 1995b). ▲, mutantes resistentes al AcM neutralizante C10 que se localizan en las posiciones 140 y 433 y mutantes resistentes al AcM 3F1A12 que se localizan en la posición 253 (Cupit et al., 2001). **B** p9, secuencia y localización de p9 (aa 58-80); p2, dominio principal de ligamiento de fosfolípidos (aa 82-109); p3, secuencia conservada en los rabdovirus de peces de aguas frías (aa 110-122); p4, bucle altamente hidrófilo (aa 123-144); frg#11, heptadas hidrófobas repetidas (aa 56-110) y péptido hipotético de fusión (aa 142-159) (Walker y Kongsuwan, 1999).

1.4 INTERACCIÓN DE RABDOVIRUS Y CÉLULAS

1.4.1. Importancia del estudio de las fases tempranas de la infección. La

importancia del estudio de las fases tempranas de la infección de VSHV se basa en las posibilidades que ofrece de desarrollo de agentes terapéuticos y/o de vacunas. El conocimiento del mecanismo de procesos tales como la fusión, permitiría desarrollar componentes con actividad antiviral que podrían ser utilizados para interferir en el proceso, es decir, que se pudieran usar como agentes terapéuticos capaces de atajar la enfermedad durante el curso de las infecciones. Por otra parte, el mayor conocimiento de las secuencias del VSHV implicadas en procesos como la fusión, podría llevar al diseño de mutantes

múltiples que resultaran en la atenuación del virus y que se podrían utilizar para el desarrollo de vacunas vivas o de ADN.

1.4.2. Receptores celulares. El reconocimiento entre los rabdovirus y sus células huésped está mediado por la unión de la pG a su receptor celular cuya naturaleza aún no está totalmente identificada. Los primeros experimentos mostraron que los rabdovirus VSV y VR competían por un receptor común en las células susceptibles. Este receptor común, tenía un componente soluble en disolventes orgánicos que bloqueaba el ligamiento e infectividad de los rabdovirus (Conti et al., 1988; Wunner, Reagan, y Koprowski, 1984), ya que el tratamiento de la membrana celular con fosfolipasa, pero no con tripsina, inhibía el ligamiento de VSV o VR a las células huésped (Superti et al., 1984; Wunner, Reagan, y Koprowski, 1984). Además la fosfatidilserina (PS) es capaz de inhibir el ligamiento de VSV a la célula huésped y la formación de placas de lisis (Schlegel et al., 1983). Tanto la cabeza de la serina como los ácidos grasos fueron esenciales para la inhibición (Yamada y Ohnishi, 1986). El ligamiento de fosfatidilserina por la pG se ha demostrado y localizado en el caso de la pG de VSHV (Coll, 1994). La localización predominante de la fosfatidilserina en la parte interior de la membrana plasmática (80-90% del total), podría explicar el número limitado de receptores. A pesar del papel aparente de la fosfatidilserina en el ligamiento de VSHV o VSV (Konieczko, Whitaker-Dowling, y Widnell, 1994), lo más probable es que ésta constituya, una parte de un complejo proteína-lípido (Schlegel et al., 1983; Schlegel y Wade, 1983) o una interacción implicada en los pasos posteriores de fusión (Estepa y Coll, 1996b).

Se han aplicado distintas estrategias para intentar identificar las secuencias de la pG implicadas en la interacción con el receptor. Por ejemplo, la secuencia 170-255 de la pG de VR es homóloga a las regiones de los venenos de serpiente que interaccionan con el receptor de acetilcolina (AChR) (Tordo et al., 1993), lo que sugiere su implicación en el reconocimiento del receptor. Además la pG de VR interacciona con el AChR y se comporta como un antagonista del AChR (Hanham, Zhao, y Tignor, 1993).

Siguiendo una estrategia diferente, se generaron 3 AcM anti-receptor de VSHV capaces de neutralizar la infectividad de VSHV en células de trucha RTG-2 y salmón CHSE. Por inmunoprecipitación de los componentes proteicos de la membrana plasmática, se pudo identificar un complejo que interaccionaba con ellos y que estaba formado por fibronectina (200 KDa) y una proteína de 47 KDa aún no identificada. Se ha determinado que este complejo abundante en músculo de trucha y en todos los órganos diana del

VSHV. Los AcM anti-receptor de VHSV también bloquearon la infección de otros rhabdovirus de peces (tenca, SVCV, rhabdovirus de la anguila, serotipos distintos de VSHV e VNHI) (Bearzotti et al., 1999). La fibronectina pertenece a la familia de moléculas de adhesión y forma dímeros covalentes de 400 KDa (Sadaghiani, Crawford, y Vielkind, 1994). Un complejo de fibronectina se ha identificado también como uno de los receptores de VR (Broughan y Wunner, 1995). Otros estudios han identificado el AchR como receptor de VR (Bracci et al., 1988; Gastka, Horvath, y Lentz, 1996; Lentz et al., 1986; Lentz et al., 1982), y es interesante comprobar que la fibronectina y el AchR se encuentran formando complejos en la membrana de varias células (Dimytrenko y Bloch, 1993). Sin embargo, todos estos estudios, tan solo ha puesto de manifiesto la complejidad de la interacción de los rhabdovirus con su receptor en la membrana de la célula huésped. Se necesita todavía mucho trabajo en esta área de investigación.

1.4.3. Mutantes resistentes a la neutralización con anticuerpos monoclonales (MAR). La interacción de los AcM neutralizantes con los sitios de la pG implicados en la interacción con los receptores celulares es uno de los posibles mecanismos de la neutralización de VSHV in vitro. Es por ello que la secuencia de los mutantes resistentes a la neutralización con AcM (mutantes MAR) podría dar alguna indicación sobre los sitios de interacción de la pG con el receptor celular o al menos de los sitios de la pG cuya conformación es necesaria para que tenga lugar esa interacción.

Únicamente en el caso del VR, se ha llevado a cabo un análisis extensivo de esta estrategia. Para VR se han encontrado pocos AcM anti-pG que no fueran neutralizantes o que fueran independientes de la conformación de la pG (Benmansour et al., 1991; Bunschoten et al., 1989; Kontsekova et al., 1992). La mayoría de los 266 AcM anti-pG de los que se dispone reconocen varios epítopos superpuestos que definen el sitio II (72.5% de los AcM) y el sitio III (24.8% de los AcM). El resto de los AcM van dirigidos a los sitios I y IV (Benmansour et al., 1991; Lafon, Wiktor, y Macfarlan, 1983). Los mutantes MAR del sitio II siempre presentan 2 mutaciones simultáneas localizadas en aa 34-42 y en aa 198-200, por lo que el sitio II es un epítipo discontinuo. Sin embargo los mutantes MAR del sitio III solo presentan sustituciones de aa localizadas en aa 330-338 (sitio continuo).

Sólo existe un trabajo bioquímico/inmunológico que estudie los fragmentos de la pG de VR importantes para la neutralización (Dietzschold et al., 1982). Mientras que todos los fragmentos de la pG obtenidos por tratamiento con bromuro de cianógeno (CNBr) eran

capaces de inducir anticuerpos policlonales (AcP), solo los fragmentos peptídicos aa 20-63, aa 123-198 (el más antigénico) y aa 312-342 eran capaces de inducir AcP neutralizantes. Los fragmentos peptídicos aa 20-63/aa 208-255 y aa 208-255/aa 264-310 estaban unidos por puentes disulfuro.

Estos resultados junto con los obtenidos con los mutantes MAR y otros más recientes (Johnson, Mansfield, y Fooks, 2002) sugieren una estructura de doble bucle en la pG de VR. El primer bucle es el mayor (fragmento peptídico aa 20-63 unido al aa 208-255) y contiene al bucle menor que a su vez es el que contiene al sitio más antigénico (aa 123-198).

1.5 FUSION ENTRE LAS MEMBRANAS RABDOVIRALES Y CELULARES

1.5.1. Dependencia de la fusión con la disminución de pH. La entrada de los rabdovirus a sus células huésped tiene lugar mediante un proceso de endocitosis mediada por receptor. La subsiguiente fusión de membranas, virus-endosoma permitirá la liberación de la nucleocápsida vírica en el citoplasma, es un proceso dependiente de pH, más concretamente de una disminución de pH (Rigaut, Birk, y Lenard, 1991; Schlegel, Willigan, y H.Pastan, 1982) y en VR (Superti, Derer, y Tsiang, 1984). Por el contrario la unión al receptor se realiza a pH 7.5 y puede unir a 4°C.

En ensayos in vitro, la pG de VSV solo se fusionó con vesículas de fosfolípidos a pH 5, tal y como se comprueba por microscopía electrónica o transferencia de fluorescencia (Eidelman et al., 1984). Además, la hemólisis de eritrocitos causada por la adición de VSV también es máxima a pH 5 (Bailey, Miller, y Lenard, 1981) y la exposición a pH 5 de células infectadas o transfectadas expresando pG en sus membranas causa fusión célula-célula en VSV (Gaudin et al., 1993) y en VSHV (Lecocq-Xhonneux et al., 1994).

1.5.2. Cambios conformacionales inducidos en la proteína G por la disminución de pH. La exposición de VSV a pH 5 induce una acumulación de los trímeros de pG en la zona apical del virión tal y como ha sido demostrado por microscopía electrónica (Brown, Newcomb, y Lawrence-Smith, 1988). Además, la exposición de trímeros de pG de VR a pH 5 induce un equilibrio reversible entre el estado activo de fusión (83 Å) y el estado inactivo de fusión (113 Å) (Gaudin et al., 1993). Este equilibrio,

también se ha observado en VSV (Doms et al., 1987) y se ha demostrado que es dependiente de la protonización de residuos de histidina (Carneiro et al., 2003). Este cambio de conformación, que es un requerimiento imprescindible para la fusión (Maillard y Gaudin, 2002; Roche y Gaudin, 2002), supone la exposición de sitios hidrófobos de la pG a su superficie, tal y como se demuestra en VR por las alteraciones en la unión de AcM anti sitio II y en la fluorescencia usando fluoróforos hidrófobos (Gaudin et al., 1993).

1.5.3. Interacciones con fosfolípidos. Los fosfolípidos extraídos de las membranas celulares inhiben la unión e infectividad del VR (Superti et al., 1984) y del VSV (Bailey, Miller, y Lenard, 1984; Conti et al., 1988; Mastromarino et al., 1987; Schlegel, Willigan, y H.Pastan, 1982). La fosfatidilserina (PS) fue el inhibidor más potente (Schlegel et al., 1983) y recientemente se ha demostrado que en VSV la fusión requiere interacciones proteína-lípidos (Carneiro et al., 2002; Carneiro et al., 2003).

El dominio principal de unión de fosfatidilserina se identificó en la pG de VSHV usando pepscan, péptidos sintéticos, pG recombinante y VSHV en ensayos de ligamiento de fosfatidilserina marcada en fase sólida como el correspondiente al aa 82-109 (p2) (Coll, 1997; Estepa y Coll, 1996a; Estepa y Coll, 1996b). Este dominio de ligamiento de fosfatidilserina está estructurado en heptadas hidrófobas no canónicas seguidas por una secuencia de dos aa con carga positiva (Coll, 1995a). También se pudieron encontrar heptadas repetidas seguidas de aa cargados positivamente en otros pG de otros rabdovirus en localizaciones similares con variaciones en: secuencias, número de heptadas repetidas, longitud de la secuencia de carga positivas y naturaleza de los aa cargados positivamente (Coll, 1995a; Coll, 1995b; Estepa y Coll, 1996a). Los péptidos sintéticos obtenidos de estas regiones también ligaban fosfatidilserina (Coll, 1997), pero no se pudo demostrar una relación funcional.

Dependiendo de su concentración, el péptido p2 induce agregación de vesículas, de fosfolípidos aniónicos, de hemifusión y fusión (Nuñez et al., 1998). Estos y otros experimentos confirmaron que en la interacción PS-p2 intervenían además de las interacciones hidrófobas, las iónicas (Estepa y Coll, 1996b), tal y como se ha demostrado con la pG para otros rabdovirus (Yamada y Ohnishi, 1986).

Mediante depolarización de fluorescencia y calorimetría diferencial de barrido, se ha demostrado que el péptido p2 se inserta en la parte hidrófoba de una bicapa de lípidos aniónicos manteniendo o favoreciendo una estructura conformacional en lámina β (Nuñez et al., 1998). A su vez, el dicroísmo circular (CD) demostró que la estructura β es

prácticamente la única que se observa después de la interacción de p2 con fosfatidilserina y es por lo tanto la responsable de la desestabilización de la membrana por este péptido (Nuñez et al., 1998).

1.5.4. Mutantes MAR relacionados con fusión. Los anticuerpos monoclonales neutralizantes que interaccionan con rabdovirus únicamente al pH de la fusión, sólo se han estudiado en el VR. Todos estos mutantes se localizaron en las regiones comprendidas entre los aa 29-34, aa 63 y aa 411-415 (Flamand et al., 1993). Sin embargo, no se ha establecido claramente su posible relación con la fusión (Gaudin et al., 1996).

1.5.5. Mutantes deficientes en la fusión. Esta clase de mutantes solo se ha estudiado hasta ahora en VSV. El primer mutante de VSV defectivo en fusión que se describió, se localizó en el aa 117 de la secuencia de la pG. Más adelante, la generación de varios mutantes defectivos en fusión por inserción de aa, sugirió que la fusión dependía de varios dominios de la pG tales como los adyacentes a los aa 123, 194, 410 ó 415 (Li et al., 1993), además de la región aa 118-136 (Whitt et al., 1990). Utilizando mutagénesis dirigida, finalmente se identificó la región entre los aa 123-137 de la pG de VSV como la más importante en la fusión y la que contenía el hipotético péptido de fusión (Zhang y Ghosh, 1994). Sin embargo, otras regiones de la pG también están implicadas en la fusión, ya que se han generado mutantes defectivos en fusión en regiones como las definidas por los aa 120-150, aa 134-161, aa 190-210, aa 300-360 y aa 409-419 (Shokralla et al., 1998). La región aa 385-418, por ejemplo, también altera el pH óptimo de la fusión y la región inmediatamente adyacente al dominio transmembranal, aa 443-452, también parece estar implicada en el proceso (Jeetendra et al., 2002; Shokralla et al., 1998), tal y como se ha demostrado recientemente por estudios espectroscópicos con péptidos derivados de esa región (Maillard et al., 2003).

1.5.6. Péptidos inhibidores de la fusión. En la mayoría de los virus con envuelta, la disminución del pH en el endosoma provoca un cambio conformacional irreversible en la correspondiente proteína vírica de membrana que conduce primero a la liberación de un segmento amino terminal, el denominado péptido de fusión. En el caso de los rabdovirus, la situación es totalmente distinta, ya que su péptido de fusión es interno y los cambios conformacionales inducidos como consecuencia de la disminución del pH son reversibles. Se ha encontrado algunos péptidos sintéticos derivados de la secuencia de pG de virus

con envuelta capaces de inhibir su propia infección. Por ejemplo, los péptidos sintéticos correspondientes a las heptadas repetidas amino-terminales o péptidos N (DP-107) adyacentes al péptido de fusión de la glicoproteína (pG) del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), bloquean la infección viral e inhiben la formación de sincitios a concentraciones micromolares (Owens et al., 1990; Wild et al., 1992). Sustituciones de aa en las heptadas repetidas de los péptidos N, eliminan su actividad antiviral (Kazmierski et al., 1996; Wild et al., 1992). Otros péptidos sintéticos correspondientes a la parte C-terminal, adyacente a la región transmembranal (DP-178) y con una tendencia a formar α -hélices, tienen una actividad antiviral incluso superior (concentraciones nanomolares) a los N-terminal (Wild, Greenwell, y Matthews, 1993; Wild et al., 1995). Además, se han descrito péptidos inhibidores localizados en la secuencia del péptido de fusión de la pG de HIV (Jiang et al., 1993a; Jiang et al., 1993b; Nehete, Arlinghaus, y Sastry, 1993; Slepushkin et al., 1993). Péptidos inhibidores similares a los descritos para HIV se han encontrado en los virus de la influenza (Lambert et al., 1996; Yao y Compans, 1996), respiratorio sincitial (Lambert et al., 1996), paramixovirus (Rapaport, Ovadia, y Shai, 1995; Reitter, Sergel, y Morrison, 1995; Sergel-Germano, McQuain, y Morrison, 1994) y paperas (Lambert et al., 1996; Wild y Buckland, 1997).

Debido a la capacidad de los péptidos C para asociarse con los péptidos N (Chen et al., 1995), la actividad antiviral de los péptidos sintéticos C podría ser debida a las interacciones con los dominios de péptidos N en la pG y al revés (Chan et al., 1997; Wild et al., 1995). La estructura de rayos X de esta parte de la molécula de pG de HIV, demostró que los 3 péptidos N forman una triple hélice superenrollada sobre la que se sitúan exteriormente los 3 péptidos C (Chan et al., 1997). Este complejo N+C es capaz de formarse en ausencia del resto de la proteína, es estable a altas temperaturas, las mutaciones en sus heptadas repetidas incorporadas a la pG impiden la fusión de HIV y la adición in vitro de los péptidos sintéticos derivados de las secuencias N o C son capaces de inhibir la infección viral y la formación de sincitios.

En los rabdovirus, sin embargo no hay rotura interna de la pG para liberar el péptido de fusión, el cambio conformacional inducido por el pH es reversible y hasta el momento no se han descrito péptidos inhibidores. Se han descrito, sin embargo, péptidos capaces de aumentar la infectividad de VSHV cuyo mecanismo de acción está relacionado con la fusión y cuya secuencia es parcialmente idéntica con las de aa 88-96 y 133-135 de pG (Mas et al., 2002).

1.5.7. Ensayos de fusión en rbdovirus. Los ensayos que de forma más frecuente se han utilizado para el estudio de mutantes defectivos en fusión, se han basado en transferencia de energía de fluorescencia, activación de la transcripción o formación de sincitios.

Para los ensayos de fusión basados en transferencia de energía de fluorescencia se utilizan liposomas marcados con N-(lisamina rodamina B sulfonil)-fosfatidiletanolamina (R-PE) y N-(7-nitro-2,1,3,-benzoxadiazol-4-il) fosfatidiletanolamina (NBD-PE). Cuando ambos fosfolípidos marcados están unidos en una vesícula, tras una excitación a 450 nm, la R-PE absorbe la emisión de la NBD-PE a 530 nm. Después de la fusión, los lípidos correspondientes a la membrana no marcada diluyen la mezcla R-PE+NBD-PE, no hay transferencia de energía entre el NBD y el R y por lo tanto aparece la emisión de NBD-PE a 530 nm. Este ensayo se ha utilizado para seguir la fusión de VR con vesículas de fosfolípidos (Gaudin et al., 1993). Nunca se ha descrito para ensayar la fusión de células transfectadas.

En los ensayos de fusión por activación de la transcripción por la polimerasa del fago T7, se usan dobles transfecciones en células independientes. Por un lado, se transfectan células con plásmidos que tienen el gen de la β gal bajo el promotor de la polimerasa T7 (por ejemplo, el pGINT7 β). Por otro, se infectan células susceptibles a vaccinia con la cepa de Vaccinia VTF7-3, que expresa la polimerasa del fago T7 (Fuerst et al., 1986) y después se transfectan con plásmidos que codifican el gen de la proteína fusógena. La fusión entre ambas células se detecta después de mezclarlas por la activación por la polimerasa T7 del gen de la β gal (Nussbaum, Broder, y Berger, 1994). Este ensayo nunca se ha descrito utilizando células de pez, aunque la obtención de VNHI ADN infectivo en células EPC ha utilizado recientemente este sistema (Biacchesi et al., 2002; Biacchesi et al., 2000a; Biacchesi et al., 2000b; Estepa et al., 1999).

Para los ensayos de fusión por formación de sincitios, simplemente se transfectan las células con la pG y la fusión se detecta por visualización al microscopio de los sincitios que se forman, tras la disminución del pH del medio. Este método se ha utilizado para caracterizar la fusión de la pG del VSHV en células de carpa (EPC) (Estepa y Coll, 1996a) y su dependencia del pH, temperatura y concentración celular (Estepa y Coll, 1997). También se ha utilizado extensivamente en VSV para el estudio de mutantes de fusión por transfección con los plásmidos que contienen las secuencias

mutadas de la pG (Jeetendra et al., 2002; Li et al., 1993; Shokralla et al., 1998; Zhang y Ghosh, 1994).

1.6 ANÁLISIS COMPARATIVO DE MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN

1.6.1. La transfección de células eucariotas. En determinadas condiciones, las células eucariotas pueden internalizar ADN exógeno y un pequeño porcentaje de éste se localiza en el núcleo para su transcripción y expresión. La incorporación covalente del ADN exógeno al genoma ó no, hace que la expresión sea permanente ó temporal (Singh, Balram, y Ariatti, 2001).

Debido al tamaño y carga negativa del ADN y a la multitud de barreras membranosas y enzimáticas de la célula, su entrada y consiguiente transcripción en el núcleo, donde reside la maquinaria celular de transcripción, es muy poco eficiente. Para aumentar esta eficiencia, se han desarrollado y continúan desarrollándose una amplia variedad de métodos. Históricamente, se ha utilizado fosfato cálcico, policationes condensadores de ADN (DEAE, polilisina), retrovirus, microinyección, etc. (Garcia-Chaumont et al., 2000; Ma y Diamond, 2001). Sin embargo, estos primeros métodos tienen problemas de toxicidad celular, baja reproducibilidad, complejidad de ejecución o bajas eficiencias de transfección. Para mejorar estas bajas eficiencias de transfección, se han puesto a punto nuevas técnicas entre las que se encuentran la formación de complejos ADN-liposomas.

Las eficiencias de expresión de transgenes utilizando complejos ADN-liposomas no superan el 50% del total de células transfectadas y además, la falta de control de muchas de las variables implicadas en el proceso hace que su reproducibilidad sea baja (~20%). Se desconoce cuál es el paso que limita, puesto que los complejos ADN-liposoma penetran en el 100% de las células transfectadas aunque no en todas penetra el mismo número de moléculas (Tseng, Haselton, y Giorgio, 1999). Para mejorar la eficiencia de expresión de los transgenes introducidos por transfección de los complejos ADN-liposomas se han diseñado modificaciones en el ADN, en el liposoma o en la célula (Tabla 2). Las modificaciones en la célula pueden clasificarse en aquellas que mejoran la translocación del ADN a través de las membranas plasmática (liposomas, ultrasonidos, electroporación, bombardeo), endosomal (agentes lisosomotrópicos, Ca^{++}) y/o nuclear (control ciclo celular, NLS y péptidos) Si no se obtienen los máximos rendimientos en cada una de las translocaciones membranosas mencionadas, la baja

eficiencia del proceso global disminuye la expresión del ADN transfectado.

Tabla 2.
**Posibles métodos para incrementar la eficiencia de transfección del ADN
acomplejado con liposomas catiónicos.**

<u>Membrana</u>	<u>Método</u>	<u>Referencia</u>
Plasmática	Ultrasonidos Electroporación	(Lawrie et al., 1999) (Colosimo et al., 2000)
Péptidos quiméricos		(Morris et al., 1999)
Endosoma	pH Ca ⁺⁺	(Luthman y Magnusson, 1983) (Lam y Cullis, 2000)
Péptidos quiméricos		(Haensler y Szoka, 1993)
Núcleo	Mitosis NLS	(Tseng, Haselton, y Giorgio, 1999) (Aronsohn y Hughes, 1997)
Péptidos quiméricos		(Ogris et al., 2001)

Los posibles métodos para incrementar la eficiencia de la transfección de una determinada construcción plasmídica que codifica un transgen con liposomas catiónicos se han clasificado en métodos para atravesar las membranas celulares, endosomal y nuclear.

Debido a que las células de pez tienen ciclos más largos que los de las células de mamíferos y temperaturas óptimas de crecimiento menores, los reactivos comerciales para transfección basados en liposomas y desarrollados para células de mamíferos deben ser optimizados para transfectar este tipo de células. Por otra parte, muy pocos estudios se han dirigido a optimizar intrones (Betancourt et al., 1993), promotores (Inoue et al., 1990; Moav et al., 1992; Sharps et al., 1992), activadores (Friedenreich y Schartl, 1990), oncogenes (Hayasaka et al., 1990) o el uso de células multi-potentes (Bejar, Hong, y Alvarez, 1999) para transfección (Bearzotti et al., 1992; Hackett y Alvarez, 2000). La línea celular aislada de carpa (Fijan et al., 1983) *epithelioma papulosum cyprini* (EPC), fue la que mejor predijo el comportamiento de plásmidos en peces transgénicos (Moav et al., 1992) y se transfectaba con una mayor eficiencia que otras líneas celulares de peces (Bearzotti et al., 1992; Moav et al., 1992). Por ello se ha elegido esta línea celular para los estudios presentes. Las eficiencias de transfección en estudios preliminares utilizando EPC fueron del 5-37% (López et al., 2001).

1.6.2. Ruta del ADN foráneo dentro de la célula. Para que el transgen que codifica un ADN se exprese, la primera barrera que el complejo ADN-liposoma tiene que atravesar es la membrana plasmática (Figura 5). Utilizando ADN y liposomas marcados, se ha podido comprobar la co-localización de estos en la membrana plasmática una vez adicionados a las monocapas celulares. La entrada posterior a la célula puede ser por endocitosis natural (ruta endosoma-lisosoma), por fusión natural de membranas o por medios artificiales (ultrasonidos, electroporación, bombardeo). Después, para que el ADN llegue al citoplasma tiene que atravesar la membrana de los endosomas/lisosomas. Por último para que el ADN entre en el núcleo donde residen las ARN polimerasas, tiene que atravesar la membrana nuclear (Nishikawa y Huang, 2001). Poco tiempo después de la transfección, el ADN marcado se acumula en el núcleo donde los liposomas nunca se detectan (Marcusson et al., 1998; Scherman et al., 1998).

1.6.3. Utilización de liposomas catiónicos para transfección de ADN. El uso de complejos de ADN-liposomas formados por ADN (cargado negativamente) y liposomas catiónicos (cargados positivamente) ha mejorado la eficiencia y reproducibilidad de la transfección obtenida con métodos anteriores (Lasic et al., 1997; Stamatatos et al., 1988). En este caso se forman complejos electrostáticos con el ADN que se introducen espontáneamente en las células facilitando el transporte del ADN al núcleo. Además hacen al ADN resistente a las nucleasas, condensándolo en partículas mayores de 50 nm de diámetro (Lebedeva et al., 2000; PedrosoDeLima et al., 2001). Es un método simple y más reproducible (Felgner et al., 1987).

Aunque los complejos ADN-liposomas se pueden conservar a 4 °C, se han diseñado liposomas capaces de resistir la liofilización y la posterior rehidratación (Anchordoquy, Carpenter, y Kroll, 1997). La estructura de los complejos ADN-liposomas catiónicos es globular y multilaminar alternando una bicapa lipídica y una monocapa de ADN (Lin et al., 2000; Radler et al., 1997).

1.6.4. Modificaciones en el ADN para aumentar la eficiencia de transfección. El ADN que se acompleja con los liposomas para transfectar células eucariotas es estructuralmente un plásmido (ADN bicatenario circular covalentemente cerrado) que contiene secuencias reguladoras de la expresión del transgen y aproximadamente 3 Kpb de secuencias bacterianas para su replicación y selección en bacterias (Estepa, Lorenzo, y Coll, 1994).

Una de las primeras consideraciones que se deben tener en cuenta para obtener una buena eficiencia de transfección es que el ADN no esté degradado (Schiavone et al., 2000). Las modificaciones en los plásmidos para mejorar su utilización con liposomas se han dirigido a aumentar bien su nivel de transcripción por selección de los mejores promotores para "atrapar" las ARN polimerasas (Hansen et al., 1991; Moav et al., 1992; Bearzotti, 1992) o bien su replicación mediante la inclusión de orígenes de replicación tales como el del virus SV40. Además, se han descrito aumentos de hasta 1000 veces en la expresión de un transgen cuando se incluyen en el plásmido secuencias del promotor temprano de SV40 que actúa como señal de localización nuclear (Dean, Byrd, y Dean, 1999). También se han utilizado miniplásmidos (Darquet et al., 1997) que al eliminar secuencias bacterianas, tienen aumentada su eficiencia de transfección ya que un mismo complejo liposomal puede movilizar un mayor número de moléculas de plásmido cuanto más pequeñas sean estas.

Por otra parte, también se han utilizado vectores lineales, procedentes de plásmidos circulares digeridos con una enzima de restricción de corte único. Este ADN se utiliza generalmente para inducir expresión permanente. En este sentido, un nuevo concepto es la utilización de plásmidos ADN lineales, pero cerrados covalentemente en sus extremos para aumentar su resistencia a las ADNasas (plásmidos MIDGE, Ready Vector). Estos plásmidos permiten reducir mucho su tamaño por lo que exhiben altos niveles de expresión.

1.6.5 Ultrasonidos para translocar la membrana plasmática. Las ventajas del uso de la sonicación para la transfección del ADN son: i) rapidez, ii) sencillez y economía, iii) versatilidad, por ser un método mecánico y iv) aplicable in vivo localmente para terapia génica (Newman et al., 2001). Las aplicaciones de este método pasan por entender los efectos de la sonicación en las células y aclarar el mecanismo mediante el cual el ADN atraviesa las membranas celulares. El primer efecto que se observa después de la aplicación de los ultrasonidos a las células es el calentamiento (Diederich y Hynynen, 1999). En segundo lugar, un aumento del espacio intercelular y por último perforaciones en las membranas al aumentar las intensidades/frecuencias (Frenkel y Kimmel, 2000; Martin, Pratt, y Watmough, 1983). Los ultrasonidos terapéuticos ($\sim 1 \text{ W cm}^{-2}$ a 3.000 KHz durante 30 a 90 s) producen un ensanchamiento del espacio intercelular en los tejidos así como la rotura de las conexiones entre células adyacentes (Frenkel y Kimmel, 2000). La cavitación parece ser la responsable de la entrada del ADN en las células (Frenkel,

Kimmel, y Iger, 1999; Greenleaf et al., 1998; Liu, Lewis, y Prausnitz, 1998; Wyber, Andrews, y D'Emmanuele, 1997). Por ejemplo, utilizando $0.4-0.6 \text{ W cm}^2$ a 40 KHz durante 6-24 s se ha conseguido introducir ADN en las células de las aletas de las truchas (Fernandez-Alonso, 2000; Fernandez-Alonso, Rocha, y Coll, 2001). La perforación del espacio intercelular en tejidos requiere mayores intensidades (2.2 W cm^2 a 3.000 KHz durante 30 a 90 s) (Frenkel y Kimmel, 2000). Sin embargo, la comparación de los distintos trabajos es difícil debido a la influencia desconocida que tienen las numerosas variables que intervienen (frecuencia, intensidad, duración, geometría, etc.) y a los pocos estudios dedicados a examinar sistemáticamente los efectos de dichas variables (Wyber, Andrews, y D'Emmanuele, 1997).

Los plásmidos sufren pocas alteraciones con el proceso de sonicación (Fernandez-Alonso, 2000; Wyber, Andrews, y D'Emmanuele, 1997) y quedan protegidos contra dichas alteraciones cuando se acomplejan con liposomas (Wasan, Reimer, y Bally, 1996). Aunque la combinación de la sonicación con liposomas aumenta unas 7 veces la eficiencia de la transfección celular (Lawrie et al., 1999; Unger, McCreery, y Sweitzer, 1997), no se han publicado muchos trabajos sobre este tema.

1.6.6. Electroporación para translocar la membrana plasmática. Las variables físicas implicadas en la transferencia de ADN a las células por electroporación (Hama-Inaba et al., 1987; Knutson y Yee, 1987) son: i) la duración del pulso eléctrico T (tiempo, 5-20 ms), que depende de la resistencia del medio (Ω) y de la potencia (Faradays, μF) del condensador ($T = \Omega \mu\text{F}$). La resistencia del medio inversamente proporcional a su concentración iónica ($\sim 20 \Omega$), depende además del volumen y del espesor de la cubeta usada para la electroporación y ii) la intensidad del campo eléctrico ($\sim 6.000 \text{ V/cm}$ en cubetas de 0.4 cm), que tiene gran influencia en el porcentaje de transfección óptimo, generalmente coincidente con un 20-80% de mortalidad celular (Chu, Hayakawa, y Berg, 1987).

El medio de electroporación afecta a las células y a la entrada del ADN de varias maneras, ya que; su resistencia influye en T que a su vez afecta la supervivencia celular, su osmolaridad afecta la supervivencia celular, su concentración de iones afecta la estabilidad de las membranas durante el pulso eléctrico y el pulso eléctrico provoca una permeabilización temporal o aparición de poros en la membrana plasmática, que permaneciendo a bajas temperaturas durante varias horas afecta a la supervivencia celular (Rols y Teissie, 1998).

La eficiencia de entrada del ADN en la célula también depende de la concentración de ADN (óptimo de 1-40 $\mu\text{g/ml}$), la hipotonicidad del medio (Golzio et al., 1998), la presencia de etanol (Golzio, Teissie, y Rols, 2001), DMSO (Melkonyan, Sorg, y Klempt, 1996) o suero (Delteil, Teissie, y Rols, 2000), el número de pulsos y su duración. Aunque el número de pulsos aumenta proporcionalmente la entrada del ADN en la célula, su duración parece ser el parámetro más importante, ya que sólo cuando los pulsos se aplican durante unos 5 ms se puede detectar dicha entrada (Rols y Teissie, 1998).

Una vez que el ADN ha entrado en las células ha de expresarse y para ello tiene que llegar al núcleo. Se ha demostrado que las células de ciclo celular corto (crecimiento rápido) expresan el transgen introducido por electroporación más eficientemente que las de crecimiento lento, probablemente debido a un mayor número de mitosis (Colosimo et al., 2000). El incremento de expresión cuando las células se incuban con colchicina antes de la electroporación, confirma el requerimiento de mitosis (no hay membrana nuclear) para este efecto.

No se ha experimentado el efecto de la electroporación sobre la penetración ni la expresión de complejos ADN-liposoma.

1.6.7. Bombardeo para translocar la membrana plasmática. Sólo se ha usado el bombardeo con partículas de oro recubiertas de ADN para introducir genes, en tejidos “in vivo” (Gomez-Chiarri y Chiaverini, 1999; Gomez-Chiarri et al., 1996), pero no se ha empleado el bombardeo in vitro ni con complejos ADN-liposoma.

1.6.8. Control de pH en la ruta endosoma/lisosoma. Los complejos ADN-liposoma endocitados por las células se procesan utilizando la ruta endosomal. Esta ruta conlleva una posible degradación del ADN por la actuación de enzimas lisosomales que actúan a bajo pH, por lo que los compuestos que promueven la translocación del ADN fuera del endosoma o que controlan el pH del lisosoma, aumentan la eficiencia de la expresión (Morales, Zhao, y LeFrancois, 1999).

En este sentido, el tratamiento de las células con 20-100 μM de cloroquina, un agente lisosomotrópico que evita la disminución de pH del lisosoma, es el método que más se ha usado para aumentar la eficiencia de transfección. Los tratamientos con cloroquina durante y después de la transfección aumentan un 40% la eficiencia de la transfección de complejos de ADN-liposomas (Luthman y Magnusson, 1983). La cloroquina también incrementa 1.5 veces la expresión de complejos ARN-péptidos y de ARN-liposomas

(Bettinger et al., 2001). Debido a que la exposición a cloroquina por más de 4 h a 10-100 μM causa muerte celular, la sacarosa (5-500 mM), el cloruro amónico (10-40 mM) o la polivinilpirrolidona (0.01 –1 mg/ml), también se han usado como agentes lisosomotrópicos alternativos (Ciftci y Levy, 2001).

Otra alternativa para “escapar del endosoma/lisosoma”, es la utilización de los liposomas de lípidos que se vuelven fusogénicos, solo cuando el pH baja a valores lisosomales (Kono et al., 2001; Simoes et al., 2001) o lípidos con enlaces SH no estables en medio reductor de los liposomas debido a la activación de enzimas específicas (Tang y Hughes, 1998).

1.6.9. Adición de calcio. El Ca^{++} parece tener 2 efectos sobre la transfección: condensar el ADN cuando se añade antes de la transfección y aumentar su expresión cuando se añade post-transfección. En los primeros métodos utilizados para transfección celular mediante el uso del Ca^{++} , solo se empleaba su capacidad de formación de precipitados muy finos de complejos ADN- Ca^{++} sobre las células. Después se ha demostrado que la presencia de Ca^{++} después de la transfección en concentraciones <10 mM, es capaz de aumentar 3-20 veces la eficiencia de expresión de los complejos ADN-liposomas. Este efecto se ha demostrado en 5 líneas celulares y usando 6 formulaciones distintas de lípidos catiónicos (Lam y Cullis, 2000). El efecto es específico y no depende solamente de las cargas positivas ya que otros cationes divalentes como el Mg^{++} poseen efectos sobre la eficiencia de transfección y el efecto del Ca^{++} se inhibe con EGTA (quelante específico del Ca^{++}).

Además se ha observado que la inhibición de la transfección por la presencia de suero en el medio de cultivo puede ser contrarrestada por la presencia de 2 mM de Ca^{++} (Haberland et al., 2000). Parece ser que el Ca^{++} no se necesita para la entrada del ADN en la célula y que el suero no inhibe ni el ligamiento ni el paso de la membrana citoplasmática de los complejos ADN-liposomas pero sí el escape del ADN de los endosomas y/o la expresión del ADN (Haberland et al., 2000). Es posible que esta actividad post-transfeccional del Ca^{++} sea debida a su capacidad lisosomotrópica. Al inhibir o reducir el cambio de pH en el endosoma-lisosoma estaría actuando a favor de la transferencia del ADN desde el endosoma al citoplasma (Haberland et al., 1999).

1.6.10. Influencia de la mitosis: ausencia de membrana nuclear.

Sorprendentemente, la mayoría de las células en una monocapa son capaces de internalizar los complejos ADN-liposoma, pero sólo un 20% de ellas exhibe expresión del transgen (Scherman et al., 1998). Puesto que en una monocapa de una línea celular la principal causa de heterogeneidad se debe al estado del ciclo celular de cada célula, es de suponer que el ciclo celular tenga alguna influencia en la expresión del transgen. Confirmando estas observaciones, se ha demostrado que en las células en crecimiento la eficiencia de transfección siempre es superior que en las células en reposo.

Por otra parte, utilizando células sincronizadas por doble bloqueo con timidina (2.5 mM), se demostró que la eficiencia de transfección aumentaba 3-10 veces después de la mitosis (Tseng, Haselton, y Giorgio, 1999). Con poblaciones celulares separadas por centrifugación, también se demostró que la actividad mitótica incrementa de 30 a 500 veces la expresión de los complejos ADN-liposomas transfectados (Brunner et al., 2000; Mortimer et al., 1999). Células Hela sincronizadas en G1 o en G2/M transfectadas con complejos ADN(GFP)-liposoma demostraron resultados similares mediante análisis por FACS (Tseng, Haselton, y Giorgio, 1999), confirmados por otros estudios usando células permeabilizadas con digitonina (Escriou et al., 2001). Se supone que en todos estos casos la desaparición de la membrana nuclear durante la mitosis contribuye a una mayor penetración del ADN en el núcleo. Sin embargo, no toda la expresión obtenida es debida a este fenómeno, ya que existen células pre-mitóticas que también expresan el transgen y además nunca se llega al 100% de células con expresión sino a un máximo del 40% (Tseng, Haselton, y Giorgio, 1999). La desaparición temporal de la membrana nuclear durante la oogénesis, también se ha aprovechado para aumentar la eficiencia de transfección de genes en oocitos inmaduros utilizando retrovirus como vectores para producir ganado transgénico (Chan et al., 1998).

1.6.11. Señales de localización nuclear (NLS) en péptidos y en ADN. Las mejoras en el transporte de ADN del citoplasma al núcleo se han demostrado tanto utilizando complejos ADN-péptidos como secuencias específicas en el ADN.

El ejemplo más eficaz ha sido el uso de péptidos que incluían secuencias correspondientes a las señales peptídicas de localización nuclear (NLS) del antígeno T de SV40 (Aronsohn y Hughes, 1997). Los complejos formados por interacciones iónicas entre el ADN y los péptidos NLS aumentan la eficiencia de transporte del ADN al núcleo, tanto que la inyección intracitoplasmática de solo 10 moléculas de ADN-NLS (0.06 fg de

plásmido) es suficiente para producir peces cebra con un transgen integrado (Liang, Alestrom, y Collas, 2000). El uso de complejos ADN-NLS permite una reducción de 10^5 veces en las cantidades de ADN necesarias para detectar la transfección (Collas y Allestrom, 1998; Liang, Alestrom, y Collas, 2000). Estos resultados se confirmaron utilizando ensayos de transporte al núcleo en células permeabilizadas con digitonina (Sebestyen et al., 1998). El ligamento covalente entre NLS y el ADN sin embargo, no causa un aumento de la eficiencia de transfección.

También los complejos melitina-polietilenoimina provocan una mejora (~ 4 veces) en el transporte nuclear de las secuencias ADN gracias probablemente a que la melitina posee una secuencia NLS (Ogris et al., 2001).

1.6.12. Péptidos quiméricos. Los péptidos quiméricos combinan diferentes péptidos cortos capaces cada uno de: ligar reversiblemente al ADN, condensarlo, dirigirlo a células específicas, translocar el ADN al citoplasma o dirigirlo al núcleo celular (Luo y Saltzman, 2000; Morris et al., 2000). El diseño de péptidos quiméricos puede seguir dos estrategias: una única secuencia peptídica (varias secuencias de péptidos cortos unidas covalentemente) o varios péptidos cortos que se autoensamblan no covalentemente entre ellos.

Los péptidos quiméricos basados en la unión covalente de péptidos de fusión virales y secuencias NLS se han usado con éxito para la transfección. Se han utilizado los péptidos de fusión virales de la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza (Haensler y Szoka, 1993), de la pG de VSV (Schuster et al., 1999) y de la pG de HIV (Morris et al., 1999; Morris et al., 1997) (Tabla 3). Varias poliaminas catiónicas de diferentes tamaños y estructuras tales como poli-lisina, poliarginina, espermidina, espermina, temporinas (Rinaldi et al., 2001), dendrímeros, protamina, poli-etilenoimina (Boussif et al., 1999; Boussif et al., 1995; Lemkine y Demeneix, 2001),..., también se han usado para condensar ADN junto con péptidos NLS (Midoux et al., 1998; Niidome et al., 1997; Wyman et al., 1997).

Tabla 3.
Ejemplos de péptidos con actividad condensadora de ADN, endosomolítica, inductores de fusión o promotores de poros.

<u>Secuencia</u>	<u>Origen</u>	<u>Referencia</u>
GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	melitina	(Ogris et al., 2001)
GLFEAIAGFIENGWEGMIDGGGC	influenza HA	(Haensler y Szoka, 1993)
KFTIVFPHNQGHWKNVPSNYHYCP	VSV pG	(Schuster et al., 1999)
GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV	HIV pG	(Morris et al., 1999)
WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA	GALA	(Haensler y Szoka, 1993)
GLFEALLELLESLWLLEA	covalente: JTS1	(Gottschalk et al., 1996)
HHHHHWYG	covalente	(Midoux et al., 1998)
WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA	covalente	(Wyman et al., 1997)
(LARL) ₆ KLLKLLKLLKLLKLLKLL	covalente	(Niidome et al., 1997)
(K) ₁₉ VAYISRGGVSTYYSDTVKGRFTRQKYNKRA	Ac anti-ADN	(Avrameas et al., 1999)
palmitoil-SPKRSPKRSPKR + influenza HA	no covalente	(Wilke et al., 1996)
YKAKKKKKKKKWK + JTS1	no covalente	(Gottschalk et al., 1996)

Los péptidos pueden ser monofuncionales o quiméricos (péptidos con distintas actividades unidos covalente o no covalentemente). Las funciones que se escogen para el diseño de los péptidos quiméricos son: condensación de ADN, fusión o desestabilización de membranas y secuencias de localización nuclear (NLS).

La polilisina, por ejemplo, es capaz de compactar ADN hasta formar partículas de 100-200nm. Para aumentar su endocitosis y su transferencia a células específicas, la polilisina puede ligarse covalentemente al tripéptido RGD que interacciona con los receptores celulares de las integrinas (Colin et al., 2000; Harbottle et al., 1998), a anti-CD3 o anti-CD5 para linfocitos T, a la transferrina o a la galactosa para hepatocitos (Brown et al., 2000; Wagner, Ogris, y Zauner, 1998), etc. La glicosilación de las aminas de la polilisina y de la polialilamina introduce grupos hidrófilos que disminuyen su citotoxicidad in vivo y aumentan la eficiencia de transfección in vitro varios órdenes de magnitud.

Otra estrategia consiste en acoplar polilisina a un péptido derivado de un anticuerpo que liga ADN (Avrameas et al., 1999). También se han usado anticuerpos “anti-proteínas del citoesqueleto” para dirigir los ADN-liposomas al citoplasma demostrándose un incremento en la eficiencia de expresión (Khaw et al., 2001).

Se ha descrito una molécula híbrida obtenida mediante ligamiento covalente de un derivado lipídico (dioleoil fosfatidiletanolamina, dioleoil-PE) y un péptido fusogénico derivado del veneno de la abeja (melitina) (Lam et al., 2001; Ogris et al., 2001). Este reactivo es insensible a la presencia de suero y forma partículas con una carga positiva entre 50-250 nm. Acomplejado con ADN, la dioleoil-PE-melitina transfecta eficientemente varios tipos celulares (Legendre et al., 1997). Para incrementar la translocación del ADN a través de las membranas lisosomales, se han utilizado péptidos fusogénicos virales que cambian de conformación con la disminución de pH induciendo fusión o lisis de

membranas. Otra estrategia importante es el uso de péptidos que incluso a pH neutro son capaces de fusionar con la membrana plasmática tales como el péptido de fusión de la pG de HIV (Morris et al., 1999).

También se han usado péptidos asociados por interacciones electrostáticas y/o hidrófobas. Por ejemplo, el péptido de influenza (INF) y un péptido condensador palmitoilado (Wilke et al., 1996) o el péptido formador de poros (JTS1) y un péptido condensador (Gottschalk et al., 1996), etc. Para autoensamblar péptidos y proteínas con el ADN de una manera más controlada, intermedia entre la unión covalente y la no covalente, se ha usado ADN biotinilado y estreptavidina-transferrina (Sato et al., 2000).

1.6.13. Resumen de métodos para aumentar la eficiencia de transfección.

Los complejos ADN-liposomas catiónicos penetran espontáneamente en la mayoría de las células aunque se expresan con desigual eficiencia (Tseng, Haselton, y Giorgio, 1999). Dicha penetración puede aumentarse utilizando métodos mecánicos (ultrasonidos, electroporación, bombardeo, etc.) (Colosimo et al., 2000; Lawrie et al., 1999). Sin embargo, para aumentar las eficiencias de expresión del 20-50% al 80-100%, es necesario que el ADN exógeno atraviese también las membranas del endosoma/lisosoma y la nuclear. Para ello pueden utilizarse:

1. Agentes lisosomotrópicos tales como el cloruro amónico, la cloroquina, la sacarosa o el Ca^{++} (Ciftci y Levy, 2001; Lam y Cullis, 2000), que disminuyen la estancia en el lisosoma.

2. Lípidos o péptidos que son fusogénicos solo al bajo pH del lisosoma (Kono et al., 2001; Simoes et al., 2001), que ayudan a escapar del lisosoma.

3. Aumento de mitosis o meiosis. La electroporación, los complejos ADN-liposomas (Brunner et al., 2000; Mortimer et al., 1999; Tseng, Haselton, y Giorgio, 1999), la inyección (Chan et al., 1998) o la penetración en células permeabilizadas (Escriou et al., 2001), requieren la ausencia de las membranas nucleares para una máxima eficiencia de expresión. El uso de secuencias NLS tanto en péptidos (Liang, Alestrom, y Collas, 2000) como en el ADN (Dean, Byrd, y Dean, 1999), sin embargo, puede aumentar la eficiencia del transporte al núcleo incluso cuando las células están en reposo (Aronsohn y Hughes, 1997).

El uso de todos estos procedimientos tanto aislados como en combinación puede aumentar las eficiencias de expresión de la transfección y su reproducibilidad.

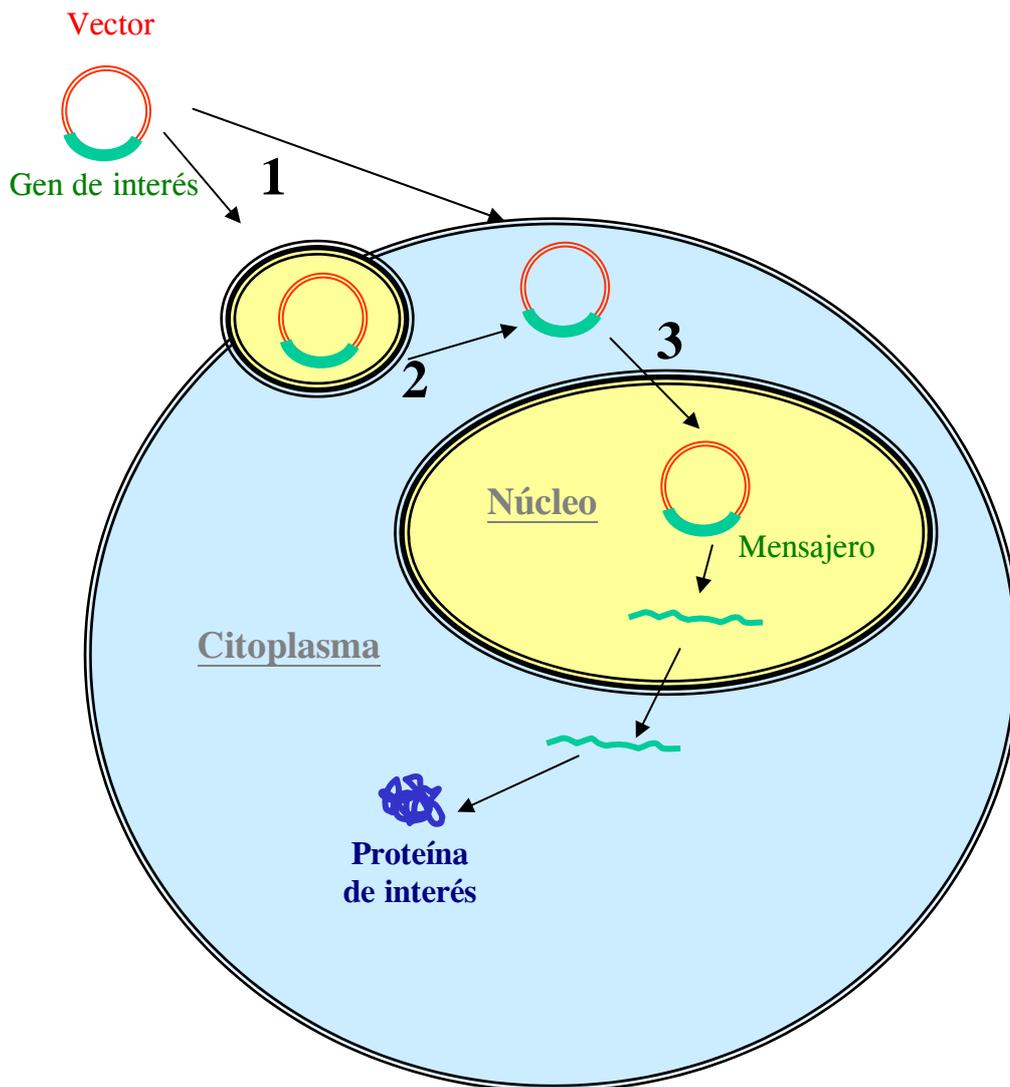


Figura 5.- Ruta celular de los complejos ADN-liposoma para expresión de sus genes. Se diseña primero un plásmido que contiene el gen de interés con promotores, intrones, terminadores y demás elementos de control para células eucarióticas. El plásmido, tiene que atrevesar las membranas: plasmática bien a través de la ruta endosoma/lisosoma (1, 2) o por fusión directa con ella (1) y después la membrana nuclear (3). Sólo dentro del núcleo las ARN polimerasas pueden fabricar el ARN mensajero que se traducirá en el citoplasma (Hackett y Alvarez, 2000).

El modelo elegido en éste trabajo para estudiar la fusión de los rabdovirus ha sido el VSHV, porque origina una de las enfermedades causante de mayores mortalidades en la producción piscícola mundial y su biología molecular es una de las mejor conocidas. Este estudio se centra en la fusión de membranas virus-hospedador que origina la entrada del genoma viral en la célula. Tal y como se ha demostrado para otros virus, el estudio de la fusión puede ayudar tanto al diseño de agentes terapéuticos para frenar la infección como a la generación de vacunas ADN o atenuadas.

Puesto que la pG es la proteína del VSHV que media el proceso de fusión, el objetivo de este trabajo se ha centrado en una de sus regiones implicada en este proceso y en el diseño de mutaciones puntuales que alteren o anulen su capacidad fusogénica. La región de la pG seleccionada se ha definido basándose en estudios anteriores que identificaron el dominio de ligamiento de fosfolípidos y de su péptido de fusión.

Se ha demostrado en VSHV la existencia de un dominio de ligamiento de fosfolípidos aniónicos entre los aa 82-109 (p2) (Estepa y Coll, 1996a; Estepa y Coll, 1996b). Por otra parte, aunque aún no existe un consenso generalizado, la posición del péptido de fusión en la pG de VSHV se ha propuesto entre los aa 142-159, por comparación con VSV (Walker y Kongsuwan, 1999). La existencia en VSHV de un puente disulfuro entre la C110 (contenida en el p2) (Estepa y Coll, 1996a) y la C152 (contenida en el péptido de fusión) (Einer-Jensen et al., 1998) y de mutantes con alteraciones en el pH de fusión localizados alrededor de la C110 (Gaudin, DeKinkelin, y Benmansour, 1999), sugirió que la región implicada en fusión podría localizarse simultáneamente en el p2 y en el péptido de fusión de VSHV (Gaudin, DeKinkelin, y Benmansour, 1999). Por todo ello, se decidió enfocar el estudio a la región situada entre los aa 56-159 que comprende ambos dominios.

El trabajo se ha desarrollado en 2 líneas paralelas. Por un lado, se han estudiado las secuencias de la región seleccionada comparativamente entre distintos géneros de rabdovirus y aislados de VSHV y funcionalmente utilizando péptidos sintéticos derivados de segmentos de la región. Todo ello ha facilitado el diseño de los mutantes estudiados en éste trabajo. Por otro lado, se ha optimizado un ensayo de fusión utilizando células de pez transfectadas con el gen de la pG para poder estudiar la

capacidad de fusión de los mutantes diseñados. Las dos líneas de investigación concluyeron en ensayos de fusión en células de pez de los mutantes diseñados en la región seleccionada.

En concreto, se ha desarrollado los siguientes objetivos parciales:

1.- Estudios comparativos de las secuencias de los aa 56-159 de la pG de VSHV con otras pertenecientes a otros rhabdovirus y a varias cepas de VSHV (GeneBank), para definir las propiedades generales de la región en estudio.

2.- Estudio de la interacción con fosfolípidos de segmentos elegidos de la región seleccionada, utilizando péptidos sintéticos (pepscan, p2, p3, p4 y p9) o recombinantes (frg#11) derivados de su secuencia y confirmación de la capacidad inmunogénica de la región elegida.

3.- Diseño y obtención de mutantes en péptidos sintéticos y en el gen de la pG

4.- Puesta a punto de un ensayo de fusión utilizando células de peces, después de la optimización de la transfección de células EPC.

5.- Análisis de la capacidad fusogénica de los mutantes obtenidos.

3.1. CULTIVOS CELULARES.

3.1.1 Línea celular EPC. La línea celular empleada en todos los ensayos fue la *Epithelioma Papullosum Cyprini* (EPC) (Fijan et al., 1983) derivada de carpa. Las células EPC se crecieron en medio RPMI-1640 modificado por Dutch con 20 mM HEPES (290 mOsm/Kg), (Flow Ayrshire, Escocia), con 10% de suero fetal bovino (SFB, Seralab, Inbitech, León, España) y suplementado con 2 mM de glutamina (Flow), 1 mM de piruvato sódico (Flow), 50 µg/ml de gentamicina (Flow) y 1,2 µg/ml de anfotericina (Flow) (Estepa, 1992; Estepa y Coll, 1992a; Estepa y Coll, 1992b). Para cultivarlas se utilizaron frascos estériles de plástico de 25, 75 y 150 cm² de superficie (Costar, Cambridge, MA, USA) y placas de 24, 48 y 96 pocillos (Costar). Las células se crecieron a una temperatura de 28°C en una atmósfera de 95 % de aire y 5 % de CO₂. Una vez obtenidas, las monocapas celulares de EPC, se guardaron en incubadores a 12°C hasta su uso (Basurco, 1990; Estepa, Frías, y Coll, 1992). Para subcultivarlas, las células se despegaron de los frascos con una solución de tripsina-EDTA y se diluyeron con medio fresco al volumen necesario (dilución 1/3 a 1/5) para sembrar nuevos frascos. La mezcla tripsina-EDTA se preparó mezclando 0,25 % de 4 U/mg de tripsina (Serva, Heidelberg, Alemania), 1 g/ml de glucosa (Merck, Alemania), 0,026 % de EDTA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y 0,001 % de rojo fenol (Sigma) en solución salina tamponada con fosfato (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM HNa₂HPO₄ y 1,5 mM H₂KPO₄, pH 7,4).

3.1.2. Transfección de células EPC. Para optimizar la eficiencia de transfección de células EPC se utilizaron plásmidos codificando para los genes marcadores βgal o GFP y para ensayar las propiedades de fusión plásmidos codificando proteína G. Se sembraron 500.000 células EPC por ml en placas de 24 pocillos con 400 µl de medio RPMI-1640 modificado por Dutch con 20 mM de HEPES y suplementado con 10% de suero fetal bovino venticuatro h después se transfectaron con las mezclas ADN-fugene (preincubadas durante 15 min en ausencia de SFB). Después de la transfección, las células se incubaron durante 1 día a 28 °C para los ensayos de expresión de βgal o 2 días a 20 °C para los ensayos de expresión de la pG de VSHV (Bearzotti et al., 1992; Fernandez-Alonso et al., 1999a; Lopez et al., 2001).

Cuando la transfección se realizó por electroporación, se levantaron las células EPC de los frascos de cultivo con tampón fosfato libre de Mg⁺⁺ y Ca⁺⁺ (PBS) conteniendo 0,9 g/l de EDTA. Después de lavarlas con el mismo tampón, a 2x10⁶

células en 400 μ l de PBS se añadieron 10 μ g de ADN y se electroporaron en cubetas de 0,2 cm a 0.3 Kv, 960 μ F ($\zeta \sim 0,2$ ms). Las células electroporadas se sembraron en placas de 24 pocillos hasta la realización de los ensayos de detección.

Para los ensayos de transfección con plásmidos dependientes de la polimerasa T7 (por ejemplo, el pGINT7 β bajo el promotor T7), antes de la transfección, las células se infectaron con la cepa de *Vaccinia* VTF7-3, que expresa la polimerasa del fago T7 (Fuerst et al., 1986) y se incubaron durante varios tiempos y a distintas temperaturas.

Los agentes lisosomotrópicos como el cloruro de amonio, cloroquina y sacarosa, CaCl₂, colchicina o timidina se obtuvieron de Sigma (Sigma Che.Co.St.Louis, Mi) y se adicionaron a las monocapas EPC según se indica en cada caso.

3.1.3 Detección de la expresión de GFP. Las células transfectadas con plásmidos codificando GFP, se examinaron y fotografiaron con un microscopio Nikon invertido provisto de una lámpara de luz ultravioleta utilizando un filtro azul DM510 B-2^a y una cámara SBIG ST-7 (Santa Bárbara Instrument group, Sta Barbara, CA, USA). Se incluyó un filtro para evitar la fluorescencia inespecífica de infrarrojos (eyeguard for CFWN 10X MB J99000 ND4). Para tomar y procesar las microfotografías se utilizó el programa CCDOPS versión 4.03 (Santa Bárbara Instrument group) (Fernandez-Alonso, 2000; Fernandez-Alonso et al., 1999a; Fernandez-Alonso, Rocha, y Coll, 2001).

3.1.4. Detección de la expresión de β galactosidasa (β gal). Para ensayar la actividad β gal en las células EPC transfectadas con una máxima sensibilidad, se utilizó el ensayo Gal-screen (Tropix, Bedford, MA, USA). Después de eliminar el sobrenadante de cultivo se añadieron a las monocapas de células EPC transfectadas 200 μ l de 0.025 % Tritón x100 por pocillo y se agitaron las placas durante 15 min para su lisis. Después se realizó el ensayo Gal-scrren, según las condiciones del fabricante, y 60 min más tarde, alícuotas de 20 μ l se contaron durante 2 s cada una en un aparato MiniLumat LB9506 (EG&G Berthold, Postfach, Germany). En las condiciones usadas en este trabajo, 1 pg de β gal rendía 4×10^4 cps (Lopez et al., 2001).

3.1.5. Tinción histológica de β gal. Para visualizar la actividad β gal en las células EPC transfectadas, las monocapas EPC se fijaron durante 5 min con metanol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se tiñeron con 2 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indoilo- β -D-galactopyranoside (Xgal) en 5 mM ferrocianida II, 5 mM ferrocianida III, 2 mM MgCl_2 en PBS. Después de 16 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, las monocapas se lavaron con agua y se secaron al aire. Para estimar el porcentaje de células teñidas se tomaron 3 fotografías al azar con un microscopio invertido Olympus provisto de una cámara fotográfica digital. Se contaron 700-1000 células por pocillo y los resultados se expresaron en medias y desviaciones estándar de 2 pocillos por experimento

3.1.6. Ensayos de luciferasa. Para ensayar la luciferasa “firefly” se empleó el kit Bright-Glow. Para ensayar la luciferasa de “renilla” se empleó el kit Dual, en ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante (Promega, Madrid, España).

3.1.7. Ensayos de fusión basados en transferencia de energía de fluorescencia. Para los ensayos de fusión basados en transferencia de energía de fluorescencia se utilizaron liposomas marcados con N-(lisamina rodamina B sulfonil)-fosfatidiletanolamina (R-PE) y N-(7-nitro-2,1,3,-benzoxadiazol-4-il) fosfatidiletanolamina (NBD-PE). Para ello se mezclaron en Cloroformo/Metanol (1:2), 10 μl de 60 mg/ml de fosfatidilcolina (PC), 10 μl de 30 mg/ml de fosfatidilserina (PS), 10 μl de 1 mg/ml de R-PE y 10 μl de 1 mg/ml de NBD-PE y se llevaron a sequedad en un tubo de vidrio. Una vez seco, la película de lípidos se reconstituyó en medio de cultivo RPMI, 10% SFB, a pH 6 tamponado con 20mM HEPES 20mM MES y se sonicó 3 veces durante 1 min cada vez. Para el ensayo de fusión se añadieron las mezclas de fosfolípidos sonicadas a los cultivos de células EPC y se incubaron durante 30 min. El 100 % de la fusión se estimó añadiendo 1 μl de 2% Tritón X100. El aumento de fluorescencia se midió excitando a 485 nm y recogiendo la emisión a 535 nm en un fluorímetro GENios (Tecam, Barcelona, España) (Nuñez et al., 1998).

3.1.8. Ensayos de fusión basados en la activación de la transcripción por T7. Los ensayos de fusión basados en activación de la transcripción por la polimerasa del fago T7, se realizaron usando 2 poblaciones de células EPC que se diferenciaban en el gen con el que habían sido transfectadas, siguiendo el procedimiento descrito para HIV (Nussbaum, Broder, y Berger, 1994) y para VNHI (Biacchesi et al., 2002; Biacchesi et al., 2000a; Biacchesi et al., 2000b; Estepa et al., 1999). Por un lado se transfectaron

células EPC con plásmidos que tienen el gen de la β gal bajo el promotor de la polimerasa T7 (por ejemplo, el pGINT7 β). Por otro, se infectaron células EPC con *Vaccinia* VTF7-3 que expresa la polimerasa del fago T7 (Fuerst et al., 1986) y se transfectaron después con la pG del VSHV clonada bajo el promotor T7 en el plásmido pGEMTeasy (donada por el Dr. Michel Bremont). La fusión se detectó por luminiscencia una vez puestas en contacto ambas poblaciones celulares y la disminución del pH (ver procedimiento anterior). Se utilizaron diferentes protocolos variando las temperaturas de transfección e incubación, así como los tiempos.

3.1.9. Ensayos de formación de sincitios. En este ensayo la fusión de células transfectadas con pG se estimó valorando la formación de sincitios célula-célula. Se utilizaron las condiciones óptimas de pH, tiempo y temperatura utilizadas para ensayos similares utilizando células EPC infectadas con VSHV (Estepa y Coll, 1997). Se siguieron también los métodos empleados para el estudio de mutantes de fusión en VSV y transfección con plásmidos codificando para proteína G mutada (Jeetendra et al., 2002; Li et al., 1993; Shokralla et al., 1998; Zhang y Ghosh, 1994).

Para ensayar la fusión célula-célula y/o su inhibición con anticuerpos, las monocapas EPC se sembraron en pocillos de placas de 24 pocillos (500,000 células por ml), al día siguiente se transfectaron con 0.6 μ g de plásmido G3-pcDNAI/Amp o pMCV1.4-G acomplexados con 2 μ l de fugene en 100 μ l de volumen siguiendo los métodos descritos con anterioridad (Fernandez-Alonso et al., 1999a; López et al., 2001; Rocha et al., 2002a). En placas paralelas, los anticuerpos se diluyeron en medio RPMI-1640 (sin bicarbonato) a pH 6 tamponado con 20 mM de HEPES y 20 mM MES (Sigma, Che. Co., St.Louis, Missouri). Al día siguiente las placas de las EPC transfectadas se lavaron y en el caso del ensayo de inhibición de la fusión se adicionaron las diluciones seriadas de los anticuerpos. Después de 30 min de incubación a pH 6, las placas se lavaron y se incubaron durante 2 h a 14 °C con RPMI-1640 (sin bicarbonato) a pH 7.6 tamponado con 20 mM de HEPES y 20 mM MES. Por último, las monocapas de células EPC se fijaron con metanol frío, se secaron y se tiñeron con Giemsa filtrado. Se contaron el número de núcleos en sincitios (sincitio de más de 3 núcleos) de 400 células por pocillo. Los resultados se expresaron como porcentaje de núcleos en sincitios según la fórmula,

$$\frac{\text{número de núcleos en sincitios}}{\text{número total de núcleos}} \times 100.$$

Los títulos de inhibición de la fusión se definieron como el inverso de la dilución a la que el número de núcleos en sincitios se reducía al 50% del inicial.

3.2 INMUNOENSAYOS.

3.2.1. Enzimoimmunoensayos (ELISA). Estos ensayos se utilizaron para el estudio de la expresión de membrana de los mutantes de proteína G. Para realizar los inmunoensayos, se tapizaron placas de poliestireno de 96 pocillos (Dynatech, Plochingen, Germany) con 1 µg/pocillo de péptidos, proteínas recombinantes o VSHV (100 µl/pocillo en agua Sigma) y se secaron manteniéndolas a 37°C durante toda una noche. previamente a su uso, las placas tapizadas se bloquearon con 100 µl/pocillo de tampón de dilución (130 mM NaCl, 2 mM KCl, 8 mM Na₂HOP₄, 1,4 mM KH₂OP₄, 0,24 mM mertiolato, 5 g/l seroalbúmina bovina, 0,3% suero de conejo, 0,5 g/l Tween-20, 50 mg/l rojo fenol, pH 6,8) diluido a 1/20 en agua destilada (Sanz y Coll, 1992a; Sanz y Coll, 1992b). A continuación, se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min con 100 µl/pocillo de los anticuerpos utilizados diluidos en el tampón mencionado con anterioridad. Se lavaron las placas una vez por inmersión en agua desionizada y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de anticuerpos anti-Igs de ratón obtenidos en conejo y conjugados con peroxidasa (Sigma) diluidos 1/500 en tampón de dilución. Por último, se lavaron tres veces y se revelaron añadiendo 50 µl/pocillo de orto-fenilendiamina 1 mg/ml (OPD, Dakopatts, Denmark) disuelto en tampón sustrato (150 mM citrato sódico, 3 mM H₂O₂, 0,24 mM mertiolato, pH 4,8) (Coll, 1989b). La reacción se dejó transcurrir 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, la reacción se frenó con 50 µl/pocillo 2 M H₂SO₄ y se leyó la absorbancia de las placas en un Titertek Multiskan RC a 492 y a 620 nm. La A_{620nm} se utilizó para corregir diferencias individuales de absorbancia entre pocillos. Los resultados se expresaron como A₄₉₂-A_{620nm} (Martinez y Coll, 1987; Martinez y Coll, 1988).

Para confirmar la identidad del frg#11 se utilizaron, anticuerpos policlonales en ascitis de ratón, obtenidos por inmunización contra la pG de VSHV purificada por cromatografía de afinidad sobre Concanavalina A (Estepa y Coll, 1996b; Perez, Estepa, y Coll, 1998). Se utilizaron anticuerpos anti-G (5 µg/ml) en tampón de dilucion.

El reconocimiento de los segmentos de pG por los correspondientes anticuerpos se llevó a cabo en pocillos tapizados con VSHV (0.5 o 1.5 µg de proteína viral / ml) en 0.1M de tampón fosfato-citrato a pH 7.6 y 6. Los ascitis de ratón que contienen anticuerpos anti-

p2, p3, p4 y frg#11 se diluyeron 100-300 veces (para obtener una absorbancia máxima de 1.5-2 unidades) en tampón de dilución a diferentes pHs y se incubaron durante 1 hora. Los fondos obtenidos en pocillos recubiertos con BSA e incubados con los mismos anticuerpos a las mismas diluciones, o en pocillos recubiertos con VSHV e incubados con anticuerpos irrelevantes se estimaron entre 0.1 - 0.6 unidades de absorbancia. La absorbancia relativa se calculó según la fórmula

$$\frac{\text{absorbancia a pH 5.6}}{\text{absorbancia a pH 7.6}} \times 100.$$

Para ensayar anticuerpos anti-pG en suero de trucha, se utilizaron pocillos de placas de 96 pocillos (Dynatech, Plochingen, W.Germany) recubiertas con 2 µg de G4 (proteína recombinante) o frg#11 por pocillo en 100 µl de agua destilada por desecación a 37 °C. Para reducir el fondo, los pocillos se bloquearon con 100 µl por pocillo de tampón de dilución a 4 °C y se lavaron inmediatamente antes de realizar el inmunoensayo. Los antiseros de trucha se diluyeron serialmente de 30 a 810 veces en tampón de dilución y se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo en suero de trucha diluido. Después del lavado, se incubaron durante 30 min con el anticuerpo monoclonal 1G7 anti-IgM de trucha (Sanchez, Coll, y Dominguez, 1991).

3.2.2. Inmunotransferencias. Se utilizó este método para comprobar las especificidades de los anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales utilizados. Para ello se separaron muestras de VSHV purificado, en geles de poliacrilamida (12% de poliacrilamida para el gel separador y 6% para el gel apelmazador), polimerizados con 0,5% TEMED y 1% persulfato amónico. Las muestras diluidas en tampón de muestra (0,12 M TrisClH pH 6,8, 10% glicerol, 250 mM β-mercaptoetanol/DTT, 2% SDS, 0,02% azul de Bromofenol), se calentaron previamente a 100°C durante 2 min y se realizó la electroforesis durante 2-3 h a 25 mA en tampón de electroforesis (25 mM Tris base pH 8,6, 192 mM Glicina, 0,1% SDS).

Las proteínas ya separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad) en cubeta húmeda durante 3 h a 250 mA en tampón de transferencia (25 mM Tris base pH 8,6, 192 mM glicina y 20% Metanol). Los filtros con las proteínas transferidas se cortaron en tiras y se procedió a la inmunodetección. Las tiras se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS, 2% de leche desnatada Molico, 0,05% de Tween-20, 4% de extracto *E. coli*, 0,3% de suero de conejo) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron 1 hora los anticuerpos diluidos 1/200 en tampón

de bloqueo. Se lavaron por inmersión en H₂O tres veces 5 min y se incubaron con anticuerpos de conejo anti-Igs de ratón conjugados con peroxidasa durante 30 min. Tras los últimos lavados, se procedió al revelado utilizando el kit comercial ECL de luminiscencia (Amersham, Arlington Heights, IL).

3.2.3. Microensayos de neutralización de VSHV. Con este ensayo se titularon los anticuerpos anti-VSHV utilizados en los ensayos de formación de sincitios. Para realizar este ensayo, se incubaron durante toda la noche a 4°C 10³ DICT₅₀/ml de VSHV 07.71 con diluciones seriadas de los anticuerpos en placas Costar de 96 pocillos (200 µl/pocillo) (Lorenzo, Estepa, y Coll, 1996). Al día siguiente, se añadieron 100 µl de las diferentes mezclas de dilución de sueros/virus a cultivos de células EPC en placas de 96 pocillos y se mantuvieron en adsorción durante 2 horas a 14°C con agitación suave cada 15 min. Después de retirar la mezcla, las células se lavaron suavemente para evitar que se levantara el tapiz, con medio RPMI-1640 modificado por Dutch con 2% de suero fetal bovino, y después se añadió 100 µl/pocillo de medio de cultivo celular fresco. Las placas se incubaron durante toda la noche a 14°C. Las monocapas de EPC infectadas se fijaron con metanol frío (100 µl/pocillo) durante 10 min. y a continuación se realizó el inmunoensayo. Las células fijadas se incubaron con el anticuerpo monoclonal 2C9 (Sanz y Coll, 1992a; Sanz y Coll, 1992b) que reconoce la nucleoproteína N del VSHV (proteína mayoritaria del virus) diluido (1/200) en tampón de dilución de ELISA durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar con H₂O desionizada, se incubaron con 100 µL de anticuerpos de conejo anti-Igs de ratón conjugados con peroxidasa (Sigma) durante 30 min. Después de tres lavados, las placas se revelaron añadiendo 100 µl/pocillo de diaminobenzidina (DAB, Sigma) conservada a -70 °C recién disuelta en 10 ml PBS pH 6,5, 8 mg DAB y 10 µl H₂O₂ (Panreac). Se dejó proceder la reacción hasta que se detectaron focos de color marrón (desde pocos minutos a 1 hora) al microscopio invertido. Una vez lavada y secada la placa, los focos marrones (positivos a DAB) se contaron con un microscopio invertido provisto de un ocular 10x con cuadrícula. Los resultados se expresaron según la fórmula:

$$\frac{\text{número de focos positivos en presencia de anticuerpo}}{\text{número de focos en ausencia de anticuerpo}} \times 100.$$

El título de neutralización se definió como la inversa de la última dilución en la que se observan el número focos que se obtienen en los controles sin virus (1-2 por pocillo).

3.2.4. Ensayos por citometría de flujo (FACS). Se utilizó este ensayo para comprobar que la proteína G y sus mutantes se expresaban en las membranas de las células EPC transfectadas con los plásmidos que los codificaban.

Para el ensayo de la expresión de pG en la superficie de las células EPC transfectadas con G3-pcDNAI/Amp o pMCV1.4-G, las monocapas de células EPC se incubaron 1 h con AcMs o AcP de conejo anti-pG (donado por el Dr. Niels Lorenzen, Denmark), en tampón FACS (0,13 M NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, 0,1% seroalbúmina bovina, 0,01% N₃Na y 5 mM EDTA, pH 7,4) que contenía 2% suero de conejo y 2% suero de cabra. Después de lavar con tampón FACS, las células se incubaron 30 min con anti suero de cabra anti- Fab'2 de ratón marcado con fluoresceína (Caltag, S.Francisco, CA, USA) y se levantaron de la monocapa con PBS sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺. En el mismo día de la tinción, 5000 células se analizaron por citometría de flujo en un aparato Beckton-Dickinson (S. José, CA, USA) FACScan usando el programa LYSYS II para el análisis. La señal de fluorescencia se capturó en la región FL1 a 514-545 nm (Fernandez-Alonso, 2000; Fernandez-Alonso et al., 1999a). Para el ensayo de la expresión de pG en el citoplasma de las células EPC transfectadas con pMCV1.4-G se permeabilizaron las células con FACSTM permeabilizing solution 2 perm2 (BD-Biosciences, Becton Dickinson, España), antes de proceder a la tinción con anticuerpos y a su observación en un microscopio de fluorescencia.

Para el ensayo de βgal empleando el sustrato fluorescente dodecanoyl aminofluoresceína (FDG), las células EPC transfectadas con pCMVβ se incubaron 2 min a 28 °C con 1 mM (FDG) en 1% DMSO, 1% etanol en 100 μl. Después de lavar con PBS a 4 °C, las células se recogieron con 1 ml de tampón FACS (Beckton Dickinson) y se incubaron 2 h a 4 °C antes del análisis con el aparato de FACS.

3.2.5. Obtención de anticuerpos policlonales (AcP) en ascitis de ratón. Se utilizó este método para obtener ascitis de ratón conteniendo anticuerpo policlonal anti- frg#11, p2, p3, p4 o pG. Varios ratones hembras BALB/c en grupos de 3, se inmunizaron por inyección de 20 μg de frg#11, p2, p3, p4 o pG (Pérez, Estepa, y Coll, 1998) en adyuvante completo de Freund's y después por 4 inyecciones mensuales con adyuvante incompleto de Freund's. El VSHV se inyectó también en saponina. Para ello 30 μg de VSHV concentrado se sonicaron en presencia de 30 μg de saponina (Superfos, Quil A), 600 μg de colesterol y 6 μg de fosfatidilcolina (Larsson, Lovgren, y Morein, 1993; Morein et al., 1984) en 1 ml de agua destilada. Para obtener líquido ascítico de ratón

conteniendo los anticuerpos, los ratones inmunizados se inyectaron i.p. con $0.5- 2 \times 10^6$ células de mieloma (X63/Ag8653) tal y como se describió anteriormente (Coll, 1989a). Para obtener el ascitis se inyectó a los ratones PBS. El ascitis se recogió y mezcló pasándose después de centrifugar por una columna de 3 x 10 cm de Sepharose (Pharmacia) con extracto de *E.coli* (~10 mg/ml) y suero de conejo (~10 mg/ml) para absorber anticuerpos de fondo. Los ascitis se concentraron unas 10 veces con 40% se sulfato amónico y se dializaron frente a PBS (10 mM fosfato sódico, 150 mM NaCl, pH 7.2). En SDS-PAGE y tras la tinción del gel con Coomassie se detectaron 2 bandas de proteína de 50 y 24 Kda, respectivamente.

3.2.6. Obtención de anticuerpos policlonales (AcP) en trucha. Truchas de 200-500 g de peso corporal, se mantuvieron en acuarios de 100 l a 12°-18 °C para su limentación y posteriormente se dividieron en dos grupos.

Grupo 1, truchas 1 y 2. Se inmunizaron i.p. con VSHV + pG en Freund's 4 veces durante 3 meses. A cada trucha se le inyectaron 30 µg de VSHV (calentado a 37 °C 30 min) + 30 µg de pG diluidos 1:1 con adyuvante completo de Freund's para la primera inyección y con adyuvante incompleto de Freund's para las restantes. Los títulos de neutralización obtenidos en el suero de las truchas 2 meses después de la última inyección fueron de ~ 100.

Grupo 2, truchas 3 y 4. Se inmunizaron con VSHV en saponina. VSHV (30 µg) se sonicó en presencia de 30 µg de saponina (Superfos, Quil A), 600 µg de colesterol y 6 µg de fosfatidilcolina (Larsson, Lovgren, y Morein, 1993; Morein et al., 1984) en 1 ml de agua destilada. Un ml de esta mezcla se inyectó a las truchas i.p. 4 veces durante 3 meses. Los títulos de neutralización obtenidos en el suero de las truchas 2 meses después de la última inyección fueron de ~ 2000.

Otros 3 sueros de trucha con títulos de neutralización de ~ 100.000 se obtuvieron por donación de los doctores DeKinkelin (Jouy-in-Josas, France) y Niels Lorenzen (Aarhus, Denmark).

Como suero de trucha control se utilizó una mezcla de 15 sueros procedentes de truchas sanas no infectadas de 500 g de peso de una granja cerrada sin historias de infección previa (Escuela de Montes, Madrid, España)

El plásmido G3-pcDNAI/Amp que codifica el gen de la pG de VSHV (Fernandez-Alonso et al., 1999a) se usó para inducir anticuerpos anti-pG en truchas de 10 cm de largo. Para inmunizar las truchas 10 µg de plásmido se sonicaron con 5-10 truchas de 20-50 g de

peso corporal en 200 ml de agua según se describe en detalle en trabajos anteriores (Fernandez-Alonso, 2000; Fernandez-Alonso, Rocha, y Coll, 2001). El suero se extrajo de las truchas 1 mes después de la inmunización.

Para generar truchas resistentes a la infección de VSHV, unas 400 truchitas de 0.5-2 g se infectaron por baño-inmersión con VSHV 07.7 (Basurco y Coll, 1991). Las truchas que sobrevivieron a la infección después de 3 meses, se sometieron a una segunda infección con VSHV 07.71. Después de 1 mes las truchas supervivientes a esta 2^a infección no mostraron signos de SHV. Se extrajo suero de las truchas 2-4 meses después de la segunda infección.

3.3 BIOLOGÍA MOLECULAR

3.3.1. Virus de la Septicemia Hemorrágica Vírica (VSHV). La cepa del virus de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV) empleada es el aislado francés VSHV-07.71 (Bernard, LeBerre, y DeKinkelin, 1983; DeKinkelin y LeBerre, 1979; LeBerre, De Kinkelin, y Metzger, 1977) que se obtuvo de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).

La producción y titulación de virus se realizó según la descrita por DeKinkelin (DeKinkelin y LeBerre, 1979). Retirando previamente el medio utilizado para crecer las células, se infectaron monocapas de EPC con VSHV en medio con 2% de SFB, a baja multiplicidad de infección (m.o.i. = 10^{-2} - 10^{-4}). Las células se mantuvieron en adsorción con el virus durante 1 h a 14°C con agitación suave cada 15 min y se rellenaron los frascos con medio con 2% de SFB, hasta la lisis completa del tapiz celular (10-14 días). Los inóculos para neutralización se obtuvieron separando los restos celulares del sobrenadante por congelación y descongelación y posterior centrifugación a 3.000 r.p.m., recuperación del sobrenadante y congelación a -70°C.

En cuanto a la purificación del virus, la metodología seguida es básicamente la descrita por DeKinkelin (DeKinkelin, 1972) y modificada por Basurco (Basurco, 1990). Después de descartar por centrifugación los restos celulares de cultivos de EPC infectados, se precipitó el virus con polietilenglicol 6000 (PEG-6.000) al 7% en C1Na al 2,3% a 4°C y en agitación durante 2 h. Después de centrifugar a 10.000 g durante 45 min se resuspendió el sedimento en 1-2 ml de TNE (0,15 M Tris, 0,15 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,6). Para aumentar la pureza, se ultracentrifugó el virus a través de un

gradiente de sacarosa 15-45% en TNE a 80.000 g durante 270 min en una ultracentrífuga Beckman 25-75 con rotor SW27. La estimación de la cantidad de proteína se realizó, bien midiendo la $A_{280\text{nm}}$ ($\epsilon = 1,4$) o, tiñendo con azul de Coomassie y comparando con patrones conocidos, se consideró el límite de detección 1 μg por banda de proteína detectada.

3.3.2. Plásmidos utilizados. Para la optimización de la transfección de células EPC, se usaron, principalmente el pCMV β de 7.2 Kpb (Clontech Labs, Palo Alto, CA) y el pMOK βgal (6.9 Kpb) o pMCV1.4 βgal (5.9 Kpb) (Ready Vector, Madrid, España). Todos ellos contienen el gen de la $\beta\text{galactosidasa}$ (βgal) de *E.coli* bajo el control del promotor temprano de citomegalovirus (CMV). Ahora bien mientras que el pCMV contiene el promotor mínimo (100 pb) y 687 pb de secuencias potenciadoras, el pMOK y pMCV1.4 contienen 218 pb de secuencias potenciadoras/enhancer adicionales. El pMCV1.4 se deriva del pMOK por eliminación de alrededor de 1 Kpb de secuencias bacterianas innecesarias y por la inclusión de un sitio múltiple de clonaje (Tabla 4). También se ensayó el pMIDGE β (4.4 Kpb) derivado del pMCV1.4 por eliminación de todas las secuencias excepto el promotor y el gen βgal , linearizado y cerrado covalentemente (Ready Vector).

Para los ensayos de fusión utilizando transcripción por la polimerasa T7 del fago correspondiente, se utilizaron: el pGINT7 β (15 Kpb) (Nussbaum, Broder, y Berger, 1994), el pcDNA3.1/HisB/LacZ (8.6 Kpb) (InVitroGen), los pT7EMNLSlacZ (9.4 Kbp) y pE1T7R (9.6 Kpb) (Verri et al., 1997), el pCMV-T7p (Dra. Heike, Reims) y el vaccinia T7 (Dr. Blasco) que contienen el gen lacZ bajo el promotor de la polimerasa del fago T7.

Otros promotores se ensayaron con βgal tales como el de SV40 (p βgal ctrl de Clontech) y el de músculo de carpa (GpcDNA3-FG2 de Qiagen).

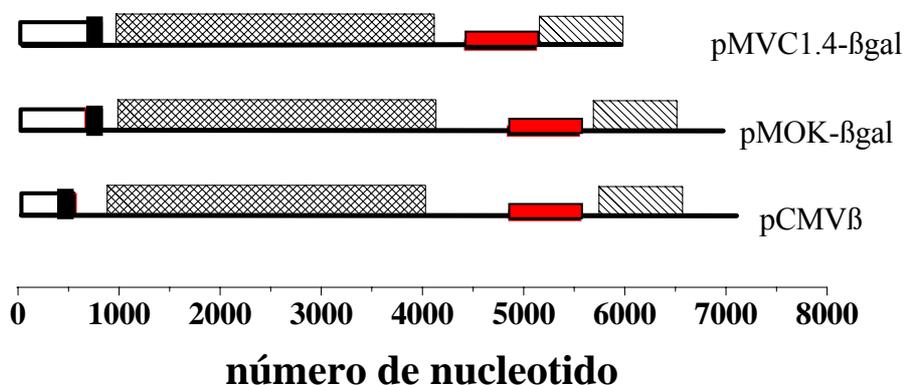
Como genes marcadores alternativos se ensayaron la proteína verde fluorescente (GFP) y la luciferasa (Luc). El gen de la GFP se utilizó clonado bajo el promotor CMV en el plásmido GFP-pQBI₂₅ (6,2 Kpb) (Quantum Biotech Inc, Montrevil-sous-bois, France) o bajo el promotor de actina de carpa pGFPQBI₂₅-pAE6 que contienen el gen de la proteína verde fluorescente (GFP).

Tabla 4

Principales plásmidos que se han utilizado en el trabajo:

Expresión:	Vector	Kpb	Promotor	marcador	Obtención
βgal/GFP	pCMVβ	7.2	CMVcorto	βgal	Clontech
	pβgalctrl	7.9	SV40	βgal	Clontech
	pGFPQBI ₂₅ ¹	6.2	CMVcorto	GFP	QuantumBiotech
	pβactin-lacZ ²	7.3	βactina carpa	βgal	McLean
	pMOKβ	7.0	CMV	βgal	ReadyVector
	pMCV1.4β	6.5	CMV	βgal	ReadyVector
	pMIDGEβ	4.4	CMV	βgal	ReadyVector
Luciferasa	pCMV-Luc ³	6.8	CMV	Luc	INRA
	pGL3ctrl	5.2	SV40	Luc	Promega
	pRL-CMV	4.0	CMV	r.Luc	Promega
	pRLnull	3.3	T7	r.Luc	Promega
G de VSHV	G-pcDNA3-CMV	7.0	CMVcorto	G	Qiagen
	G-pcDNA-FG2 ⁴	7.0	Musculo de pez	G	Qiagen
	G3-pcDNAI/Amp	6.3	CMVcorto	G	INIA
	G-pGEMTeasy	4.5	T7	G	INRA
Inducibles T7	pGINT7βgal ⁵	15	T7	βgal	INIA Dr.Blasco
	pcDNA3.1/HisB/lacZ	8.6	T7	βgal	InVitroGen
	pT7EMNLSlacZ ⁶	9.4	T7	βgal	Univ.Padua
	pE1T7R ⁶	9.6	CMVcorto	T7polim	Univ.Padua
	pCMV-T7p ⁷	7.5	CMVcorto	T7polim	Reims
	VacciniaT7 ⁸	--	Vaccinia	T7polim	INIA Dr.Blasco
Promotor	pGFPQBI25 ⁹	6.4	Actina carpa	GFP	UMH
Pez	G-pcDNA3-FG2 ⁴	7.0	Musculo de pez	G	Qiagen

1. Dr.Blasco (INIA, Madrid, España)
2. Dr.McLean (Univ. Southampton, England)
3. Dr.M. Bremont (INRA, Paris Jouy-en-Josas)
4. Qiagen (Germany, no publicado)
5. Dr.Blasco, INIA (Nussbaum, Broder, y Berger, 1994)
6. Dra.Tomamin, Univ.Padua (Verri et al., 1997)
7. Dra.Heike, Reims (no publicado)
8. Dr.Blasco (INIA, Madrid, España)
9. Dra.Estepa (UMH, Elche, España)



Esquema de los mapas de pMVC1.4βgal, pMOKβgal y pCMVβ. ■, promotor mínimo del CMV
 ▨, regiones 5'. ▩, gen de la βgal gene. ▧, gen de resistencia a antibióticos ■ regiones de plásmidos bacterianos comunes.

El gen Luc se utilizó clonado bajo el promotor CMV utilizando los plásmidos comerciales pGL3ctrl, pRL-CMV y pRLnull de Promega y el pCMV-Luc donado por el Dr. Bremont (INRA).

Para la generación de la construcción G3-pcDNAI/Amp, se partió de la construcción G-pcDNAI (Dr. Michel Brémont, INRA, Francia), que contiene el gen de la pG de VSHV (aislado francés 07.71) clonado en el vector pcDNAI (4,0 Kpb) (Invitrogen) y se subclonó en el vector comercial pcDNAI/Amp (4,8 Kpb) (Invitrogen) (Fernandez-Alonso et al., 1999a). Además se subclonó bajo el promotor de músculo de carpa (G-pcDNAI/Amp), de actina de capa (G-pAE6 donado por la Dra. Estepa, UMH) y de T7 (G-pGEMTeasy donado por el Dr. Bremont, INRA).

3.3.3. Mutagénesis dirigida en la construcción pGEMTeasy-G. Inicialmente se construyeron los mutantes en este plásmido con objeto de emplearlos después para la reconstrucción de VSHV completo (proyecto CT984003) y para la puesta a punto de posibles ensayos de fusión que empleaban la polimerasa T7. La mutagénesis dirigida se basó en el método del Quick-Change (Stratagene, La Jolla, Ca, USA). Brevemente, el plásmido parental pGEMTeasy-G de doble cadena y 2 oligos de 15 nucleótidos cada uno con la mutación deseada, por ejemplo los correspondientes a $5' C256G 3'$ para el mutante P86A, se extendieron por medio de PCR utilizando Pfu turbo ADN polimerasa (Stratagene), generando plásmidos con cadenas abiertas sin metilar que contenían la mutación introducida en los oligos. Después se trató la mezcla con la endonucleasa de restricción DpnI específica para ADN metilado que digiere sólo las cadenas del ADN parental inicial, dejando solo el plásmido amplificado. El plásmido amplificado que contiene la mutación deseada se utilizó después para transformar *E.coli* XL1-blue competentes (Stratagene). Los plásmidos se produjeron en cantidad como se describió antes a partir de un clon. La construcción de algunos de los mutantes se encargó a la empresa Cytomix (Cambridge, Inglaterra). La confirmación de la mutación se obtuvo por secuenciación de la región mutada (Cytomix o servicio del Centro Nacional de Biotecnología, CNB).

3.3.4. Subclonajes del plásmido pGEMTeasy-G al plásmido pMCMV1.4. Para llevar a cabo la puesta a punto de los ensayos de fusión basados en fluorescencia o en formación de sincitios, la colección de mutantes de pG obtenida en pGEMTeasy hubo

de subclonarse en el plásmido pMCV1.4, que era el que se expresaba con mejor eficiencia en EPC. Para ello, se obtuvo el gen pG mediante una digestión preparativa a partir de 2 µg de la construcción pGEMTeasy-G (Dr. M. Bremont, INRA) con *EcoRI* (10 U/µl) (GibcoBRL, Postfach, Germany), ya que el gen pG está clonado entre dos sitios *EcoRI*, durante 2 h a 37°C en un aparato Techne dri-block. De igual manera se linealizó el pMCV1.4 (Ready Vector). Para disminuir su religación, primero se inactivó la *EcoRI* del plásmido digerido pMCV1.4 a 65 °C 15 min y después se añadió fosfatasa alcalina SAP (Roche, Barcelona, España). La mezcla se incubó a 37 °C 60 min y después se inactivó la fosfatasa a 65 °C 15 min. Los productos de las digestiones se separaron en un gel de agarosa Low Melting Point al 1% (Sambrook, Fritsch, y Maniatis, 1989), recuperando y purificando las bandas obtenidas con columnas del kit comercial SNAP (InVitroGen, Barcelona, España). Se realizó la ligación del plásmido y el inserto pG (razón plásmido:Inserto 1:5, incluyendo controles sin inserto), a temperatura ambiente durante 2 horas utilizando la T4 ADN ligasa (Roche) en un volumen final de 20 µl por mezcla de ligación por mutante. Los 20 µl de mezclas ligadas se pipetearon en pocillos de placas de 96 pocillos provistas de filtros MF en su fondo (Millipore, Madrid, España) y se dializaron durante 45 min poniendo las placas a flotar sobre agua destilada. Después se transformaron por electroporación 10 µl de bacterias electrocompetentes *E. coli* Top 10 (InVitroGen, Barcelona, España) con 2 µl de mezcla de ligación dializada en cubetas de 0,1 cm (Biorad) a 1,8 Kv en un aparato Eppendorf 2510. Después de la transformación se añadieron 0.5 ml de medio Terrific Broth (TB) (de Sigma con 8 ml de glicerol por l, pH 7,5) y se incubaron las bacterias a 37°C durante 30 min en un incubador con agitación. Se sembraron 200 µl por placa en placas Petri de 9 cm de diámetro de TB-Kanamicina (100 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

La extracción del ADN plasmídico se realizó por el método del CTAB a partir de 6 colonias transformadas por mutante y de una colonia del control de ligación. Para ello, se incubaron cultivos de 2 ml de medio TB-Kanamicina (100 µg/ml) con las colonias en tubos de 13 ml (Starstedt, Inc., Newton, USA) a 37°C con agitación durante la noche. Se recuperó el precipitado bacteriano por centrifugación a 12.000 r.p.m. durante 1 min y se sometió a lisis con solución STET (50 mM Tris-CIH pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 8% sacarosa, 0.1% Triton X100) y lisozima (1 mg/ml) durante 2 min a temperatura ambiente y durante 45 s en un bloque térmico a 100°C. Se centrifugó después a 12.000 r.p.m. durante 8 min y se recuperó el sobrenadante, que se trató con

ARNasa (50 µg/ml) durante 30 min a 37°C. Se trató el ADN durante 5 min a temperatura ambiente con una solución al 5% de CTAB (Sigma) (0.2% final), previamente solubilizado y se centrifugó a 12.000 r.p.m. 10 min. El precipitado recuperado se disoció del CTAB con etanol 100% y ClNa 5 M a -70°C durante 20 min y se lavó con etanol 70% frío. Se resuspendió el precipitado en H₂O destilada estéril (Sigma).

Para detectar la presencia del inserto se digirió el ADN extraído de los distintos clones durante 2 h a 37°C con *EcoRI*. Se separaron los productos de la digestión en un gel de agarosa al 1% y se seleccionaron aquellos clones que tenían el inserto. Para distinguir la dirección del inserto, los plásmidos aislados se sometieron a digestión con las enzimas *SacI* y *XmaI* que producían fragmentos de 4.3 + 0.08 Kpb en el caso de que la dirección del inserto fuera correcta o de 1.6 + 2.8 Kpb en el caso de que la dirección del inserto fuera la contraria. Para cada mutante, se escogió uno de los clones que tenía el inserto en la dirección adecuada y se amplificó para la experimentación subsecuente.

3.3.5. Expresión del frg#11 recombinante. La secuencia correspondiente a los aa 56-110 de la pG de VSHV 07.71 (Thiry et al., 1991b) se amplificó por PCR del cADN obtenido de su ARN en proyectos anteriores en este laboratorio (Estepa, Fernandez-Alonso, y Coll, 1999). La preparación en cantidad del frg#11 y su caracterización se describieron en detalle en una publicación (Rocha et al., 2002b). De forma resumida, las bacterias (BL21 DE3) se crecieron en 1l de Luria Broth (LB) con ampicilina a 37 °C. Cuando el cultivo alcanzó una DO a 600nm de 0.7, la temperatura se bajó a 28°C y se añadieron 100 mM isopropil b-D- thiogalactopiranosido (IPTG) para inducir la expresión del frg#11. Las bacterias crecieron durante 6 h más antes de añadir de nuevo 100 mM IPTG y de mantener el cultivo 16 h más a 28°C. El procedimiento se aumentó de escala a 15 l con la ayuda de un fermentador (Inbiotec, León, España). Finalmente, las células se centrifugaron y se lisaron con 30 ml de tampón de lisis (20 mM Na₂HPO₄, 0.5 M NaCl, 6 M guanidinio HCl, pH 7.8). El lisado se sometió a 25 ciclos de sonicación a 300 W y luego se centrifugó a 20.000 g 30 min. El sobrenadante se aplicó a una columna de afinidad de Ni (ProBond™, Invitrogen) equilibrada con tampón de ligamiento (20 mM NaH₂PO₄, 0.5 M NaCl, 8 M urea, pH7.8). Se lavó con tampón de lavado a pH 6 según instrucciones del fabricante y se eluyó con tampón de elución a pH 4. La concentración de las proteínas eluidas se siguió por absorbancia a 280 nm. Las fracciones del pico de absorbancia se mezclaron y se dializaron en 20 mM Tris a pH 4 para aumentar la solubilidad del frg#11.

Para aumentar la pureza de las fracciones eluidas separándolas de componentes de alto peso molecular, se realizó una cromatografía por una columna de Sephadex G-100 en 20 mM Tris pH 4. Las concentraciones y su pureza se determinaron por absorbancia a 590 nm después de añadirles el reactivo Bradford (BioRad) y por densitometría de las bandas obtenidas después de la tinción con azul de Coomassie de los geles PAGE del frg#11 y de curvas a varias concentraciones de BSA.

3.3.6. Purificación de plásmidos. Todos los plásmidos listados en la Tabla 4 se usaron para transformar bacterias *E.coli DH5alfa* (Clontech, Madrid, España). La preparación de plásmidos en gran cantidad se hizo después utilizando el sistema comercial de purificación de ADN Wizard Plus Megaprep (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones de la casa comercial, y un protocolo de purificación modificado basado en lisis alcalina omitiendo el paso final de cromatografía en resina. El protocolo se simplificó y optimizó en cuanto a rendimiento y grado de pureza. El protocolo optimizado es el siguiente: se resuspendieron 3 g de pasta de bacterias en tubos de 250 ml (rotor GSA) con 40 ml de la solución I (50 mM Tris-Cl, 40 mM EDTA, 100 µg/ml de ARNasa A, pH 7,5) y se lisaron durante <20 min mezclando por inversión hasta que se obtuvo un medio transparente con una solución de lisis II (0,2N NaOH, 0,1% SDS). Después los restos bacterianos se precipitaron con una solución de neutralización III (1.3 M Acetato de Potasio, pH 4,8) y se retiró el precipitado por centrifugación a 14.000 g durante 15 min y filtración a través de papel de filtro. Para recuperar el plásmido del sobrenadante se precipitó con 55 ml de isopropanol durante 5 min, agitando por inversión y se centrifugó a 14.000 g 15 min. Después de secado y disuelto en H₂O (Sigma) se volvió a precipitar el ADN en tubos de 40 ml (rotor SS34) con 0,25 mM de Acetato de Sodio pH 5,2 y etanol 100% frío y por último se lavó con etanol 70%. Después de secar el precipitado durante 20 min a vacío o durante toda la noche a temperatura ambiente se disolvió el ADN en H₂O (Sigma). Finalmente se estimó la cantidad de ADN total por medida de la absorbancia en un espectrofotómetro (A_{260nm}) y el porcentaje de plásmido por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se ajustaron las soluciones de plásmido a 0,5-1 mg/ml de ADN total (A_{260nm}). Las preparaciones de plásmidos contenían 80-100% de ADN plasmídico, según se demostró por electroforesis en gel de agarosa, siendo el resto otros ADN bacterianos.

3.3.7. Análisis de secuencias de la proteína G de rhabdovirus. Se utilizó el modelo de alineación propuesto para las secuencias de pG derivadas de los cADN de 14 rhabdovirus animales pertenecientes a 4 géneros (Walker y Kongsuwan, 1999). Los aa hidrófobos (en código de letras únicas, F,Y,I,L,V,M,A,+W,H,T), se definieron como aquellos aa con valores de $\Delta G > 0.4$ Kcal/mol para transferir la cadena lateral del aa del agua al etanol (Schulz y Schimer, 1984). Los aa hidrófobos se usaron para definir las heptadas hidrófobas repetidas con posibilidad de formar hélices anfipáticas (aa hidrófobos en posiciones a y d) con el programa PSEARCH PCGene (Intelligenetics, Geneve, Switzerland) (Coll, 1995b). La alineación se realizó con el programa MegaLign del paquete DNSTAR. La alineación posterior de C, P, pG y otros aa se realizó manualmente. Los perfiles de hidrofiliidad/hidrofobicidad se obtuvieron con el programa ANTIGEN del paquete PCGene. Las secuencias de 25 aislados de VSHV se obtuvieron del GenBank según los números de acceso: A10182, AB060725, AB060727, AF143862, AF345857, AF345858, AF345859, AJ233396, NC000855, U28798, U28799, U28747, U88056, U28799, U28800, U88050, U88051, U88052, U88053, U88054, U88055, U28798, Y18263, X73873 y X66134. Las secuencias se alinearon con el programa MegaLign del paquete DNSTAR. Su año de aislamiento, especie huésped y localización geográfica se esquematizan en la Tabla 9.

3.3.8. Síntesis de péptidos y pepscan. Los péptidos p2 (82 IIHLPLSVTSVSAVASGHYLHRVTYRVT 109), p3 (110 CSTSFFGGQTIK 122), p4 (123 TILEAKLSRQEATDEASKDHEY 144), y p9 (58 RPAQLRCPHEFEDINKGLVSVPT 80) (Figura 3B) se sintetizaron en Clontech (Palo Alto, California). Los números corresponden a las posiciones amino terminales en la pG de VSHV 07.71 (Thiry et al., 1991b) incluyendo el péptido señal. El péptido amino-terminal añadido al frg#11 recombinante se denominó péptido poly-H (MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKD) y se sintetizó para uso como control ya que los intentos de cortarlo del frg#11 recombinante con enteroquinasa fueron infructuosos. La síntesis de péptidos de 15-mer con solapamiento de 5 aa a través de toda la secuencia de la pG (pepscan) (Thiry et al., 1991b) de VSHV 07.71 y las series de péptidos mutantes de la parte carboxi terminal del p2 (aa 93-107) se realizaron en Chiron (Chiron, Mimotopes, Victoria, Australia).

3.3.9. Ensayos de ligamiento de fosfolípidos en fase sólida. Se hizo utilizando dos fosfolípidos marcados con el mismo esqueleto de carbonos pero con distinta carga para aumentar la especificidad el ensayo. Los fosfolípidos marcados que se usaron fueron: 1 Ci/mmol, fosfatidil-[2-³H]-inositol 4,5 bisfosfato (PIPP) y fosfatidil [2-³H]-inositol (PI) (Amersham, Buckinghamshire, England). Se disolvieron en disolventes orgánicos, se secaron en tubos de vidrio, se mezclaron con tampón 150 mM fosfato-citrato a pH 5.6 (Gaudin et al., 1993) y se sonicaron a 4 °C 3 veces durante 1 min. Los fosfolípidos marcados en tampón fosfato-citrato pH 5.6 (100 µl/pocillo) se adicionaron a los pocillos de placas de 96 pocillos cubiertos con los péptidos del pepscan. Después de 4 h de incubación a 4 °C, las placas se lavaron 3 veces con agua destilada y se incubaron con 100 µl/pocillo de 2% SDS 50 mM etilenediamina pH 12 a 60 °C durante 30 min para extraer los fosfolípidos marcados. Los extractos se transfirieron a placas de 96 pocillos de polietileno-tereftalato (Wallac-Pharmacia) con 100 µl por pocillo de liquido de centelleo (LKB, Loughtrough, England), se mezclaron y se contaron con un contador 1450-Microbeta (Wallac, Turku, Finland & Pharmacia Iberica) (Estepa y Coll, 1996b).

4.1 ESTUDIOS COMPARATIVOS DE SECUENCIAS

4.1.1. Comparación de las regiones de la proteína G implicadas en fusión de distintos rabdovirus. Dado nuestro interés en la fusión de membranas y en la generación de mutantes de VSHV deficientes en fusión, los estudios de comparación de secuencia entre VSHV y otros rabdovirus se han centrado en las zonas de la pG de VSHV comprendida entre los aa 142-159 y 82-109 que se corresponde con el supuesto péptido de fusión y su dominio de interacción con fosfolípidos (péptido p2) (Estepa y Coll, 1996a) respectivamente. Además, se ha incluido el fragmento proteico recombinante denominado frg#11 (aa 56-110), que incluye las heptadas repetidas no canónicas (aa 68-99) de esta proteína (Coll, 1995b). Este fragmento está simétricamente flanqueado por 2 secuencias cortas que contienen 2 argininas cada una (aa 58-63 y aa 103-107) y por 2 puentes disulfuro. La zona carboxi terminal del frg#11 (p2) está unida al péptido de fusión definido por el alineamiento de Walker y por los mutantes de fusión identificados anteriormente en VSV (Shokralla, Chernish, y Ghosh, 1999) y en VSHV (Gaudin, DeKinkelin, y Benmansour, 1999). En resumen, la región que contiene todos estos dominios, aa 56 a 159, es la seleccionada para este estudio

Los estudios realizados han tomado como referencia la alineación de secuencias de pG de rabdovirus recientemente propuesto por Walker (Walker y Kongsuwan, 1999). Esta alineación propone una estructura consenso para la pG de 14 rabdovirus animales representativos de 4 géneros diferentes: *Vesiculovirus*, *Lyssavirus*, *Ephemerovirus* y *Novirhabdovirus*. En la figura 6 se muestra la comparación de secuencias de la pG de VSHV..

Como primera observación hay que señalar que existe una gran variación de secuencia de aa y de algunas características estructurales conservadas entre los distintos géneros de rabdovirus. Por ejemplo, la mayor parte del frg#11 aparece flanqueada por 2 cisteínas C altamente conservadas, las: C:I (C denominada I) y C:II o C:III. La C:I forma un puente disulfuro con la C:XII, que en el VSHV corresponde a C64-C315. Dependiendo del rabdovirus, la C:II o C:III, forman puentes disulfuro con la C:V, que en el VSHV corresponde a C110-C152 (Figura 6). La C:II está ausente en la mayoría de los Novirhabdovirus (rabdovirus de peces) y la C:III está ausente en los virus de la rabia.

El puente disulfuro C:III-C:V contiene los dominios de ligación de fosfolípidos con los péptidos de fusión en todos los rabdovirus excepto en el VR (en el VR el puente

disulfuro alternativo C:II-C:IV podría también reunir dichos dominios). Además, en todos los rabdovirus animales una G (G98 en VSHV) está altamente conservada 12 aa antes de la C:III. Otras G o P localizadas alrededor de posiciones similares en todos los rabdovirus pueden alinearse manualmente con las G74, P79 y P86 de VSHV. Es decir, los aa que pueden predecir la existencia de “codos” en la estructura de la región de los hipotéticos frg#11 están presentes en todos los rabdovirus.

Las heptadas hidrófobas repetidas no canónicas del frg#11 de VSHV localizadas con el programa PSEARCH y descritas con anterioridad (Coll, 1995a), no se encontraron en los hipotéticos frg#11 de otros rabdovirus. Sin embargo, muchos de sus aa hidrófobos correspondientes podían alinearse manualmente, demostrando que su presencia sí que estaba conservada. Los aa hidrófobos aumentaban en número hacia la parte carboxi-terminal del frg#11, especialmente en los últimos 14 aa, en los que al menos 8 posiciones contenían aa hidrófobos en todos los rabdovirus animales (Figura 6).

Por otra parte, las secuencias de aa de la C:I hacia el amino terminal contiene abundantes aa cargados negativamente (negativos/positivos 27/7) mientras que al otro lado del frg#11, de la C:II a la C:III, la secuencia de aa contiene una mayor abundancia de aa cargados positivamente (negativos/positivos 9/19), excepto en los virus de la rabia. Esta distribución de aa cargados está más equilibrada en el resto del frg#11 (antes de la C:I los aa negativos/positivos son 11/13 y en el resto del frg#11 son 29/30).

Las secuencias de aa que siguen al frg#11 (en VSHV, aa 111-141) muestran que la parte amino terminal (en VSHV, aa 111-127) es muy rica en aa hidrófobos mientras que el resto hasta el péptido de fusión contienen un elevado número de aa con carga positiva (26%) (Figura 7).

Los 17 aa del péptido de fusión tienen características homólogas en todos los rabdovirus (Figura 7). Por ejemplo, la P equivalente a la posición P148 en VSHV está presente en todos los géneros de rabdovirus, además la P150 y la C152 están en todos los rabdovirus excepto en VR. Otras posiciones conservadas en todos los rabdovirus son la 147 en que aparecen aa con anillos aromáticos tales como la F o Y y la 154 en que aparecen W o Y. Existe además un motivo conservado en la parte media de los 17 aa del péptido de fusión constituido por la secuencia (F,Y)PXPXXCX(W,F) (siendo X cualesquiera aa)

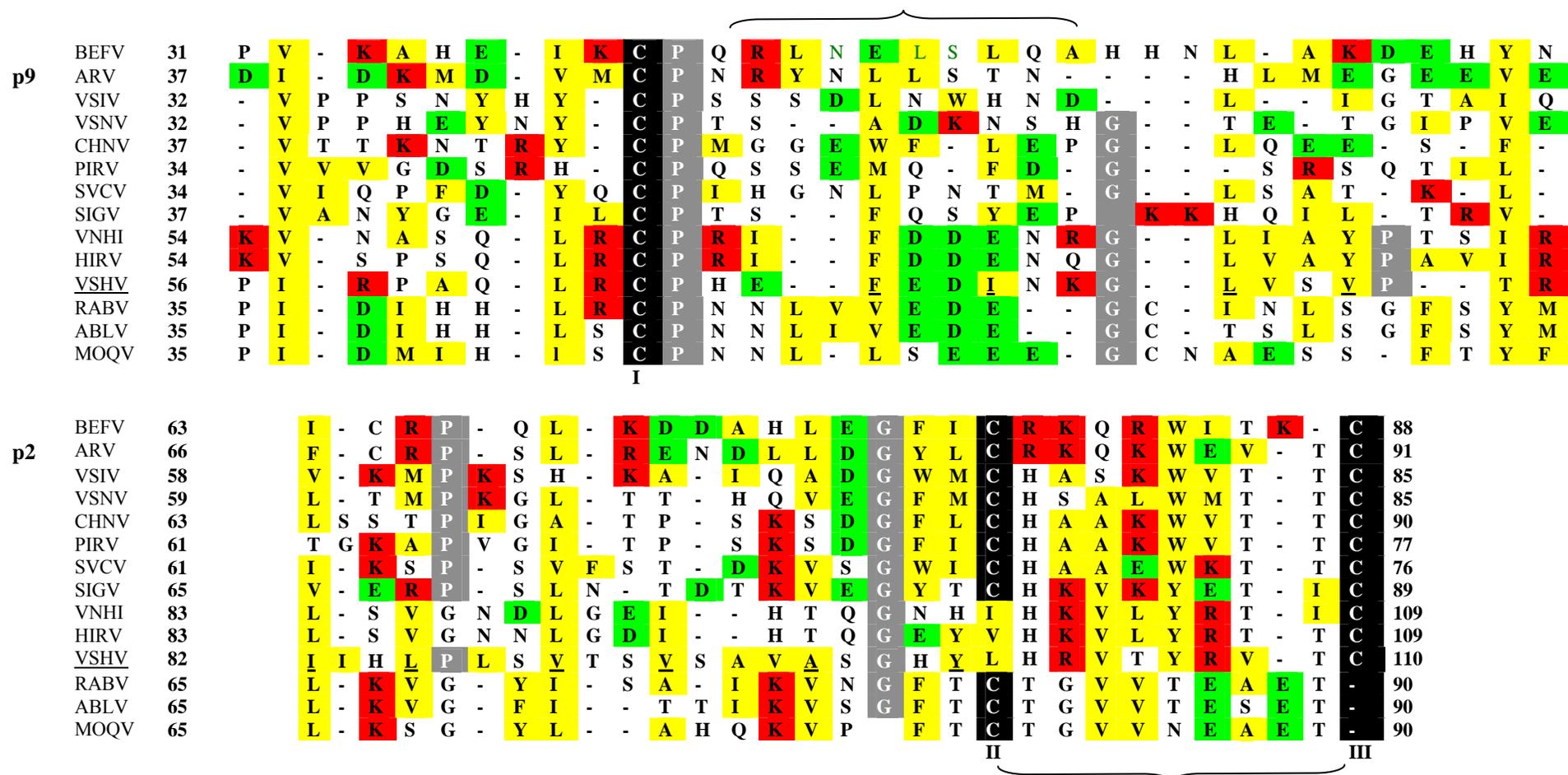


Figura 6. Alineamiento de las secuencias de aa deducidas de los cADN de 14 rabdovirus animales pertenecientes a 4 géneros en la región del frg#11 (p9+p2). Se ha seguido el último alineación propuesto (Walker y Kongsuwan, 1999) y después se optimizó manualmente para conseguir una máxima coincidencia entre los motivos estructurales basados en C (columnas negras), P o G (columnas grises). Los aa hidrófobos que forman heptadas repetidas en VSHV se han subrayado en VSHV. Los aa que tienen carga positiva están en rojo y los de carga negativa en verde. Los aa en amarillo son los más hidrófobos: F,Y,I,L,V,M,A y W. La posición del primer y el último aa en cada pG de cada rabdovirus se dan en la figura. Se han señalado las zonas en donde abundan las cargas positivas y negativas. Bovine ephemeral fever cepa BB7721 (BEFV), Adelaide River cepa DPP61 (ARV), vesicular stomatitis Indiana (VSIV) y New Jersey (VSNV), Chandipura cepa 16553514 (CHNV), viremia primaveral de la carpa (SVCV), sigma (SIGV), necrosis hematopoiética infecciosa cepa WRAC (VNHI), septicemia hemorrágica vírica (VSHV), hirame (HIRV), rabia cepa CVS (RABV), mokola (MOKV), lisavirus australiano cepa Ballina 960591 (ABLV).

4.1.2. Perfiles de hidrofiliidad/hidrofobicidad. Para confirmar las observaciones del estudio anterior, se realizó un estudio de hidrofiliidad/hidrofobicidad utilizando el programa ANTIGEN de PCGene con las secuencias de las Figuras 6 y 7. La Figura 8 (inferior) muestra el perfil de hidrofiliidad/hidrofobicidad de esta región en el VSHV. Del amino al carboxilo, pueden distinguirse los siguientes dominios: un primer dominio hidrófilo (aproximadamente aa 56-75), seguido por un dominio en el que la hidrofobicidad aumenta hasta la C110. A continuación hay otro dominio claramente hidrófobo (aa 110-120), seguido por un bucle hidrófilo (aa 120 al 140). Al final de la secuencia (aa 140 al 159) y correspondiéndose con el péptido de fusión, se encuentra otro dominio hidrófobo.

Para estudiar la posible presencia y conservación de estos dominios en otros rabdovirus, se llevó a cabo el correspondiente estudio de hidrofiliidad/hidrofobicidad en las secuencias estudiadas por Walker. La Figura 8 (superior) muestra la superposición de todos los perfiles obtenidos para posiciones análogas a las estudiadas en VSHV. A pesar de las variaciones de secuencias (Figura 6 y 7) se observan dominios muy similares a los encontrados para VSHV. Por ejemplo, la zona amino terminal comienza siendo hidrófila para ir convirtiéndose en hidrófoba hasta la C110 en el que se encuentra un pico de hidrofobicidad. Así mismo, también existe un pico altamente hidrófilo aproximadamente localizado en posiciones relativas al VSHV entre los aa 110 y 140, seguido por el dominio hidrófobo correspondiente a la localización del péptido de fusión donde se encuentra la C152 en VSHV.

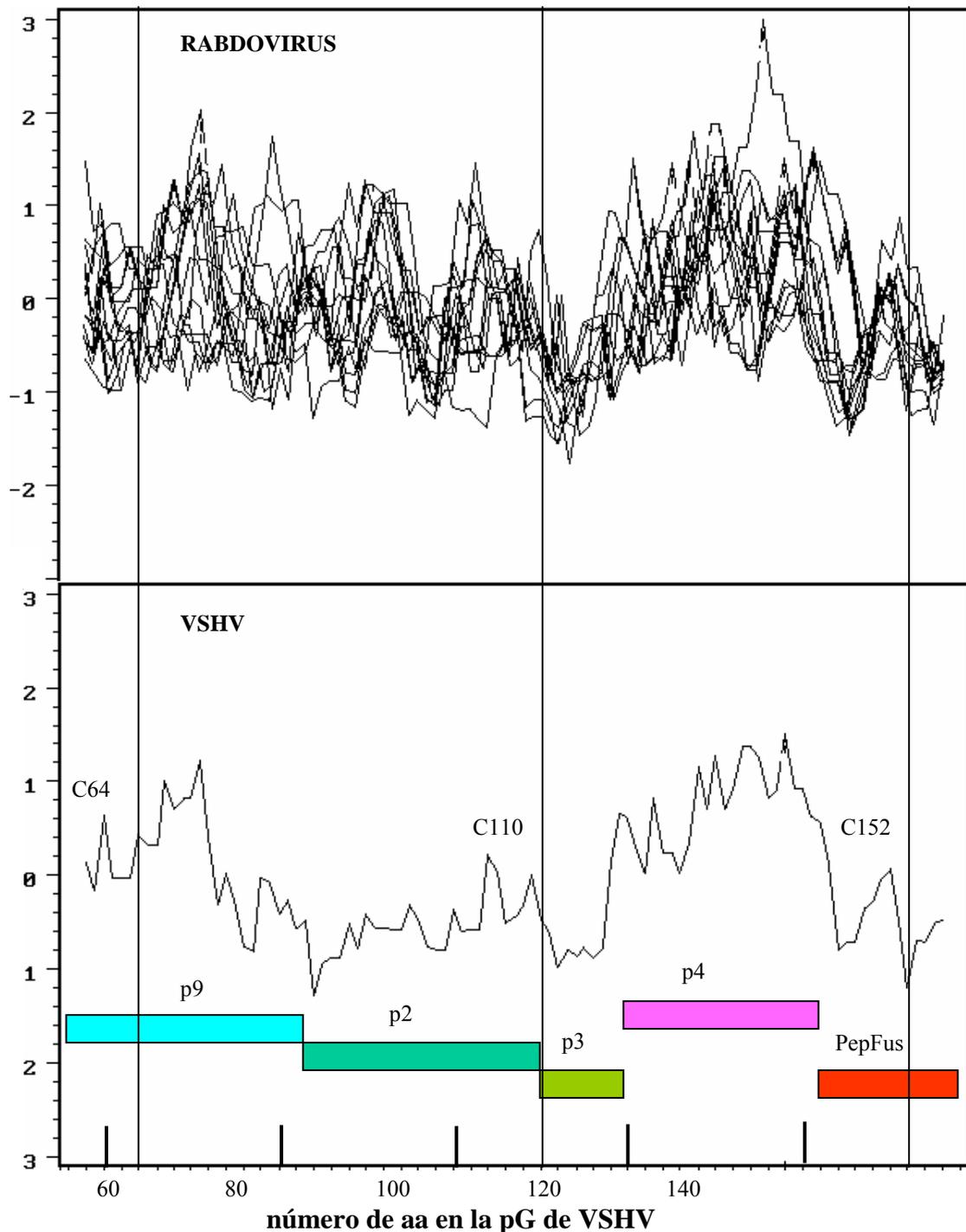


Figura 8. Comparación de perfiles de hidrofiliidad/hidrofobicidad de la región frg#11+péptido hipotético de fusión. Se obtuvieron los perfiles de hidrofiliidad (+, de 1 a 3)/hidrofobicidad (-, de 1 a 3), de las secuencias alineadas de Walker pertenecientes a la región frg#11+ péptido de fusión mediante el programa ANTIGEN del paquete de programas PCGene. Para hacer el perfil se eligió una ventana de 6 aa propuesta por defecto en el programa. Después se representaron gráficamente y se superpusieron con el programa Adobe Photoshop vs7 utilizando sus posiciones de aa relativas a las posiciones de VSHV

4.1.3. Comparación entre cepas de VSHV. Para estudiar la variación de aa en la región estudiada (dominio de ligamiento de fosfolípidos y péptido de fusión, aa 56-159) en VSHV, se recopilaron las secuencias de la pG totales o parciales procedentes de las 22 cepas de VSHV depositadas en el GenBank por varios autores (Tabla 5) y se alinearon con el programa Megalign (DNstar). Los resultados de la alineación se muestran en la Figura 9

La secuencia de la pG está muy conservada en esta región excepto las posiciones 81 (16 variaciones respecto al VSHV-07.71 de R a Q y K) y 136 (14 variaciones de D a N) localizadas en el frg#11 y en el bucle hidrófilo p4, respectivamente. A modo de resumen puede concluirse que existen 2 zonas con variaciones de secuencia entre cepas VSHV situadas alrededor del aa 81 y alrededor del 136, respectivamente. De 6 a 7 variaciones se encuentran en las posiciones 80, 97 y 139 y variaciones menores en las posiciones 71, 90, 112, 113, 118, 135, 138, y 152.

El cambio más importante encontrado es el de una W en vez de la C en posición 152, lo que sugiere que el puente disulfuro 110-152 no es absolutamente necesario para la estructura-función de la pG de VSHV. Una variación también importante es la posición 81 que está situada entre las P79 y P86 (la mitad del frg#11), donde el frg#11 podría tener uno o dos "codos". También resulta significativo el cambio S97N, ya que únicamente aparece en cepas de VSHV aisladas de platija japonesa (Tabla 5B) (Nishizawa et al., 2002), salmón coho (Tabla 5L, uno de los primeros aislados en especies marinas denominado Makah y Tabla 5O), arenque del pacífico (Tabla 5P,R y T) y bacalao (Tabla 5Q) (Benmansour et al., 1997).

Tabla 5 .
Descripción de los aislados de VSHV cuyas secuencias de pG están en el GenBank y que se estudian en la Figura 9.

<u>Nº acceso</u>	<u>Fig17</u>	<u>año</u>	<u>especie</u>	<u>Lugar</u>	<u>referencia</u>
A10182	A	1990	Trucha	Fr	(Renard y Thiry, 1990)
AB060725	B	2001	Platija	Ja	(Nishizawa et al., 2002)
AB060727	C	2001	Platija	Ja	(Nishizawa et al., 2002)
AF143862	D	2000	Arenque	In	(Betts y Stone, 2000)
AF345857	E	2001	Trucha	Di	(Winton, Ahrens, y Einer-Jensen, 2001)
AF345858	F	2001	Trucha	Di	(Winton, Ahrens, y Einer-Jensen, 2001)
AF345859	G	2001	Trucha	Di	(Winton, Ahrens, y Einer-Jensen, 2001)
AJ233396	H	1998	Trucha	Fr	(Xing et al., 1998)
NC000855	I	1999	Trucha	Al	(Schuetze, Egbert, y Mettenleiter, 1999)
U28799	J	1995	Trucha	Di	(Benmansour et al., 1997)
U28799	K	1997	Trucha	Fr	(Benmansour et al., 1997)
U28747	L	1988	Salmon	Wa	(Benmansour et al., 1997)
U88056	M	1995	Rodaballo	In	(Benmansour et al., 1997)
U28800	N	1995	Trucha	Fr	(Benmansour et al., 1997)
U88050	O	1991	Salmon	Wa	(Benmansour et al., 1997)
U88051	P	1993	Arenque	Bc	(Benmansour et al., 1997)
U88052	Q	1990	Bacalao	Wa	(Benmansour et al., 1997)
U88053	R	1993	Arenque	Wa	(Benmansour et al., 1997)
U88054	S	1998	Trucha	Fr	(Benmansour et al., 1997)
U88055	T	1993	Arenque	Wa	(Benmansour et al., 1997)
X73873	U	1990	Trucha	Fr	(Bernard et al., 1990)
X66134	V	1993	Trucha	Di	(Lorenzen et al., 1993)

Wa, Washington. Al, Alemania. Bc, British Columbia Canada. Fr, Francia. Di, Dinamarca. Es, Escocia. Ja, Japón. In, Inglaterra.

4.1.4. Selección de segmentos en la región aa 56-144 de la proteína G para su estudio. Para estudiar la posible relación con la fusión de VSHV, 4 segmentos proteicos comprendidos entre los aa 56-144 se obtuvieron por síntesis química. Los 4 péptidos sintéticos seleccionados y localizados alrededor del dominio de ligamiento de fosfolípidos (p2, aa 82-109), y en las zonas de los perfiles de hidrofiliidad/hidrofobicidad (Figura 8), excluyendo el péptido de fusión (aa 142-159), de muy difícil síntesis por su alta hidrofobicidad. Junto con p2, los segmentos seleccionados fueron el p9 (aa 58-80), p3 (aa 110-122), p4 (aa 123-144) y frg#11 (p9+p2, frg#11 aa 56-110) (Figuras 4A, 4B).

El p2, moderadamente hidrófobo, se ha seleccionado dado que estudios en anteriores este péptido se identificó como el principal dominio de unión a fosfatidilserina en toda la pG de VSHV. Contiene varias heptadas repetidas y una cabeza carboxi terminal en la que se encuentran 2 R. El péptido p9 con una parte hidrófila y otra moderadamente hidrófoba, va desde la posición 56 al comienzo del p2 y contiene el resto de heptadas repetidas de esta región amino terminal de la pG, así como

un cabeza amino terminal con 2R simétrica a la de p2. El frg#11 se diseñó uniendo p9+p2, contiene 5 heptadas repetidas y esta flanqueado por los puentes de disulfuro C64-C315 y C110-C152 (Einer-Jensen et al., 1998).

Después del p2, el pico hidrófobo p3 contiene una secuencia de 12 aa, 11 de los cuales están totalmente conservados entre los rbdovirus de peces de agua fría (VSHV, VNHI y HIRV) (Walker y Kongsuwan, 1999). El péptido p4 va desde el final del p3 hasta el comienzo del hipotético péptido de fusión (aa 142) y contiene abundantes aa hidrófilos y uno de los sitios (K140) que aparece cambiado en los mutantes resistentes a la neutralización con el AcM C10 (Bearzotti et al., 1995; Gaudin, DeKinkelin, y Benmansour, 1999).

Con los péptidos seleccionados se han estudiado una serie de propiedades relacionadas con el ligamiento de fosfolípidos y la fusión a pH neutro y a pH 5.6 (pH bajo).

4.1.5. Selección de mutantes para su estudio. Una vez estudiadas las secuencias de la región de la pG de VSHV y seleccionados los segmentos, se analizaron las posibles mutaciones a introducir tanto en el dominio p2 de ligamiento de fosfolípidos (ensayo de ligamiento de PS marcada en fase sólida) (Estepa y Coll, 1996b) como en los restantes segmentos y en el péptido de fusión (ensayos de fusión de células transfectadas con plásmidos mutados en la pG)(Figura 9).

Como un primer criterio para seleccionar mutantes, las posiciones 71, 80, 81, 90, 97, 112, 113, 118, 135, 136, 138, 139 y 157 que demostraban variación entre aislados, se interpretaron como posiciones que admiten mutantes sin afectar a la función de la región estudiada y por lo tanto no se incluyeron para hacer el estudio de mutantes en la pG. Se hizo excepción de la posición 97 perteneciente al p2, introduciendo el mutante S97N presente en un 27 % de los aislados de VSHV y en un 60 % de los aislados de peces marinos y el T135E presente en un aislado y que aparecía relacionado con la fusión (ver después). Las C tampoco se mutaron.

Debido a que las P65, P79, P86 y G98 estaban conservadas y a que formaban "codos" según indicaban los modelos construidos por ordenador (Programa DTMM, Desk Top Molecular Modeler, vs 3, Oxford University Press, 1994), se eligieron estas posiciones para su mutación a un aa que no impusiera ninguna restricción estructural tal como es el caso de la A.

Ya que tanto las cabezas polares de 2 R (posiciones 103 y 107) como las posiciones de las heptadas hidrófobas repetidas del frg#11, I82, L85, A96, H99, estaban totalmente conservadas, también se incluyeron entre las posiciones a mutar. Las mutaciones se han efectuado a un aa no cargado como la A o a uno no hidrófobo como la S.

En la región del p3 se eligió la posición 115 para realizar una mutación (mutante F115K) por ser una de las 3 posiciones más hidrófobas y más conservadas en todos los rabdovirus (Figura 7). En el dominio p4 se eligió la T135E, debido a que era una de las posiciones con homología a un péptido activador de la infectividad del VSHV y a que el mecanismo de acción de dicho péptido está relacionado con la fusión (Mas et al., 2002). En el péptido de fusión, se eligieron aquellas mutaciones que en VSV habían resultado en mutantes deficientes en fusión (Jeetendra et al., 2002; Li et al., 1993; Shokralla et al., 1998; Whitt et al., 1990; Zhang y Ghosh, 1994) y que estaban localizadas alrededor del motivo conservado (F,Y)PXPXXCX(W,F) (posiciones F147, P148 y W154) (Figura 7).

4.2. PROPIEDADES DE LA REGIÓN 56-144

4.2.1. Interacción de péptidos de un pepscan de la proteína G con fosfolípidos marcados. Con objeto de investigar el ligamiento de fosfolípidos aniónicos por los péptidos de la pG y en concreto por los de la regiones definidas por los p9, p2, p3, p4 y frg#11, se recubrieron los pocillos de placas de 96 pocillos con los péptidos de 15-mer procedentes de toda la secuencia de la pG de VSHV (pepscan). Después se añadieron los fosfolípidos marcados fosfatidilinositol bisfosfato (PIPP, fosfolípido aniónico) y fosfatidilinositol (PI, fosfolípido con el mismo esqueleto de carbonos que el PIPP pero sin carga, utilizado como el mejor control para el ligamiento de PIPP). El ligamiento máximo de PIPP (10-14 veces el fondo) se encontró en los péptidos 83-113 (correspondientes al p2). Ligamientos menores (4-6 veces el fondo) se encontraron en los péptidos 109-133 (que incluye el p3) y 149-173 (que incluye la mayoría del péptido de fusión hipotético) (Figura 10A). Los péptidos del pepscan correspondientes a p9 y p4 no interaccionan con el PIPP. Péptidos del pepscan situados también en otras regiones de la pG fuera de la región estudiada en este trabajo interaccionaban con el PIPP (por ejemplo los de la región alrededor del aa 230). Muy poco marcaje permanecía ligado a los pocillos cuando se empleó el PI (Figura 10B).

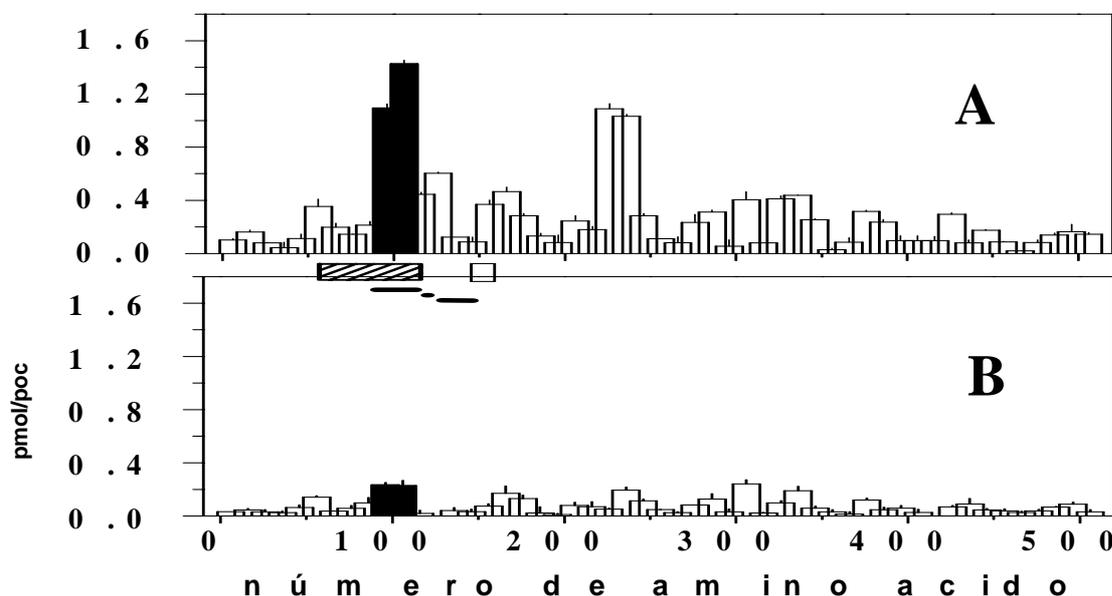


Figura 10.- Ligamiento de PIPP (A) y PI (B) a péptidos 15-mer del pepscan de pG en fase sólida. Vesículas sonicadas de 10 pmoles/pocillo de fosfatidil inositol bisfosfato (PIPP) (A) o fosfatidil inositol (PI) (B) en 0.15 M fosfato-citrato a pH 5.6, se añadieron a pocillos tapizados con 3 nmoles/pocillo de péptidos 15-mer del pepscan de pG. Después de incubar y lavar las placas se contaron. Se representan las medias y sus desviaciones estándar de duplicados. A pH 7.6 se obtuvieron resultados similares. !, péptidos que ligan mayoritariamente PIPP, aa 83-113 correspondientes a la parte p2 del frg#11 (aa 56-110) (barra rallada horizontal). Barras horizontales negras, localización de p2, p3 y p4. Barra horizontal blanca, péptido de fusión

4.2.2. Inducción de sincitios por frg#11. Cuando el frg#11 o el p2 se añadieron a las monocapas celulares a pH 6 se observó un aumento de la superficie de las células de 2-3 veces (Figura 11A). A pH 6 la adición de medio de fusión, p2 (200 µg/ml) o frg#11 (200 µg/ml) indujo un aumento de superficie en el 3.4 ± 0.2 , 33.0 ± 1.0 o 36.7 ± 2.4 % (n=2) de las células de una monocapa de EPC, respectivamente. La adición de p9, p3, p4 o poly-H a pH 6 o del frg#11 a pH 7.6 a las monocapas de EPC, sin embargo, no produjo aumento en la superficie de las células (datos no mostrados).

En los mismos experimentos sólo cuando se añadió frg#11 a pH 6 (Figura 11C) aparecieron sincitios de 3-6 núcleos por sincitio. El porcentaje de núcleos en sincitios aumentó del 5 al 10 % cuando se añadieron 50 a 200 µg de frg#11 por ml (Figura 11E). La adición de p2, p3, p4 o poly-H causaba la formación de poco más de un 2% de núcleos en sincitios (Figura 11E y resultados no mostrados).

Puesto que se requerían ~ 10 µg de VSHV (conteniendo ~ 1 µg de pG) por ml para obtener un número de núcleos en sincitios similar a los 200 µg por ml de frg#11 (datos no mostrados), el frg#11 era ~ 200 veces menos activo que la pG en la inducción de fusión. Ahora bien, esta concentración puede estar subestimada ya que el frg#11 tiene tendencia a formar precipitados a pH 6, tal y como se podía comprobar observando la existencia de dichos precipitados cubriendo las monocapas de EPC. Dichos agregados no son probablemente capaces de causar la formación de sincitios, debiéndose atribuir dicho efecto a la parte más hidrófila del frg#11. Puesto que solo un 15-30 % del frg#11 permanece en solución en tampón fosfato-citrato a pH 6, la concentración de frg#11 activa en la formación de sincitios es probablemente 3-4 veces menor que la concentración de 200 µg por ml añadida para formarlos.

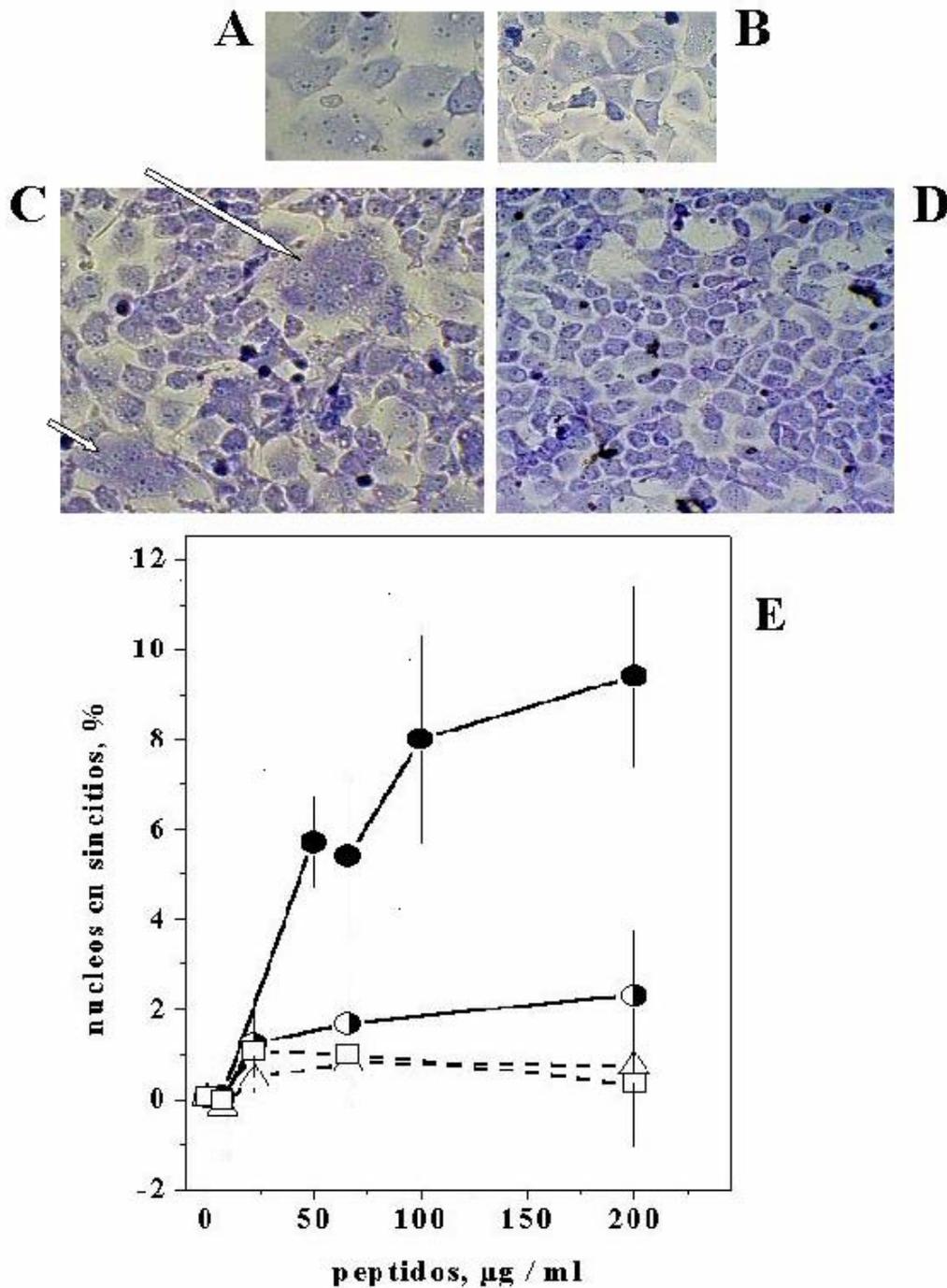


Figura 11. Microfotografías del ensanchamiento celular (A,B) y formación de sincitios (C,D) en monocapas EPC después de la adición de frg#11 y dependencia de la formación de sincitios con la concentración de frg#11 (E). Las monocapas EPC se trataron con 20 µg de frg#11 por ml durante 30 min a pH 6 y 14°C. Después las monocapas se fijaron y se tiñeron con Giemsa. **A**, EPC tratadas con frg#11. **B**, EPC control. **C**, EPC tratadas con frg#11 enseñando los sincitios (flechas). **D**, EPC control. **E**, Los péptidos se añadieron a las monocapas EPC en placas de 24 pocillos y se incubaron 30 min a pH 6 y 14°C. Después las monocapas se lavaron con medio a pH 7.6 y se incubaron 2 h más. Se fijaron y se tiñeron con Giemsa. Los números de núcleos en sincitios de 3 o más núcleos por sincitio se contaron entre 400 núcleos por pocillo. Los resultados se expresaron como porcentaje de núcleos en sincitios según la fórmula, número de núcleos en sincitios / número total de núcleos x 100. Se representan las medias y las desviaciones estándar de 3 experimentos

4.2.3. Conformaciones del frg#11 dependientes del pH. La interacción entre moléculas de frg#11 se detectó por su tendencia a la precipitación cuando se dializaba frente a 0.15 M fosfato-citrato pH 7.6. Concentraciones máximas de 50, 180, 260 o más de 1000 μg de frg#11 soluble por ml se obtuvieron ajustando el pH a 7.6, 6, 5.6 o 4, respectivamente a una solución de 2 mg/ml de frg#11. El resto del frg#11 se recuperaba en agregados separables del frg#11 soluble por centrifugación a 2000 g 10 min. Solo un pequeño porcentaje de los agregados estaban unidos por puentes disulfuro tal y como se demostró por densitometría de las bandas de frg#11 separadas por SDS-PAGE al 15% y en ausencia de β -mercaptoetanol. En estas condiciones, la mayoría (94.2%) del frg#11 estaba en forma monomérica, apareciendo el resto como dímeros (2.7%), trímeros (1.9%) y otros agregados de más alto peso molecular (1.1%). Composiciones muy similares se obtuvieron cuando los agregados se formaron durante 2 h a pH 4, 6 o 7.6 antes de someterlos al SDS-PAGE. Una única banda se obtuvo por SDS-PAGE en presencia de β -mercaptoetanol incluso cuando se sometió el frg#11 a electroforesis a concentraciones más elevadas (50 μg frg#11 por pocillo de 20 μl , n=12) (datos no mostrados).

Puesto que sólo un pico de A280 nm y en la misma posición se obtenía al separar el frg#11 por cromatografía de exclusión en Sefadex en ausencia o en presencia de 0.14 M β -mercaptoetanol a pH 4, esta cromatografía se usó para purificar el frg#11 de otros componentes de mayor peso molecular.

4.2.4. Inhibición de la fusión inducida por pH ácido entre células transfectadas con la proteína G con anticuerpos anti-pG y anti-péptidos sintéticos localizados en su dominio de unión a fosfolípidos. Partiendo del dato de que en células transfectadas con pG aparecen un 25% de núcleos en sincitio cuando se induce la fusión a pH 6, se estudió el efecto de 8 anticuerpos anti-pG y anti-péptidos sintéticos sobre la fusión. Antes de realizar los experimentos de fusión se estudió la interacción de los Acs con la pG en ensayos en fase sólida a pH 7.6 y 6. Todos los Acs utilizados reconocían la pG a ambos pH, sin embargo a pH 6 los Acs anti-frg#11 o anti-p2 reconocían sus epítopos correspondientes, 5 y 2 veces, respectivamente, más que los anti-p3 o anti-p4 los suyos. En las mismas condiciones los AcM neutralizantes C10 y 3F1A12 reconocían igualmente la pG a ambos pHs. El ligamiento de los Acs a sus correspondientes péptidos sintéticos en fase sólida fue independiente del pH (resultados no mostrados). A

las mismas condiciones a las que los Acs anti-segmentos se ligaban a la pG en fase sólida, el porcentaje de sincitios obtenidos en presencia de Acs anti-frg#11 (aa 56-110), se reduce más de 4 veces comparado con el número de sincitios en ausencia de Acs (del 100 al ~ 25%). Resultados muy similares se obtuvieron con los Acs anti-p2 y anti-p4. Los Acs anti-p3 (Figura 12) o Acs irrelevantes (AcM anti-N 2C9, que reconoce la nucleoproteína del VSHV) no fueron capaces de alterar el número de núcleos en sincitios.

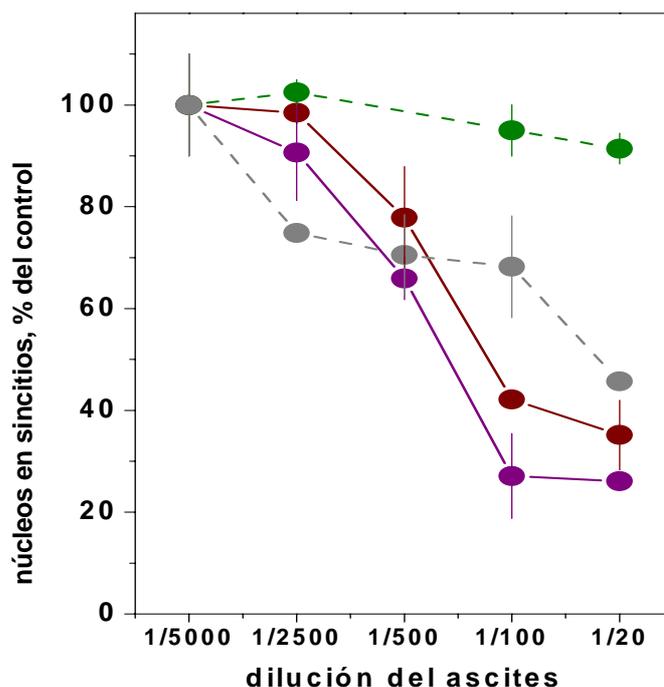


Figura 12. Inhibición por anticuerpos de la formación de sincitios en células transfectadas con pG. Las monocapas de células EPC en placas de 24 pocillos se transfectaron con 0.6 μ g de G3-pcDNAI/Amp con fugene. Al día siguiente las monocapas se incubaron 30 min a pH 6 en presencia de los ascitis, se lavaron y después de 2 h se fijaron y se tiñeron con Giemsa. El porcentaje de núcleos en sincitios en ausencia de Ac fue del 25.3 ± 6.2 % (n=3). Los resultados se expresan en % del control siguiendo la formula: número de núcleos en sincitios en presencia de Ac / número de núcleos en ausencia de Ac x 100. Se representan medias y desviaciones estándar de 2 experimentos excepto de 6 experimentos para el anti-frg#11. ●, anti-frg#11; ●, anti-p2; ●, anti-p3; ●, anti-p4

4.2.5. Respuesta inmunológica de las truchas al dominio del frg#11. La respuesta inmunológica de la trucha al dominio del frg#11 se comparó con la respuesta a G4, una forma recombinante de la pG de VSHV. Para ello se utilizaron sueros de trucha inmunizada con VSHV y G4 (trucha 1) y las placas de ELISA se recubrieron con 2 μ g por pocillo de G4 (aa 9-443) o de frg#11 (aa 56-110). Después de optimizar las cantidades de frg#11 para una máxima absorbancia y un fondo mínimo con Acs anti-VSHV, se ensayaron sueros de trucha individuales de distintos títulos de neutralización. Sueros

procedentes de las truchas inmunizadas por inyección con VSHV+G4 en adyuvante de Freund con los títulos más bajos de neutralización (~100) mostraron los valores más altos de absorbancia (0.6-0.8 unidades). Sueros procedentes de truchas inmunizadas por inyección con VSHV + saponina con títulos de neutralización de ~ 2000 (Figura 13A) y ~ 100.000 (no mostrados), mostraron valores de absorbancia menores (~ 0.2 unidades). Por el contrario, sueros procedentes de truchas control no inmunizadas mostraron valores de absorbancia de solo 0.02 unidades (valores de fondo). Por lo tanto, los sueros procedentes de truchas con los títulos más altos de neutralización (epítomos conformacionales) mostraban las respuestas más bajas al dominio frg#11 confirmando resultados publicados anteriormente con la G4 (Fernandez-Alonso et al., 1999b).

Para comparar la respuesta inmunológica de la trucha obtenida por la reactividad de sus sueros frente a G4 y frg#11, se utilizaron 46 sueros individuales procedentes de truchas inmunizadas con un plásmido codificando pG de VSHV. La mayoría de los sueros mostraron una respuesta al frg#11 (0.61 ± 0.32) mayor que a G4 (0.38 ± 0.35) (Figura 13B), probablemente debido a la mayor cantidad de frg#11 que es posible depositar en los pocillos por su menor tamaño molecular y su mayor pureza comparados con G4. Además la Tabla 6 muestra que en contraste con las absorbancias de fondo obtenidas con los sueros control procedentes de truchas no inyectadas o inyectadas con otro plásmido (1.1 ± 0.5 , n=15 o 0.8 ± 0.2 , n=12, respectivamente), los valores obtenidos con sueros procedentes de truchas supervivientes a la infección de VSHV, inmunizadas con VSHV o inmunizadas con plásmidos codificando la pG, fueron de: 1.9 ± 0.99 (n=10), 4.0 ± 2.7 (n=8) o 2.2 ± 0.4 (n=24), respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que la respuesta de Acs de la trucha a la pG de VSHV, incluye Acs anti-frg#11.

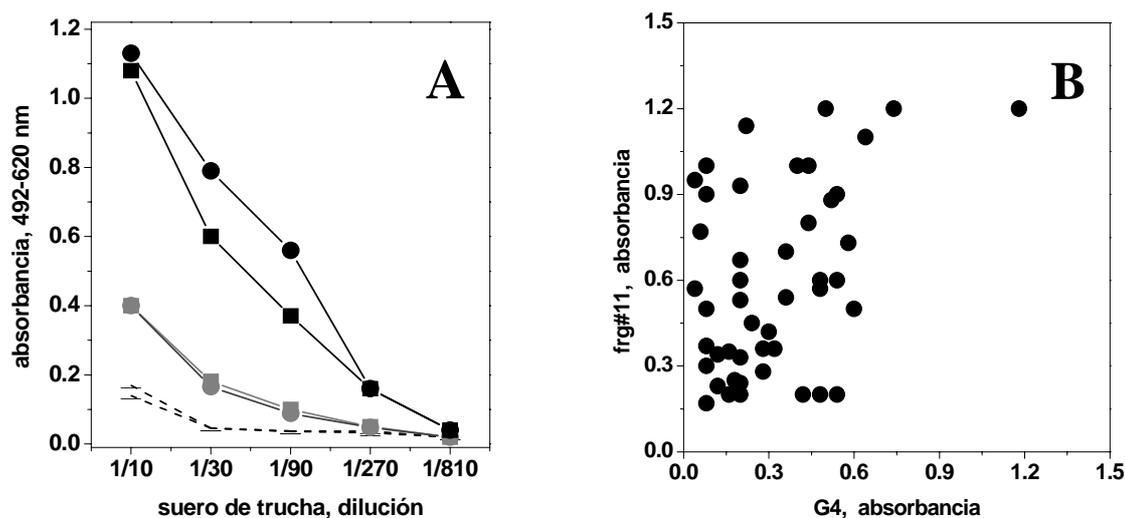


Figura 13.- Titulación de sueros de trucha sobre fase sólida recubierta de frg#11 (A) y relación entre valores de absorbancia de varios sueros de trucha inmunizada con VSHV y fases sólidas recubiertas con frg#11 o G4. A) Se utilizaron 2 μ g de frg#11 por pocillo. !., sueros procedentes de truchas con títulos de neutralización de \sim 100. !., sueros procedentes de truchas con títulos de neutralización de \sim 2000. -----, sueros de truchas sanas no inmunizadas. B) Los sueros se obtuvieron de 46 truchas inmunizadas con G3-pcDNAI/Amp. Los sueros se ensayaron de 3 en 3 diluciones desde 1/10 a 1/270. Para la comparación se escogieron los datos a 1/30 ya que la mayoría de las absorbancias estaban distribuidas entre 0.3 y 1.2 unidades de absorbancia. Datos reevaluados de experiencias anteriores (Fernandez-Alonso, 2000).

Tabla 6.

Presencia de anticuerpos anti-frg#11 en sueros de truchas inmunizadas contra VSHV

<u>Truchas</u>	<u>Absorbancia relativa</u>
Inyectadas con VSHV	4.0 \pm 2.7 (8)
Supervivientes a la infección con VSHV	1.9 \pm 0.9 (10)
Inmersión en G3-pcDNAI/Amp	2.2 \pm 0.4 (24)
Inyección con pcDNAI/Amp	0.8 \pm 0.2 (12)
No inyectadas	1.1 \pm 0.51 (15)

Para estimar la presencia de Acs anti-frg#11, se utilizó la técnica ELISA en pocillos recubiertos con 2 μ g de frg#11 por pocillo. Las absorbancias se obtuvieron con diferentes diluciones de los sueros de trucha, eligiendo la dilución a 1/30 como la mejor para comparar los resultados obtenidos ya que la mayoría de los valores estaban entre 0.3 y 1.2. Los resultados se han expresado en absorbancias relativas a la absorbancia obtenida con una mezcla de los 15 sueros procedentes de truchas no inyectadas, de acuerdo con la fórmula, absorbancia obtenida con cada suero / absorbancia obtenida con la mezcla de sueros de trucha no inyectados. Se dan las medias y las desviaciones estándar de los valores correspondientes a los distintos sueros analizados individualmente por duplicado. El número en paréntesis es el número de truchas analizadas. Los números en negrita corresponden a medias significativamente diferentes del valor de la mezcla de sueros no inyectados:

1.0 ± 0.2 ($p < 0.05$, asumiendo una distribución normal calculada según el test de 2 poblaciones de OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

4.3. PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO DE FUSIÓN EN CÉLULAS EPC.

4.3.1. Agentes de transfección y concentración óptima de plásmido. Se realizaron experimentos de transfección utilizando células EPC de carpa, como modelo para estudiar: las variables que afectan a la entrada de plásmidos en células de pez, la dependencia de la concentración de plásmido, tiempo de exposición al agente de transfección, distintos agentes de transfección, etc. El uso del pCMV β codificando el gen de la β galactosidasa (β gal) y de un sustrato quimioluminiscente para la detección de la β gal con alta sensibilidad, facilitó la cuantificación de los resultados.

Las Tablas 7 y 8 muestran que entre todos los tratamientos y agentes de transfección comerciales de nueva generación ensayados, con fugene se obtuvo la mayor eficiencia de transfección, confirmando anteriores estudios (López et al., 2001). La eficiencia de transfección obtenida con fugene fue 30.1 ± 6.7 células teñidas con Xgal, $n=2$, mientras que los otros agentes comerciales de transfección tales como la lipofectamina (7.6 ± 0.1 células teñidas con Xgal, $n=2$), el GeneJuice (19.0 ± 6.1 células teñidas con Xgal, $n=2$) o el Superfect (16.9 ± 3.2 células teñidas con Xgal, $n=2$), no llegaron a dichas eficiencias. Con otros 5 agentes de transfección comerciales (Tabla 8), no se obtuvieron mayores eficiencias de transfección. Por ello, los experimentos que siguieron se realizaron con fugene como reactivo de transfección. La presencia de 0.5 mM Ca^{++} antes o durante la transfección, aunque aumentaba 1.2 veces la eficiencia de transfección, también aumentaba el fondo. Con otros tratamientos tales como Chariot, polilisina, péptidos transfectantes, sonicación o electroporación, se obtuvieron eficiencias de transfección muy bajas.

La “transfección óptima” se obtuvo cuando se transfectaron las células EPC con una relación de concentración fugene/pCMV β de 3.3 (μl de fugene/ μg de pCMV β), disminuyendo cuando se usaron relaciones mayores o menores, confirmando resultados anteriores (López et al., 2001). Sin embargo la variación de expresión de β gal a lo largo de los diferentes experimentos mostró un coeficiente de variación (CV) del 54.1 %. La actividad β gal fue óptima con $0.6 \mu\text{g}$ de pCMV β por pocillo de placas de 24 pocillos con $400 \mu\text{l}$ de medio.

Tabla 7

.Listado de los procedimientos ensayados para aumentar la eficiencia de transfección.

<u>Procedimiento transfección</u>	<u>Variables</u>		<u>Óptimo</u>	<u>Expresión βgal:</u>		
	<u>Ensayadas, rango</u>			<u>Nº veces fondo</u>	<u>% relativo Fugene</u>	<u>n</u>
Fugene	1-4	μl/poc	2	1000.0 \pm 21	100.0 \pm 20	15
Chariot*** + NLS*****	0-10	μ g/poc	4	3.9 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1	1
Chariot + Polilisina	0-400	μ g/poc	20	33.0 \pm 13	8.5 \pm 2	4
Polilisina	0-400	μ g/poc	20	18.0 \pm 1	4.3 \pm 2	2
Péptido p21**	0-40	μ g/poc	20	1.4 \pm 0.4	0.2 \pm 0.1	1
Péptido p22	0-40	μ g/poc	20	1.0 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	1
Fugene+ Ca posterior	0.2-20	mM	0.5	510.2 \pm 26	129.9 \pm 85	6
Fugene+ Ca anterior	0.2-20	mM	0.5	307.9 \pm 94	127.0 \pm 28	3
Sonicación*	5-15	”	15	2.3 \pm 0.1	3.3 \pm 4	2
Sonicación + Fugene	5-15	”	15	36.2 \pm 34	78.2 \pm 34	5
Electroporación	0-960	μ F	500	3.2 \pm 0.3	1.0 \pm 0.2	1
Electroporación +NLS	0-960	μ F	500	4.5 \pm 0.2	14.1 \pm 0.2	1

Todos los experimentos se realizaron con el plásmido pCMV β a 0.6 μ g/poc (1.5 μ g/mL). Numero (Nº) de veces el fondo = cps de cada procedimiento/ cps de células sin transfectar (fondo). % relativo Fugene = cps de cada procedimiento/ cps tratado con fugene x 100. N = nº de experimentos; cada experimento por duplicado. Para la electroporación se usó un aparato BioRad. + Ca, adición de calcio posterior y anterior, se refiere a tratamiento con Ca antes o después de la transfección (sobre el ADN o sobre las células, respectivamente). En negritas se subrayan los resultados significativamente diferentes.

*Sonicación 2 pulsos de duración 5-10” y amplitud 20-40%.

**Péptido 21 es el péptido transfectante MEG: GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPkskrkv (Morris et al., 1999) y el péptido 22 es el péptido diseñado con secuencias del frg#11 y la parte carboxilo terminal del péptido MEG con la secuencia: LSVTSVSAVASGHYLRVTVTSQPkskrkv

***Chariot (agente transfectante de proteínas de Active Motif, Rixensart, Bélgica): 2 μ l/poc

****NLS, nuclear localization peptide: CGGPKKKRKVG (Liang, Alestrom, y Collas, 2000). Se utilizó a 4 μ g/ μ g ADN.

Tabla 8.

Eficiencias de transfección con agentes de transfección comerciales de última generación

<u>Procedimiento</u>	<u>Origen</u>	<u>Nº veces el fondo</u>	<u>% relativo al fugene</u>	<u>%, Xgal</u>	<u>N</u>
Fugene	Roche	726.0 ± 339.6	100.0	30.1 ± 6.7	2
Lipofectamina	GibcoBRL	77.4 ± 9.6	12.3 ± 7.1	7.6 ± 0.1	2
Lipofectamina2000	InVitroGen	48.5 ± 23.8	6.6 ± 0.2	1.8 ± 1.1	2
GeneJuice	Novagen	554.8 ± 216.3	67.4 ± 8.1	19.0 ± 6.1	2
GenePorter	GTS	4.7 ± 3.4	0.6 ± 0.1	1.6 ± 0.4	2
GeneJammer	Stratagene	26.5 ± 4.9	3.9 ± 1.1	3.1 ± 1.4	2
LipoTaxi	Stratagene	15.5 ± 4.3	2.5 ± 1.7	0.8 ± 0.8	2
Efectene	Qiagen	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	1
Superfect	Qiagen	827.5 ± 130.8	160.1 ± 14.1	16.9 ± 3.2	1

Se utilizó para estos experimentos el pMCV1.4βgal. Roche (Barcelona, España), GibcoBRL (Barcelona, España), InVitroGen (Barcelona, España), Novagen (Madison, WI, US), Stratagene (LaJolla, CA, US), GTS (S.Diego, CA, US), Qiagen (Hilden, Germany). Los resultados se dan en medias ± desviación estándar de 2 experimentos. En negritas se subrayan los resultados significativamente diferentes del fondo.

4.3.2. Transfección a varias concentraciones celulares y tiempos. El porcentaje máximo de células transfectadas que expresaban βgal se obtuvo cuando se sembraron 500.000 células por ml (Figura 14A). Concentraciones celulares más altas disminuía 3-4 veces el porcentaje de células transfectadas, mientras que con concentraciones menores no se obtenían células transfectadas. Los resultados fueron similares cuando la eficiencia de transfección se estimó por luminiscencia (máximo de 17×10^6 cps). En las mismas condiciones, las estimaciones de la duración del ciclo celular de las células EPC fueron de 24 h a concentraciones celulares iniciales entre 300.000 y 800.000 células /ml. Además se comprobó que la duración del ciclo celular disminuía a concentraciones celulares mayores o menores (resultados no mostrados), por lo que, estos resultados sugieren que las células EPC se transfectan mejor cuanto más activas están en división. Por otra parte, el estrecho

rango de las concentraciones celulares a las que la transfección resultó óptima, resalta la dificultad de reproducir las eficiencias de transfección.

Para confirmar y definir el momento óptimo de la transfección con relación a la edad de la monocapa de EPC, se adicionaron los complejos ADN-fugene a distintos tiempos después de iniciar el cultivo y se analizaron los resultados a las 52 h. Las monocapas de EPC mantenidas en presencia de los complejos ADN-fugene en las últimas 24 h (tiempo 20 h en la Figura 14B), mostraron la máxima eficiencia de ~ 17 % de las células teñidas con Xgal, mientras que más o menos tiempo en presencia del complejo ADN-fugene mostraron <13 % de las células teñidas por Xgal.

En monocapas de EPC de 24 h, el máximo número de células teñidas con Xgal aparecía 24 h después de la transfección, disminuyendo a la mitad a las 48 h y a niveles de fondo a las 70 h. A las 10 h ya se podía detectar un 2 % de células teñidas (resultados no mostrados)

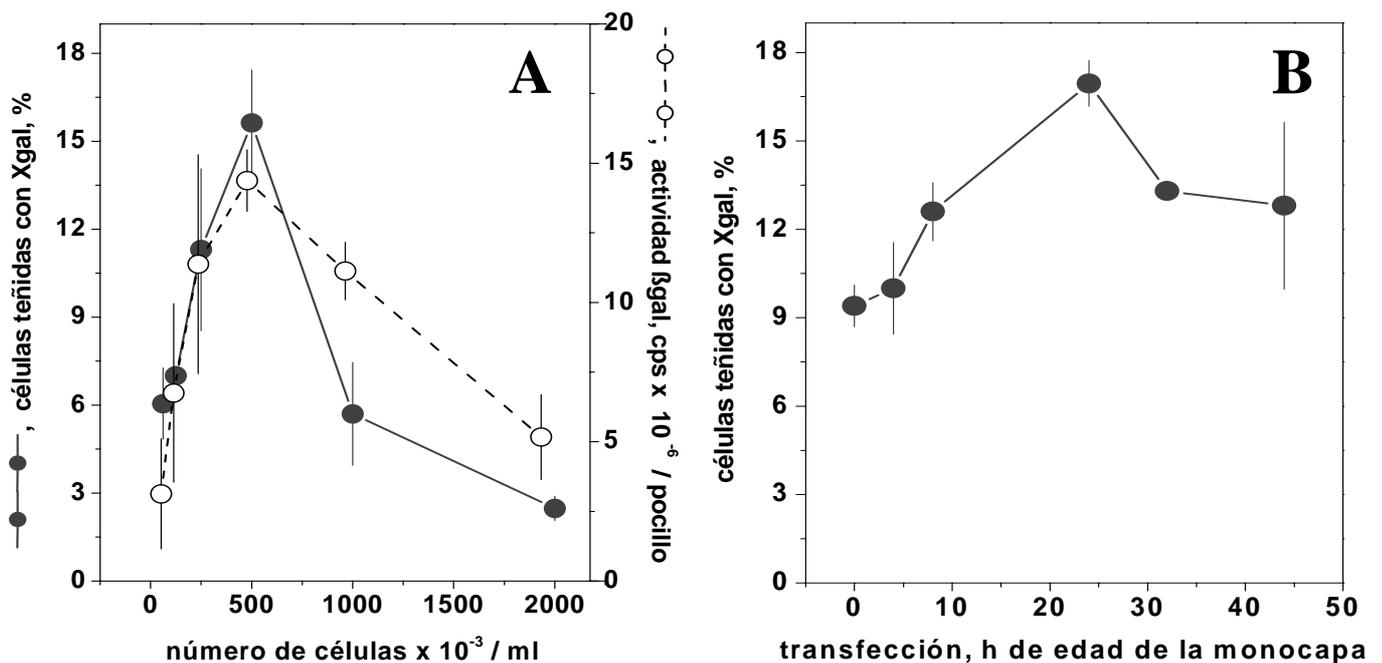


Figura 14.- Relación entre el número de células teñidas con Xgal o de la actividad βgal con el número de células con el que se iniciaron los cultivos (A) y el tiempo de cultivo (B). A) Cantidades distintas de células EPC se sembraron en 400 μl de RPMI 10% FCS por pocillo de una placa de 24 pocillos. Después de 24 h las células se transfectaron con pCMVβ y la actividad βgal se ensayó 24 h después de la transfección. B) 500.000 células por ml se sembraron en una placa de 24 pocillos. Las células se transfectaron a distintos tiempos después de iniciado el cultivo y la actividad βgal se ensayó a las 52 h. Las medias y las desviaciones estándar de 2 experimentos cada uno en duplicado se han representado en ambas figuras

4.3.3. Influencia de la mitosis en la transfección. La variación del porcentaje de células teñidas con Xgal con la concentración celular (Figura 14A) y con el tiempo de transfección relativo a la edad de la monocapa de células EPC (Figura 14B), sugieren su dependencia de la fase del ciclo celular.

Esta hipótesis se confirmó adicionando colchicina o timidina a las monocapas de células EPC antes de la transfección. Un aumento máximo de 2-3 veces en la actividad de β gal se obtuvo cuando las células se incubaron antes de la transfección con colchicina (10 ng/ml) o timidina (2.5 mM) durante 15-20 h o 5 h, respectivamente. El aumento de la duración de los tratamientos provocaba muerte celular en las monocapas de células EPC y por eso se observó una disminución de la actividad con el tiempo de tratamiento (Figura 15).

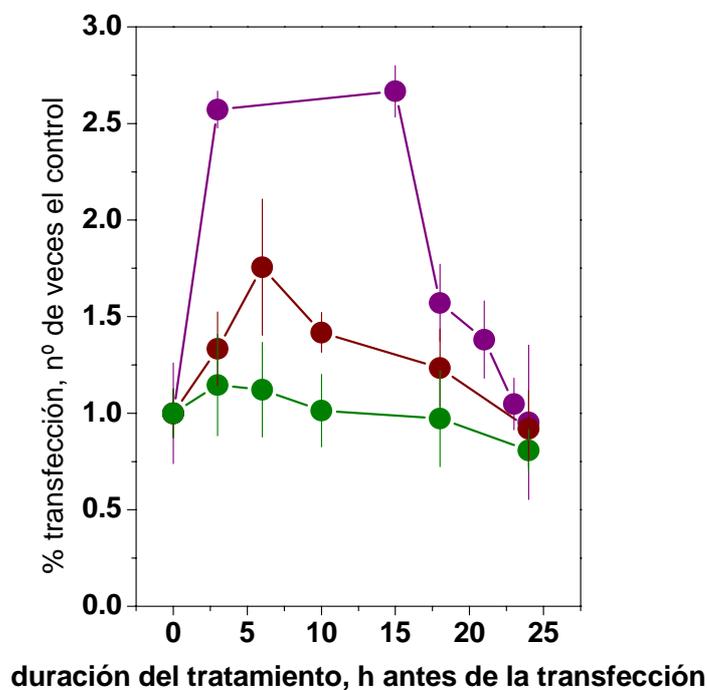


Figura 15.- Efecto del tiempo de la adición de colchicina y timidina antes de la transfección en el porcentaje de transfección (tinción con Xgal) de las células EPC. Unas 500.000 células EPC por ml se trataron con 10 ng/ml de colchicina, 2.5 mM de timidina o agua destilada en 20 μ l durante varias h antes de la transfección. Las monocapas se lavaron con medio, los complejos fuge-ADN se añadieron y la actividad β gal se ensayó 24 h después. Se han representado las medias y las desviaciones estándar de duplicados. ●, colchicina. ●, timidina. ●, agua destilada.

4.3.4. Influencia de la adición de agentes lisosomotrópicos. Para evitar el posible daño que el pH ácido del endosoma pudiera ocasionar al ADN transfectado y así aumentar la eficiencia de transfección, se adicionaron distintos agentes inhibidores de la disminución del pH lisosomal (agentes lisosomotrópicos). Se ensayó el efecto de la presencia de cloroquina (20 a 80 μ M), CaCl_2 (0.1 a 4 mM), sacarosa (20-80 mM) y NH_4Cl_2 (10-50 mM) sobre la expresión del pCMV β . De todos ellos, solo la adición de cloroquina fue capaz de aumentar el número de células teñidas con Xgal (1.5 veces, n = 5). Dado que experimentos paralelos valorando la actividad β gal por luminiscencia demostraron un aumento de más de 5 veces en la actividad de β gal, hay que concluir que la inhibición de la disminución de pH en el endosoma aumenta la cantidad de β gal expresada por célula pero no el número de células que expresan β gal (datos no mostrados).

La combinación de la adición de cloroquina (20 μ M) con varias concentraciones de colchicina o de la colchicina (10 ng/ml) con varias concentraciones de cloroquina no aumentaba significativamente el número de células teñidas por Xgal en las células transfectadas respecto al aumento obtenido con cada uno de los tratamientos por separado (resultados no mostrados).

4.3.5. Uso de promotores CMV de varias longitudes. La Figura 16AB muestra que la transfección con el plásmido pMOK β gal y su derivado de menor peso molecular el pMCV1.4 β gal, aumentaban entre 3-4 veces el número de células teñidas con Xgal comparados con el plásmido pCMV β . Los incrementos en la eficiencia de transfección fueron unas 10 veces mayores cuando la actividad β gal se estimó por luminiscencia (Figura 16B). No se encontraron diferencias significativas entre las eficiencias de transfección del pMOK β gal y su derivado de menor peso molecular pMCV1.4 β gal (n=8). Sin embargo el valor absoluto de la eficiencia variaba entre experimentos (Figura 16AB). Como resultado de la mayor eficiencia de transfección, la inspección visual de las placas de EPC transfectadas por pMOK β gal/pMCV1.4 β gal y teñidas por Xgal mostraba un color azul que nunca se había podido obtener con pCMV β .

La actividad β gal obtenida con los pMOK β gal/pMCV1.4 β gal fue también óptima a 1-3 μ g de plásmido por ml. Concentraciones de ADN más altas o más bajas disminuían la actividad de β gal a niveles de fondo (Figura 16AB), confirmando los resultados obtenidos anteriormente con pCMV β (López et al., 2001).

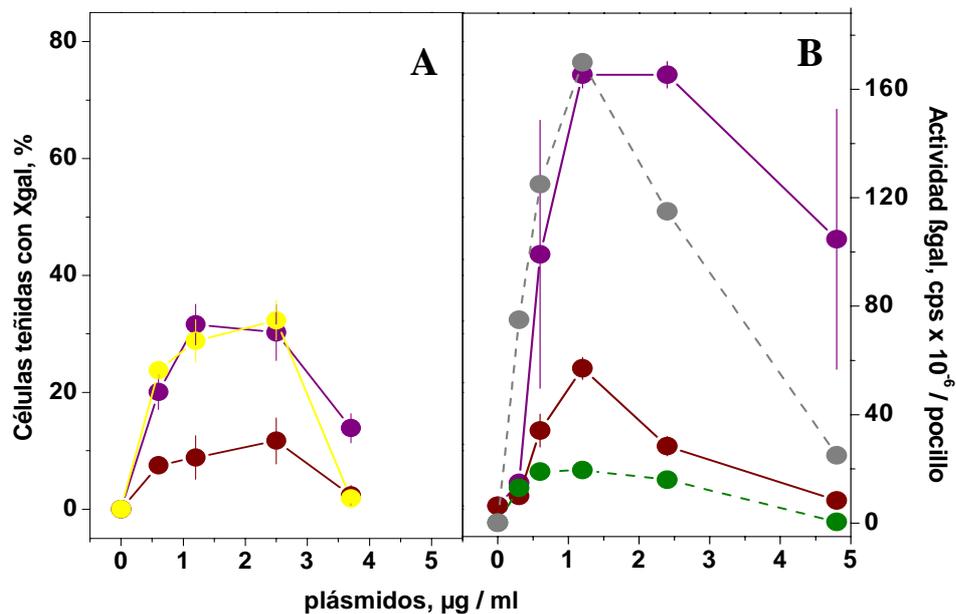


Figura 16.- Rango de las diferencias en la expresión de β gal en función de la longitud del promotor CMV en 2 experimentos extremos (A y B). Unas 500.000 células EPC por ml se transformaron con 0.6 μg de plásmidos acomplexados con 2 μl de fugene en 100 μl de medio sin suero. Los dos experimentos con resultados extremos (izquierda y derecha) representan el rango de valores encontrados en 8 experimentos. Se han representado las medias y las desviaciones estándar de duplicados. „, células teñidas con Xgal obtenidas con pCMV β . „, células teñidas con Xgal obtenidas con pMOK β gal. „, células teñidas con Xgal obtenidas con pMOCV1.4 β gal. „, actividad β gal en cps obtenida con pCMV β . „, actividad β gal en cps obtenida con pMOK β gal o pMOCV1.4 β gal.

La Figura 17 muestra el aspecto de las monocapas EPC transfectadas con pMOCV1.4 β gal y teñidas con Xgal. Las células con una gran cantidad de β gal aparecen teñidas de un azul muy intenso mientras que otras células aparecen teñidas con azul claro.

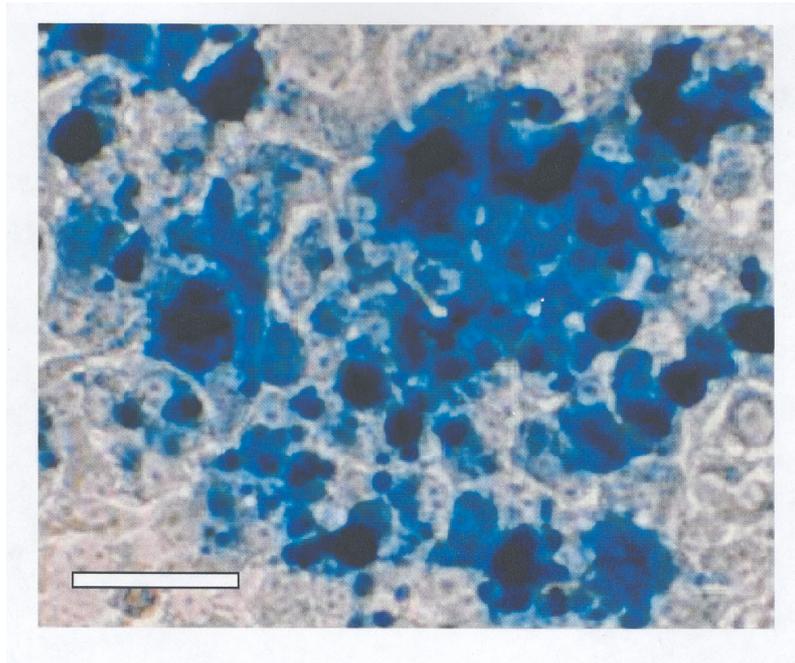


Figura 17.- Aspecto de una monocapa de células EPC tratada con colchicina, transfectadas con pMCV1.4βgal y teñidas con Xgal. El cultivo se comenzó con 500.000 células por ml. Después de 12 h las monocapas se trataron con 10 ng/ml de colchicina y a las 24 h las monocapas se lavaron y transfectaron con pMCV1.4βgal-fugene y 24 h después se fijaron, tiñeron con Xgal y se fotografiaron. La barra blanca corresponde a 40μm.

4.3.6. Transfección con diferentes promotores y tratamientos celulares. La Tabla 9 muestra un resumen de las eficiencias de transfección y su variabilidad obtenidas durante 57 experimentos combinando distintos tratamientos de las monocapas celulares y distintos promotores en el plásmido vector.

Usando pCMVβ se obtuvieron 12.8 ± 6.5 % de células EPC transfectadas con un CV del 54.1 % (n=24). El uso de pMOK o pMCV1.4 (plásmidos que utilizan un promotor de CMV más largo que el de pCMVβ) aumentó la eficiencia de transfección 2.2-2.4 veces y disminuyó el CV alrededor del 40% .

Para aumentar más el porcentaje de células teñidas por Xgal, las monocapas de EPC se incubaron con cloroquina (aumento de 1.5-2.7 veces), colchicina (aumento de 1.4-4.3 veces) o timidina (aumento de 2.6 veces). Una serie de experimentos mostraron que las eficiencias más altas que se podían obtener con un CV de 11.8-18.2 % se obtuvieron con pMCV1.4 y tratando las células con colchicina o timidina, respectivamente.

Tabla 9**Eficiencias de transfección y su variabilidad con distintos promotores y tratamientos celulares**

<u>Plásmido</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Células teñidas con Xgal,</u> <u>% (n°experimentos)</u>	<u>CV, %</u>	<u>AET</u>
pCMVβ	---	12.8 ± 6.5 (24)	54.1	1
pMOK	---	29.1 ± 12.3 (6)	42.2	2.2
pMCV1.4	---	30.7 ± 12.1 (13)	39.3	2.4
pCMVβ	Cloroquina	19.3 ± 5.6 (2)	29.0	1.5
pMCV1.4	Cloroquina	34.7 ± 13.2 (3)	38.2	2.7
pCMVβ	Colchicina	17.9 ± 3.2 (3)	18.2	1.4
pMCV1.4	Colchicina	55.1 ± 7.7 (3)	13.9	4.3
pMCV1.4	Timidina	34.3 ± 4.0 (3)	11.8	2.6

CV, coeficiente de variación expresado en porcentaje. Los tratamientos fueron con 20 μM de cloroquina durante la transfección, 10 ng/ml colchicina 15 h antes de la transfección y 2.5 mM timidina 5h antes de la transfección. AET, aumento de la eficiencia de transfección que se calculó según la fórmula: porcentaje de células transfectadas / porcentaje de las células transfectadas con pCMVβ.

4.3.7. Expresión de la proteína G de VSHV en las membranas de células transfectadas. La expresión de la pG en las membranas de células EPC transfectadas con los plásmidos pcDNA3.1G3 y pMCV1.4-G, se demostró por tinción con anticuerpos anti-pG y análisis por FACS (Figura 18). Los primeros experimentos de transfección del gen de la pG en células EPC se realizaron de acuerdo con las condiciones optimizadas anteriormente para la expresión de βgal. Sin embargo, se comprobó que la expresión óptima de pG requería 2 días a 20 °C (datos no mostrados). En experimentos similares al de la Figura 18, se observa un desplazamiento en el perfil de la intensidad de fluorescencia del 20-70 % de las células vivas (dependiendo del experimento y del plásmido utilizado) con respecto al perfil de las células transfectadas en ausencia de plásmido, lo que indica un reconocimiento de la pG expresada en ellas por los diversos Acs. Este ensayo también permitió seleccionar los mejores AcP y AcM para el posterior estudio de los mutantes de la pG.

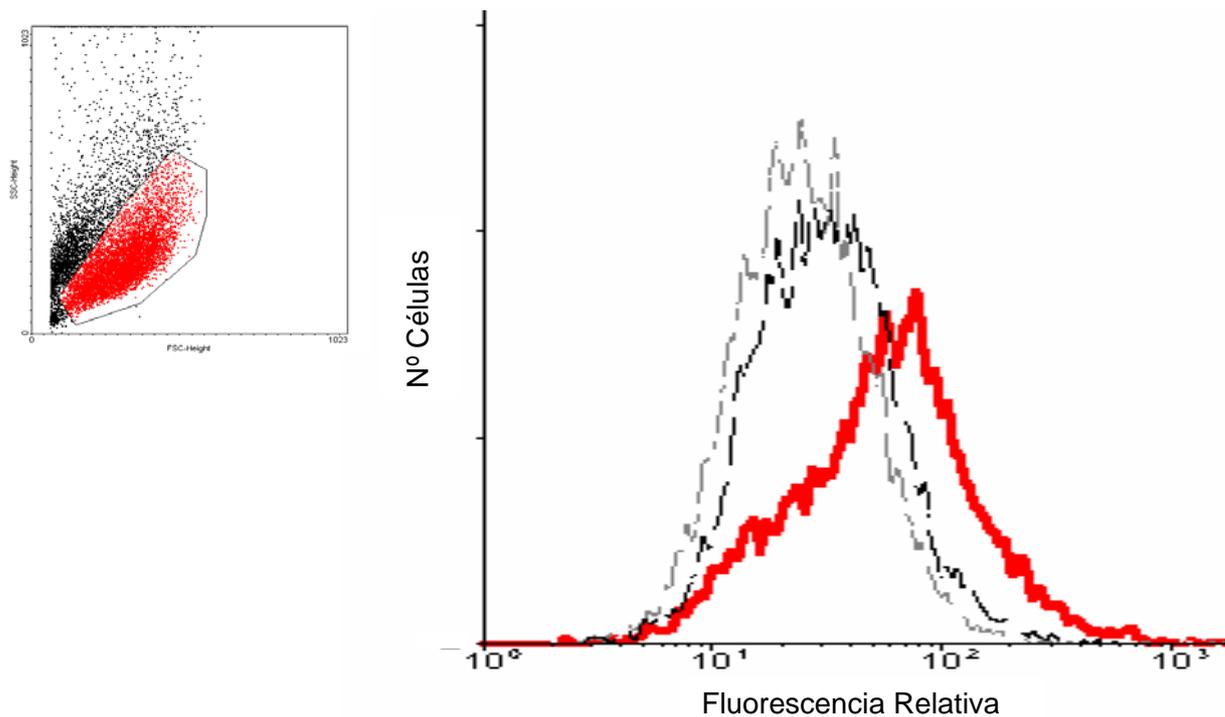


Figura 18. Estimación de la expresión de proteína G por citometría de flujo de células EPC transfectadas con el plásmido pcDNA3.1G3. Se transfectaron células EPC con pMCV1.4-G y 2 días después se tiñeron con Acs y anti IgGs de conejo obtenido en cabra y marcado con FITC (GAR-FITC) (Caltag, San Francisco, USA) y se examinaron por FACS (Becton-Dickinson, San José, California) a 514-545 nm. **A)** De todas las células EPC sólo se escogieron para representar la fluorescencia aquellas que no se marcaron con yoduro de propidio (marcador de ADN que marca las células muertas) y cuya región se recuadra en color rojo en la figura de complejidad (SSC) en función del tamaño (FSC) celular. **B)** Gris, células EPC no transfectadas y teñidas con anti-pG de VSHV. Negro, células EPC transfectadas con pMCV1.4-G y no teñidas con anti-pG de VSHV. Rojo, células EPC transfectadas con pMCV1.4-G y teñidas con anti-pG de VSHV. Resultados similares se obtuvieron utilizando el plásmido pMCV1.4-G.

4.3.8. Puesta a punto de ensayos de fusión. Se ensayaron 3 procedimientos distintos para cuantificar la fusión de membranas entre células transfectadas con el gen de la pG: transferencia de energía de fluorescencia, activación de la transcripción T7 y formación de sincitios.

Para los ensayos de fusión basados en transferencia de energía de fluorescencia se utilizaron liposomas marcados simultáneamente con las sondas fluorescentes R-PE y NBD-PE (Gaudin et al., 1993). Cuando se excita a 450 nm en presencia de R-PE y NBD-PE, la NBD-PE emite a 535 nm pero esa energía se transfiere a la R-PE que la absorbe. Al disminuir el pH, la fusión provoca una separación de R-PE y NBD-PE, la R-PE no puede captar la emisión de la NBD-PE y la emisión del NBD a 535 nm se puede detectar. Primero se puso a punto una formulación óptima de los liposomas que

después de la fusión permitiera una emisión máxima a 535 nm y un fondo mínimo. Para ello se variaron las composiciones relativas de la PC, PE, Ch, R-PE y NBD-PE para formar varios tipos de liposomas y se ensayó la emisión a 535 nm después de lisarlos con Triton x100, que origina la máxima separación posible de R-PE y NBD-PE. Se obtuvieron respuestas máximas de emisión a los 535 nm de unas 40 veces el fondo utilizando las concentraciones de fosfolípidos integrantes de los liposomas descritas en métodos. Ahora bien, cuando se utilizaron dichos liposomas R-PE y NBD-PE para fusionar con células EPC transfectadas con el gen de la pG no se obtuvieron emisiones a 535 nm mayores del fondo. Se probaron distintas concentraciones celulares, concentraciones de liposomas y tiempos de incubación, pero en ningún caso se obtuvieron resultados positivos (resultados no mostrados).

Siguiendo protocolos descritos anteriormente (Biacchesi et al., 2002; Biacchesi et al., 2000a; Biacchesi et al., 2000b), para los ensayos de fusión por activación de la transcripción con la polimerasa del fago T7, se usan 2 poblaciones distintas de células EPC transfectadas, una para expresar la polimerasa T7 y otra para expresar un gen bajo el promotor T7. Para que se pudiera realizar el ensayo, era pues necesario comprobar primero la expresión de un gen marcador (β gal) bajo el promotor de T7, por expresión previa de la T7 polimerasa en una misma población de células EPC (Nussbaum, Broder, y Berger, 1994). Por lo tanto, se procedió a estudiar la expresión de β gal codificada en distintos plásmidos bajo el promotor T7 (pT7Lac, pRnull, pGINT7) en células EPC que expresaran la polimerasa T7 por transfección (pT7) o por infección con vaccinia (VTF7-3) o en células BHK productoras permanentes de la polimerasa T7. Para los ensayos de cotransfección secuencial primero se transfectó un plásmido que codificaba la T7 polimerasa (pT7) y después un plásmido que codificaba la β gal bajo el promotor de la T7 (pT7Lac o pRnull). Para los ensayos de cotransfección simultánea se utilizaron mezclas de los 2 plásmidos en una transfección única. Para los ensayos de infección-transfección, se infectaron células EPC con la cepa de Vaccinia VTF7-3 (multiplicidad de infección de 5 virus por célula) y después se transfectaron con plásmidos que codificaba la β gal bajo el promotor de la T7 (pT7Lac, pRnull, pGINT7). Además y debido a que mientras que la temperatura óptima para el funcionamiento de la T7 polimerasa es de 37 °C y la temperatura óptima a la que la pG de VSHV fusiona es de 14-20 °C, se realizaron experimentos combinando de varias maneras las temperaturas y los tiempos de cada tratamiento (Tabla 8). Sin embargo no se obtuvieron suficientes niveles de expresión de la β gal (máximo de 45.7 veces el fondo) en ninguno de los 11

protocolos diferentes que se ensayaron. La expresión de β gal para poder realizar el ensayo de fusión con una fiabilidad suficiente con estos métodos se estimó en un valor de 700 veces el fondo (Tabla 8). Por lo tanto, a pesar de la variación en protocolos, plásmidos, tiempos y temperaturas ensayados, no se pudieron obtener actividades de β gal suficientemente útiles para el ensayo en ningún caso.

4.3.9. Formación de sincitios. Tras los resultados negativos obtenidos con los métodos de transferencia de energía de fluorescencia y activación de la transcripción con la polimerasa del fago T7, se optó por optimizar los ensayos de formación de sincitios.

Para los ensayos de fusión por formación de sincitios, se transfectaron las células con pMCV1.4-G y la fusión se detectó por visualización al microscopio de los sincitios que se forman al disminuir el pH del medio. En la Figura 19A se muestra el aspecto de los sincitios de entre 3 a 30 núcleos por sincitio que se forman en una monocapa de células EPC transfectadas con pMCV1.4-G después de inducir la fusión a pH 6. Cuando las células se transfectaron con G3-pcDNAI/Amp, el 70% de los sincitios que aparecían tenían 3 núcleos por sincitio. Mientras que cuando las células se transfectaron con pMCV1.4-G, la mayoría de los sincitios tenían entre 9-16 núcleos por sincitio (Figura 19B), por lo que se seleccionó este plásmido para efectuar los ensayos. El tamaño y el número de sincitios aumentaba si las células EPC una vez tratadas a pH 6 se incubaban 2 h más a pH neutro (datos no mostrados). Para evitar que las células EPC se despegaran de la monocapa durante el tratamiento a bajo pH, el pH se mantuvo a 6 (suficiente para observar sincitios, aunque el máximo está en pH 5.6) y se utilizaron monocapas de células EPC de al menos 24 h después de iniciado el cultivo.

Para comprobar que la formación de sincitios correlacionaba con la eficiencia de transfección y optimizar su dependencia con la concentración de plásmido, se llevaron a cabo experimentos simultáneos con pCMV β (eficiencia de transfección fácilmente detectable y con alta sensibilidad), G3-pcDNA/Amp y pMCV1.4-G. La más alta expresión de β gal con fugene se obtuvo usando 0.6 μ g de pCMV β por pocillo tanto si la actividad β gal se estimaba por número de células teñidas con Xgal como si la actividad se estimaba por luminiscencia o por tinción con FDG y FACS (datos no mostrados).

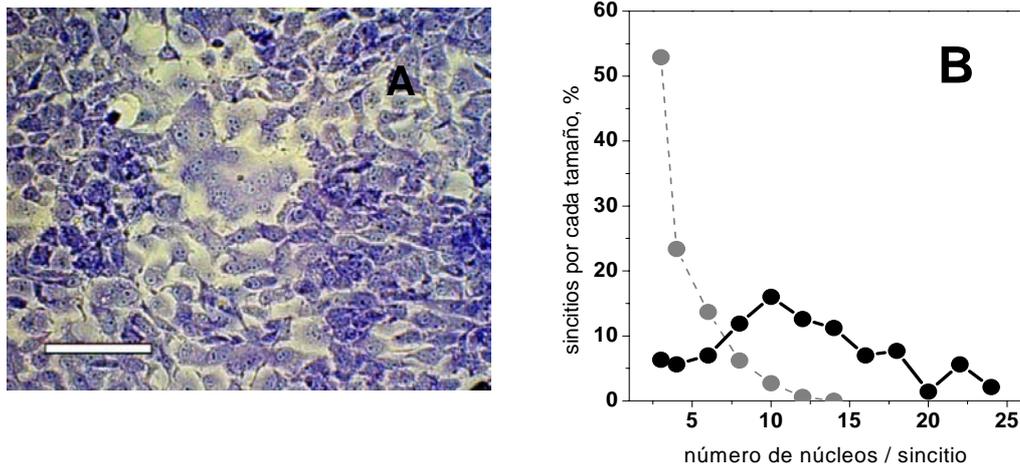


Figura 19. Microfotografía (A) y distribución de tamaños (B) de los sincitios inducidos a pH 6 en monocapas de EPC transfectadas con pcDNAI/Amp-G3 (●) y pMCV1.4-G (○). Quinientas mil células por pocillo de una placa de 24 pocillos se transfectaron con 0.6 μ g de pcDNAI/Amp-G3 o pMCV1.4-G acompañados con 2 μ l de fugene en 400 μ l de medio. A los 2 días las monocapas se incubaron durante 30 min a pH 6 y 2 h a pH 7.5 a 20 °C. Después se fijaron, se tiñeron y se microfotografiaron. La barra blanca horizontal corresponde a 60 μ m (A). El número de núcleos por sincitio y el número de sincitios se contaron en 200 sincitios (B).

Confirmando su dependencia con la eficiencia de transfección estimada con el plásmido pCMV β y tanto si la fusión se cuantificaba por número de sincitios como por el de núcleos en sincitios, el máximo de formación de sincitios también se encontró utilizando 0.6 μ g de G3-pcDNAI/Amp o pMCV1,4-G por pocillo. La utilización de concentraciones de ADN más altas o más bajas reducía el número de sincitios (Figura 20).

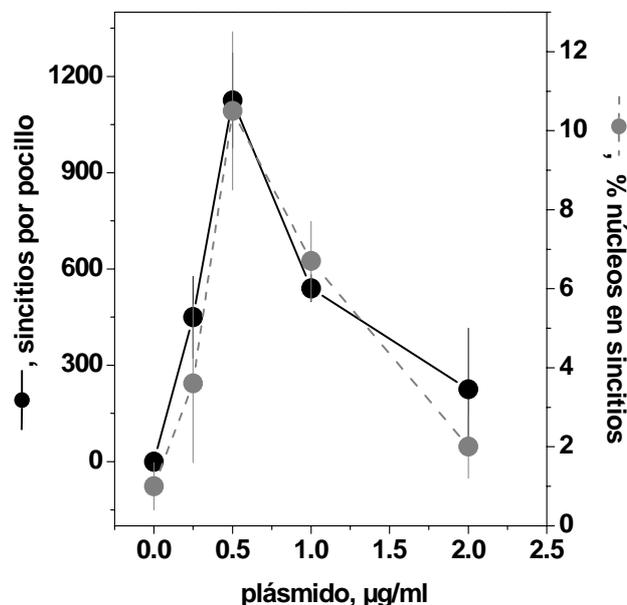


Figura 20.- Número de sincitios y porcentaje de núcleos en sincitios detectados en monocapas EPC después de la transfección con distintas concentraciones de pcDNAI/Amp-G3. Las células EPC se transfectaron con concentraciones diferentes de pcDNAI/Amp-G3 con 2 μ l de fugene. El número de sincitios y el porcentaje de núcleos en sincitios se contó después de fijar y teñir las células. ●—●, número de sincitios por pocillo. ○—○, porcentaje de núcleos por sincitio. Resultados similares se obtuvieron utilizando pMCV1.4-G.

4.3.10. Inhibición de la formación de sincitios con anticuerpos anti-VSHV.

Para demostrar que los sincitios eran dependientes de la proteína G expresada en la membrana de las células EPC transfectadas, se estudió la formación de sincitios en presencia de Acs anti-VSHV y anti-pG. Los AcM neutralizantes C10 y 2F1A12 y el AcM IP1H3, que reconoce un epítipo lineal (Fernandez-Alonso et al., 1999c), disminuyeron el número de núcleos en sincitios a valores de fondo (Figura 21A). Por el contrario los AcM anti-G I10 o 2C9 (anti-N, usado como control negativo), no afectaron a la formación de sincitios.

El ascitis procedente de ratones inmunizados con VSHV saponina con un título de neutralización de 1000, redujo el número de núcleos en sincitios a un 15-40 %. Mientras que el ascitis procedente de ratones inmunizados con VSHV + Freund's con un título de neutralización de 10, redujo el número de núcleos en sincitios a un 30-40% (Figura 21B).

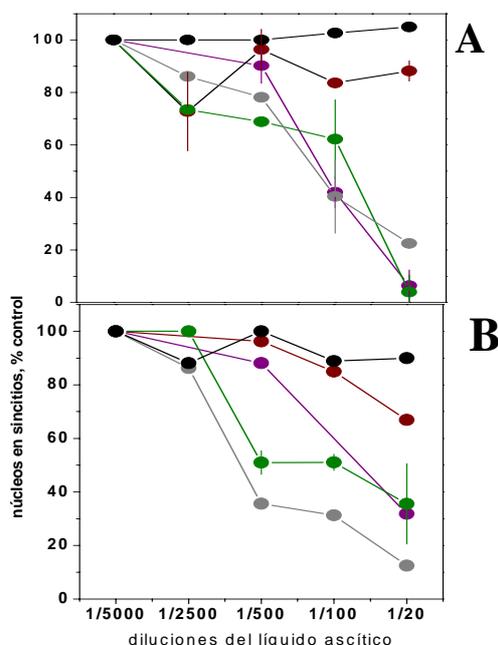


Figura 21.- Inhibición de la formación de sincitios en células transfectadas con pG por AcM anti-G (A) y AcP anti VSHV o anti-G (B) obtenidos en ratón. Las monocapas EPC transfectadas con G3-pcDNAI/Amp se incubaron 30 min a pH 6 y 14 °C en presencia de anticuerpos, se lavaron a pH 7.6 y después de 2 h se fijaron y tiñeron. El porcentaje de núcleos en sincitios en ausencia de Acs fue de 25.3 ± 6.2 % (n=3). Los resultados se expresan en % del control según la fórmula: número de núcleos en sincitios en presencia de Acs / número de núcleos en ausencia de Acs x 100. Se representan las medias y desviaciones estándar de 2 determinaciones. **A**) ●, AcM anti-N VSHV 2C9 (Sanz y Coll, 1992b). ●, AcM C10 neutralizante anti-VSHV (mutantes resistentes se localizan en aa 140 y 433) (Bearzotti et al., 1995; Gaudin, DeKinkelin, y Benmansour, 1999); ●, AcM 2 F1A12 neutralizante anti-VSHV (mutantes resistentes se localizan en aa 253) (Lorenzen, comunicación personal); ●, AcM IP1H3, anti-VSHV pG (localizado por pepscan en aa 399-413) (Fernandez-Alonso et al., 1999c); ●, AcM 110, anti-VSHV pG (localizado por pepsina en aa 139-153). **B**) ●, AcM 2C9, anti-VSHV N. ●, ●, Ascitis de ratones inmunizados con VSHV y saponina (título de neutralización ~ 1000); ●, ●, Ascitis de ratones inmunizados con pG y Freund's (título de neutralización ~ 100).

La Figura 22 muestra el porcentaje de núcleos en sincitios que se obtuvieron en presencia de suero procedente de truchas inmunizadas con VSHV. Los sueros procedentes de truchas con títulos de neutralización de ~ 100.000 o ~ 2000 , redujeron al 40 % el número de núcleos en sincitios. Los sueros procedentes de truchas con títulos de neutralización de ~ 100 redujeron al 60 % el número de núcleos en sincitios. Al contrario, el suero procedente de truchas sanas no inmunizadas no redujo el número de núcleos en sincitios.

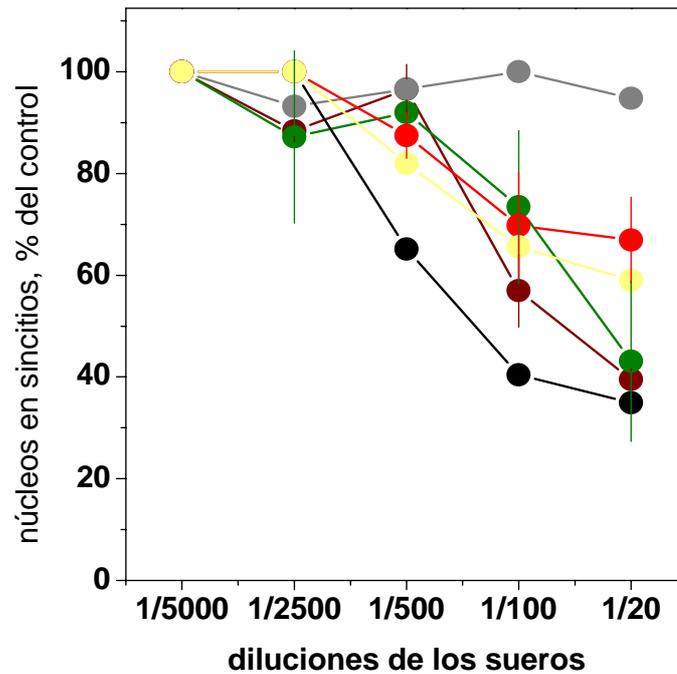


Figura 22.- Inhibición de formación de sincitios de células transfectadas con proteína G por sueros de trucha. Monocapas de EPC transfectadas con G3-pcDNAI/Amp se ensayaron por fusión en presencia de sueros de trucha como en la Figura 12 λ ; suero procedente de truchas sanas (resultados similares se obtuvieron con otros 14 sueros de truchas sanas). λ , λ , λ sueros de truchas con títulos de neutralización ~ 100.000 (donados por el Dr. Kinkelin de Jouy-in-Josas, France y por el Dr. Lorenzen de Aarhus, Denmark). λ , suero de trucha (trucha #3) inmunizada con VSHV y saponina con títulos de neutralización de ~ 2000 . λ , media y desviaciones estándar de dos sueros de trucha (truchas #1 y #2) inmunizadas con VSHV + pG y Freund's con títulos de neutralización de ~ 10 .

4.4 ANÁLISIS DE MUTANTES.

4.4.1. Péptidos mutantes en la secuencia del p2. Para investigar la contribución de algunos de los residuos del p2 en el ligamiento de fosfolípidos se diseñaron y sintetizaron una serie de 43 péptidos carboxi terminales de 15-mer (secuencia original: $^{93}\text{SAVASGHYLHRVTYR}^{107}$).

Primeramente se reemplazaron cada uno de los aa de la secuencia original por una A. La única posición de esta secuencia que mostró variaciones en el estudio de los 22 aislados de VSHV (Figura 8), fue la S97N(D), por lo que también se incluyó en el estudio el mutante S97N en lugar del que le hubiera correspondido al mutante A96A. Además se incluyeron como controles 2 secuencias con la misma composición de aa que la original pero con el orden al azar (secuencias: SVYRYHVAHASLGTR y RGHSAAHVSTYRLYV).

La Figura 23A muestra que la mayoría de los cambios de aa, no disminuyen significativamente la capacidad de ligamiento de fosfatidilserina (PS) a los péptidos mutantes del p2. Sin embargo, los cambios S97N (posición 96 en la Figura 23A) y el H102A, no solo no disminuían la capacidad de ligamiento de fosfatidilserina sino que aumentaban 2 veces la capacidad de unión de fosfolípidos de la secuencia original o de las secuencias al azar. Estos resultados sugieren que los cambios estudiados en posiciones 97 y 102 podrían aumentar o modular la capacidad de interacción del virus con las membranas celulares una vez introducidos en el virión. En todo caso sugieren posiciones a tener en cuenta en posibles estudios futuros y confirman la participación del p2 en el ligamiento de fosfatidilserina.

Después se estudiaron las influencias de los cambios de aa en la cabeza polar del p2 (2 R cargadas positivamente en posiciones 103 y 107) en el ligamiento de PS (fosfolípido aniónico, cargado negativamente). Para ello se hicieron sustituciones de las R por carga positiva y negativa respectivamente. La Figura 23B muestra que el ligamiento de PS no cambia significativamente con la mayoría de las combinaciones estudiadas (RK, RH, RE, KR, HR, ER, HK, HH y AA). La capacidad de ligamiento de PS de los mutantes, la secuencia original y las realizadas al azar fueron muy similares excepto en las combinaciones K-K o E-E que sí inhibían el 50 % del ligamiento de PS. Estos resultados sugieren que las interacciones iónicas no son tan importantes como las hidrófobas en el ligamiento de PS, al menos en la secuencia del p2 estudiada.

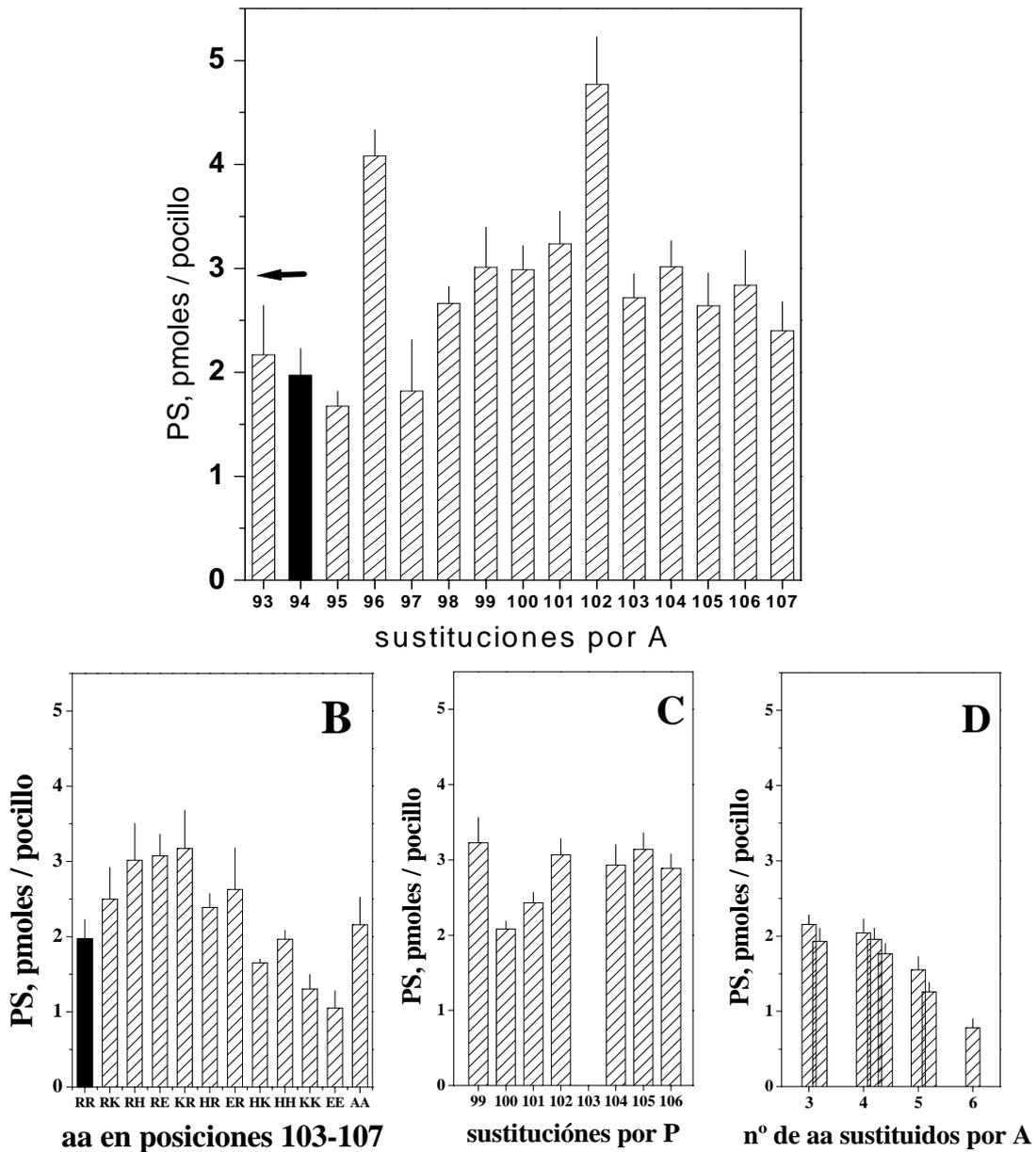


Figura 23. Ligamiento de fosfatidilserina por péptidos derivados del p2 con mutaciones. El péptido p2 $^{93}\text{SAVASGHYLHRVTYR}^{107}$ que contiene parte de las heptadas repetidas y la cabeza cargada positivamente se sintetizó con aa reemplazados en diversas posiciones. El ligamiento de PS marcado se estimó con los péptidos en fase sólida como se describe en métodos. El fondo de marcaje se restó de todos los datos obtenidos y se transformaron en pmoles. Las barras en negro corresponden a la secuencia original aa 93-107 del p2. La flecha horizontal corresponde a la media de los 2 péptidos al azar (secuencias: SVYRYHVAHASLGTR y RGHSAAHVSTYRLYV). Se representan las medias y las desviaciones standard de dos experimentos cada uno de ellos por triplicado. **A**, cada una de las posiciones se fueron sustituyendo por una A (excepto la 96 que por ser también A se diseñó como la S97N). **B**, las posiciones 103 y 107 se fueron sustituyendo por los aa que se indican en la abscisa. **C**, cada una de las posiciones indicadas se sustituyó por una P. **D**, se sintetizaron las siguientes secuencias de izquierda a derecha con las sustituciones en negritas. Con 3 sustituciones: SAVASGHYLHRAAAR y SAVASGAALARVTYR. Con 4 sustituciones: SAAASGAALARVTYR, AVASGHYLHRAAAAR y SAAASGHYLHRAAAR. Con 5 sustituciones: VASGHYLHRAAAAA y SAVASGHYLHAAAAA. Con 7 sustituciones: SAVASGAAAAARAAR

Para estudiar la posible influencia de la introducción de “codos” en la secuencia original en el ligamiento de PS, se introdujeron P en distintas posiciones en la estructura exceptuando las R de la cabeza polar (posiciones 90, 100, 101, 102, 104, 105 y 106). Sin embargo, la introducción de una P en distintas posiciones no tenía efectos significativos en el ligamiento de PS comparados con el rango de ligamiento de PS entre la secuencia original y las secuencias al azar (Figura 23).

Por otra parte, la introducción de 3-7 cambios simultáneos de aa por A, reducía la capacidad de ligamiento de PS proporcionalmente al número de A introducidas. Es decir el ligamiento de PS fue similar al original con 3 (SAVASGHYLRHRAAAR y SAVASGAALARVTYR) y 4 sustituciones (SAAASGAALARVTYR, AVASGHYLRHRAAAR y SAAASGHYLRHRAAAR), mientras que fue decreciendo con 5 (VASGHYLRHRAAAR y SAVASGHYLRHRAAAR) y con 7 sustituciones (SAVASGAARHRAAAR), independientemente de la localización en la secuencia (Figura 23D). Estos resultados demuestran que la capacidad de ligamiento de PS es dependiente de la secuencia y que puede ser disminuida al hacer cambios en ella.

4.4.2. Mutantes de la proteína G de VSHV obtenidos y utilizados. Los mutantes elegidos pueden distribuirse en 2 grupos localizados en el frg#11+p3+p4 y el péptido de fusión. Entre los mutantes que pudieron obtenerse por mutagenesis dirigida están (Tabla 11):

- a) los que podrían afectar a codos en la estructura altamente conservados, tales como las P y G (P65A, P79A, P86A, G98A y el doble mutante P86AG98A),
- b) los que afectan a las heptadas hidrófobas (que se han mutado a un aa hidrófilo S o cargado E: I82S, L85S, A96E y el doble mutante G98AH99S),
- c) los que afectan a las cargas positivas de la cabeza del p2 (R en posiciones 103 y 107 que se han mutado a A),
- d) los que afectan a la zona p3 y a la zona hidrófila p4 (F115K y T135E), y
- e) los que afectan a posiciones homologas en el péptido de fusión en VSV que están en las posiciones F147, P148 y W154 de VSHV (que se han mutado a K, un aa cargado) y que pertenecen al motivo conservado (F,Y)PXPXXCX(W,F).

Tabla 11 . Expresión de pG mutantes en el citoplasma y membrana de células EPC transfectadas, fusión a pH 6 y pH óptimo de fusión

Localización de los mutantes:	Mutante	* IF	Expresión en membrana por FACS**						Fusión			
			AcP Anti-pG			AcM C10			pH óptimo	*** % núcleos en sincitios		
-----	Sin mutación	+	53.5	± 11	(6)	21.6	± 9	(6)	5.6	45.8	±10.9	(3)
P/G	P65A	+	54.1	± 8	(3)	0.9	±0.1	(4)	-	1.8	±0.6	(3)
	P79A	+	42.5	± 10	(4)	0.3	±0.1	(3)	5.3	24.8	±0.5	(2)
	P86A	+	56.8	± 15	(4)	1.1	±0.6	(3)	-	2.1	±0.5	(3)
	G98A	+	77.2	± 9	(2)	0.6	±0.2	(3)	-	1.6	±0.2	(2)
	P86AG98A	+	50.6	± 13	(4)	1.4	±0.1	(4)	-	1.4	±0.3	(3)
Heptadas	I82S	+	1.3	± 0.3	(3)	1.6	±0.6	(4)	?	1.6	±0.2	(2)
	L85S	+	51.6	± 29	(2)	0.5	±0.1	(3)	5	10.5	±2.7	(2)
	A96E	+	44.5	± 19	(3)	1.2	±0.3	(3)	-	1.6	±0.4	(2)
	G98AH99S	+	71.5	± 4	(2)	0.5	±0.3	(2)	-	1.7	±0.3	(2)
Cabeza + p2	R103A	+	64.7	± 14	(2)	1.6	±0.8	(2)	5	29.0	±14.2	(2)
	R107A	+	63.5	± 23	(2)	0.9	±0.3	(2)	-	2.1	±0.5	(2)
p3	F115K	+	52.0	± 23	(3)	0.4	±0.2	(2)	-	1.6	±0.5	(3)
p4	T135E	+	55.6	± 20	(3)	1.3	±0.8	(2)	5	15.0	±9.1	(3)
Péptido fusión	F147K	+	69.0	± 1	(2)	1.3	±0.3	(3)	-	1.6	±0.2	(2)
	P148K	+	50.2	± 2	(2)	1.5	±0.3	(2)	-	2.8	±1.5	(2)
	W154K	+	76.3	± 13	(2)	1.0	±0.7	(3)	-	1.8	±0.2	(2)

*, La expresión en el citoplasma de las células EPC transfectadas con los plásmidos mutantes pG se estimó por inmunofluorescencia con el AcP de conejo anti-pG, creciendo las células EPC en vidrios introducidos en el fondo de los pocillos en placa de 24 pocillos. Los resultados se clasificaron en positivos (+) cuando se detectó fluorescencia mayor que la del fondo (Figura 23).

** , Los resultados se dan en medias ± desviación estándar del porcentaje de células EPC teñidas con los Acs indicados y entre paréntesis el número de experimentos.

***, los resultados de la fusión al pH óptimo se dan en porcentaje de núcleos en sincitios > 3 células/sincitio (n ~1300, 4 campos de x100). En la Tabla se da el pH en el que el % fue mayor. La estimación del número de sincitios detectados en una monocapa sin transfectar fue del 1.3 % (n=1300) aunque el 95 % de ellos solo tenía 3 células. En negrita se resaltan los mutantes que son incapaces de fusionar en el intervalo de pH. 5 a 7.3 (Figura 25). En púrpura los mutantes que conservan un porcentaje de fusión alto. El mutante I82S, puesto que no se expresa en membrana no puede saberse si afecta a la fusión o no.

4.4.3. Expresión en EPC de los mutantes de proteína G. Se comprobó tanto en el citoplasma como en la membrana, la expresión de la pG en células de EPC transfectadas con los pMCV1.4-G mutantes por mutagenesis dirigida.

Con todos los mutantes se obtuvieron fluorescencias positivas en el citoplasma (Figura 24). Excepto el mutante I82S, todos los demás también se detectaron en las membranas de las células EPC transfectadas. La Figura 24 muestra los perfiles de intensidad de inmunofluorescencia/número de células obtenidos por FACS con los mutantes estudiados. El porcentaje de células con expresión positiva de pG en sus membranas variaba entre el 42.5 y el 77.2 % de las células transfectadas (n = 2-4 experimentos por mutante y 5000 células por experimento) (Tabla 11). Dada la poca variación de estas estimaciones, los datos sugieren que los mutantes de pG no difieren en su expresión en membrana (excepto el mutante I82S). Sin embargo, cuando se utilizó el AcM C10 (que reconoce epítopos conformacionales en los aa 140 y 433), sólo la pG no mutante era reconocida.

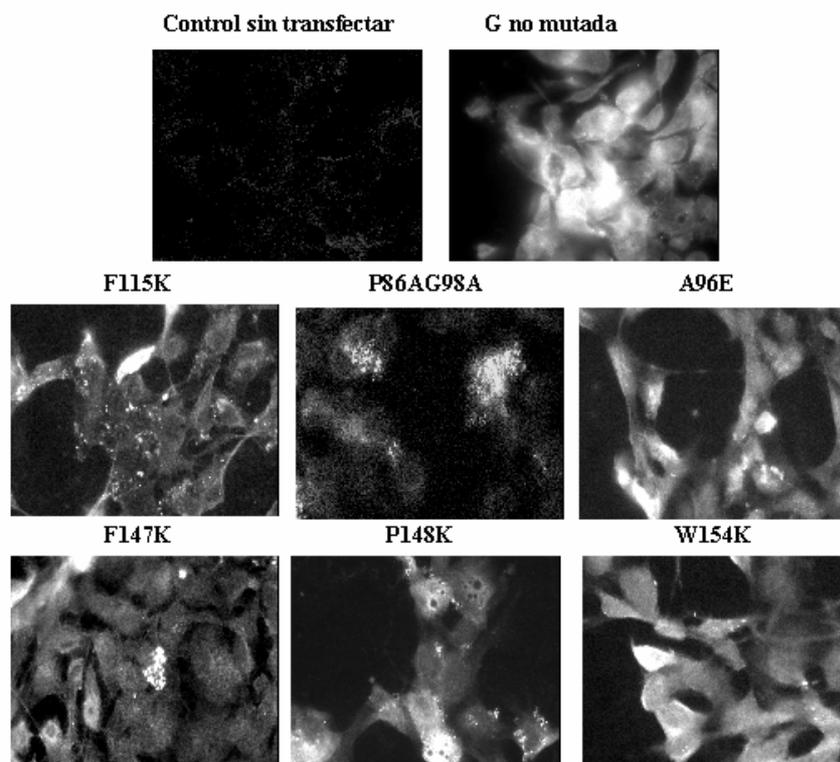


Figura 24. Estimación cualitativa de la expresión de la proteína G en el citoplasma de células EPC transfectadas con el plásmido pMCV1.4-G y los distintos mutantes por inmunofluorescencia indirecta. Se transfectaron células EPC con plásmidos pMCV1.4 codificando los distintos mutantes de la pG de VSHV. Dos días después se permeabilizaron y se tiñeron con AcP obtenidos en conejo anti-G de VSHV (cedidos por el Dr. Niels Lorenzen, Aarhus, Dinamarca) y anti- IgG de conejo obtenidos en cabra y marcados con FITC (GAR-FITC). Todos los mutantes mostraron fluorescencia positiva en el citoplasma (Tabla 11). En la figura se muestran algunos de ellos.

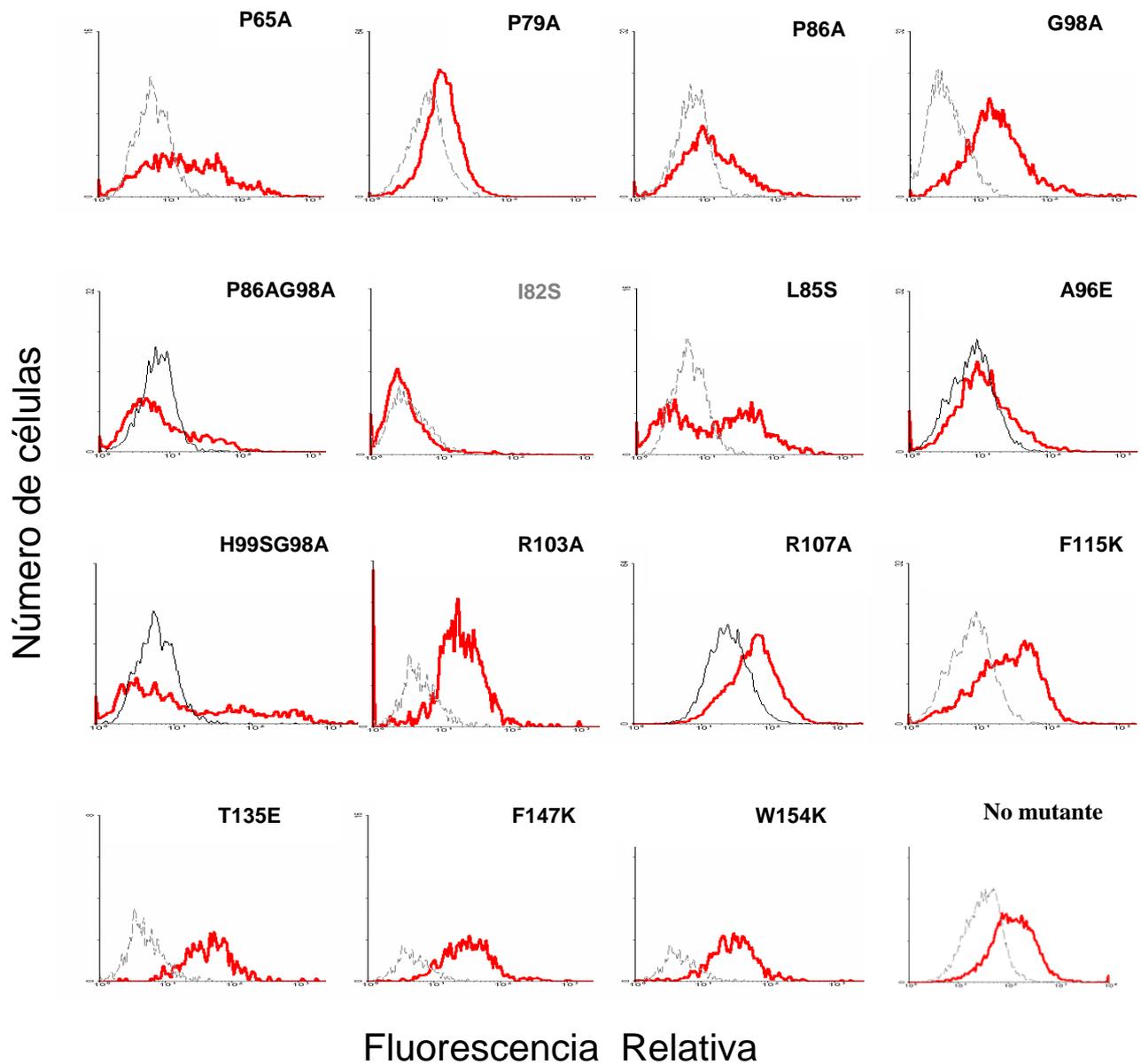


Figura 25. Estimación de la expresión de proteína G en membrana por citometría de flujo de células EPC transfectadas con los plásmidos pMCV1.4-G mutantes. Se transfectaron células EPC con plásmidos pMCV1.4 codificando los distintos mutantes de la pG de VSHV. Dos días después se tiñeron con AcP obtenidos en conejo anti-G de VSHV y anti- IgG de conejo obtenidos en cabra y marcados con FITC (GAR-FITC). Gris, células EPC transfectadas con los distintos mutantes y no teñidas con anti-pG VSHV pero sí con GAR-FITC. Rojo, células EPC transfectadas con los distintos mutantes y teñidas con anti-pG VSHV y GAR-FITC. La expresión de cada mutante en las membranas de las células EPC transfectadas se estimó en 2-3 experimentos (Tabla 11), en la figura se muestra el más representativo. El mutante P148K se ha omitido de la figura para mayor claridad. Nótese que el mutante I82S no se expresaba en membrana.

4.4.4. Dependencia del pH en la fusión de mutantes de proteína G. Después, se realizaron ensayos de fusión a distintos pH entre 5 y 8 con células EPC transfectadas con los mutantes obtenidos.

La Figura 26 muestra que la formación de sincitios se redujo a valores de fondo obtenidos con células EPC sin transfectar en la mayoría de los mutantes obtenidos, excepto en los P79A, L85S, R103A y T135E. La Tabla 11 muestra la cuantificación de la fusión (medias de 2-3 experimentos por mutante).

Los valores medios obtenidos de los porcentajes de núcleos en sincitios pueden ser agrupados en 2 tipos: entre 1.6-2.8 % (correspondientes a los mutantes afectados en fusión: P65A, P86A, G98A, P86AG98A, A96E, G98AH99S, R107A, F115K, F147K, P148K y W154K) y entre 10.5-24.8 % (correspondientes a los mutantes que seguían fusionando, sí bien con menor actividad que la pG no mutante: P79A, L85S, R103A y T135E). Los porcentajes de núcleos en sincitios obtenidos en células transfectadas con la pG no mutante fueron del 45.8 % mientras que en el control negativo de células EPC no transfectadas fueron del 1.3 % (n = 3000).

Por lo tanto, todos los mutantes obtenidos que afectan a las posiciones conservadas del péptido de fusión homólogo al del VSV (**F,Y**)PXPXXC**X(W,F)** (posiciones F147, P148 y W154) eran incapaces de fusionar, confirmando su implicación en el proceso de fusión de VSHV tal y como ocurre en VSV. Por otra parte, en el caso de los mutantes que conservaban la capacidad de formación de sincitios, el pH óptimo de la formación de sincitios se desplazaba hacia pH más ácidos (Figura 25), variando del pH 5.6 para la pG no mutada, al pH 5.3 para el mutante P79A y pH 5 para los mutantes L85S, R103A y T135E. El resto de los mutantes cuya formación de sincitios resultó inhibida, no mostraban formación de sincitios en ninguno de los pH estudiados (5, 5.3, 5.6, 6, 6.3, 6.6, 7 y 7.3).

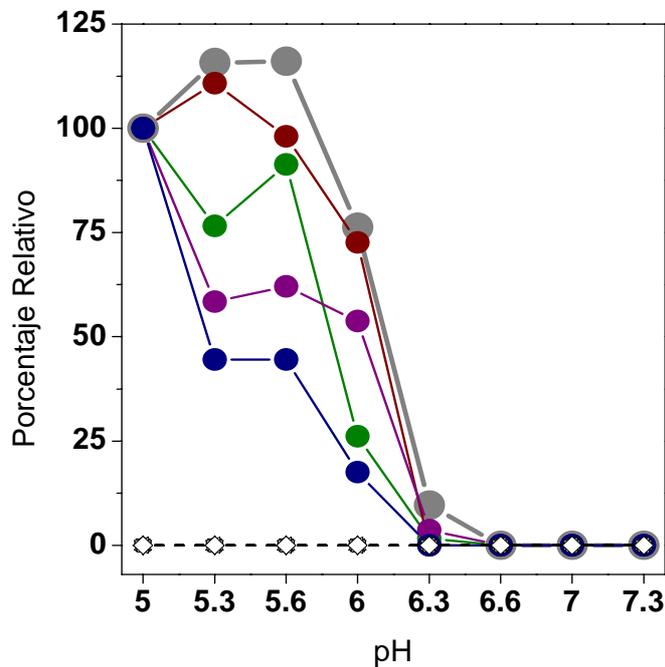


Figura 26. Estimación de la fusión de células EPC transfectadas con los plásmidos mutantes a distintos pHs. Se transfectaron células EPC con plásmidos pMCV1.4 con los distintos mutantes. Dos días después las monocapas se sometieron a los pHs que se muestran en la figura. Después de teñir se contaron los porcentajes de núcleos en sincitios > 3 células / sincitio (n=1300). El porcentaje relativo de fusión se ha calculado para cada mutante con la siguiente fórmula: % de núcleos en sincitios a los distintos pHs / % de núcleos en sincitios a pH 5 x 100. Los números representados son las medias de, al menos 2 experimentos por punto. Las desviaciones estándar se han omitido para una mayor claridad.
 λ, no mutante. λ, P79A. λ, R103A. λ, L85S. λ, T135E. -, P65A. 8, P86A. ψ, P86AG98A. M, R107A. ∇, F115K. □, F147K. X, W154K. 0, P148K. P, I82S. π, A96E.

5.1. PUESTA A PUNTO DE UN ENSAYO DE FUSIÓN

5.1.1. Selección de células, agente transfectante y variables de transfección. De forma paralela al estudio de secuencias y obtención de mutantes, el desarrollo de este trabajo requería la puesta a punto de métodos de transfección de células de pez con los plásmidos codificando para el gen de la proteína G para aumentar la sensibilidad en los ensayos de fusión.

Las condiciones óptimas de transfección para células de pez se estudiaron en la línea celular EPC (derivadas de carpa), dado que: es una línea celular bien caracterizada que crece a 28 °C, es el mejor modelo pronosticador de la actividad de construcciones plasmídicas en peces transgénicos (Moav et al., 1992) y se transfectan mejor que las líneas celulares RTG-2 o RTH (derivadas de trucha que crecen a 20 °C) (Bearzotti et al., 1992).

Después de unos primeros ensayos de transfección utilizando electroporación, sonicación y liposomas, se eligieron los liposomas debido a su mayor sencillez. Debido a que tanto los liposomas de transfección comerciales como las condiciones usadas para transfectar células se han optimizado para células de mamífero utilizando temperaturas de 37°C, dichos reactivos y condiciones podrían no haber sido aplicables a las células EPC, que requieren temperaturas menores. Es por ello que se realizaron una serie de experimentos para seleccionar tanto el mejor liposoma como las mejores condiciones para la transfección de células EPC. Para detectar la actividad después de la transfección, se eligió el gen de la β gal (pCMV β) y un ensayo comercial de su actividad basado en un sustrato luminiscente altamente sensible (β gal Tropix) además de la clásica tinción con Xgal.

Aunque estudios recientes realizados en nuestro laboratorio seleccionaron como mejor agente de transfección para células EPC al fugene (Roche) (López et al., 2001), se reevaluó su selección volviendo a ensayarlo junto con nuevos agentes de transfección comerciales aparecidos en los últimos años. Los resultados obtenidos volvieron a demostrar que el fugene seguía siendo el agente transfectante más eficaz, tanto por inducir las mayores actividades de β gal como por ser de manipulación sencilla. Después de mezclar el fugene y el plásmido, la mezcla se añade a las monocapas de EPC en presencia de medio de cultivo celular.

El estudio reveló la importancia de la relación de concentraciones entre el pCMV β y el reactivo transfectante. Los mejores resultados se obtuvieron con una

relación fugene/pCMV β de $\sim 3 \mu\text{l}/\mu\text{g}$. La concentración del pCMV β es también muy crítica. Un exceso en la concentración de pCMV β disminuye la actividad de βgal obtenida después de la transfección debido a mecanismos de naturaleza desconocida. Para obtener los mejores resultados la concentración final de pCMV β en contacto con las células EPC debía mantenerse en $\sim 1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$. Fuera de estos estrechos límites de concentración del pCMV β /fugene, el nivel de transfección desciende a valores de fondo.

Un método simple y reproducible para transfectar células de pez como el estudiado en este trabajo, así como un ensayo altamente sensible gracias al substrato empleado, ha servido para estudiar las distintas variables implicadas en la entrada del ADN a las células de pez, ha confirmado el modelo basado en las células EPC como un buen modelo para el ensayo de las construcciones empleadas para la expresión de proteínas codificadas por plásmidos en células de pez y nos ha orientado acerca de las condiciones y problemas en las que se realizarían los ensayos de fusión.

5.1.2. Mejora de las eficiencias de transfección. Inicialmente partíamos de una eficiencia de transfección media del 16% con un rango de 5-37% ($n=60$) (López et al., 2001). Se hizo un esfuerzo para aumentar esta eficiencia de transfección de cara a usar el ensayo para fusión después de transfectar EPC con plásmidos codificando mutantes de pG.

Dado que el 90-100% de los complejos ADN-liposoma transfectados entran en las células (Scherman et al., 1998; Tseng, Haselton, y Giorgio, 1999) pero no todos translocan a través del endosoma/lisosoma y núcleo, se han estudiado métodos para aumentar la eficiencia de transfección y su reproducibilidad en estos 2 pasos. Se han ensayado: la adición de agentes lisosomotrópicos que controlan la disminución de pH en los lisosomas (Ciftci y Levy, 2001; Lam y Cullis, 2000; Luthman y Magnusson, 1983) y el control de la mitosis para facilitar la entrada del ADN al núcleo (Brunner et al., 2000; Chan et al., 1998; Escriou et al., 2001; Mortimer et al., 1999; Tseng, Haselton, y Giorgio, 1999).

Ya que los agentes lisosomotrópicos evitan la disminución de pH del lisosoma y la posible degradación del ADN introducido en células de mamífero (Morales, Zhao, y LeFrancois, 1999), se ensayó el uso de: calcio (Haberland et al., 1999; Lam y Cullis, 2000), cloroquina (Bettinger et al., 2001; Luthman y Magnusson, 1983) y cloruro amónico (Ciftci y Levy, 2001) en la eficiencia de transfección de células EPC. Sin embargo ninguno de los compuestos mencionados aumentaba el porcentaje de células EPC teñidas con Xgal. de un modo reproducible Este resultado sugiere que los complejos ADN-fugene no

pasan por la ruta endosoma/lisosoma, no hay degradación del ADN a través de esa ruta o no hay efecto de los compuestos analizados en esa degradación.

Los primeros experimentos demostraron que la eficiencia de transfección era dependiente tanto de la concentración celular como del tiempo transcurrido desde que se inicia el cultivo (Figura 14AB), lo que sugería una dependencia directa del ciclo celular. Dicha dependencia fue demostrada por el aumento de unas 2 veces en la eficiencia de transfección cuando se añadían antes de la transfección tanto colchicina durante 15 h (34% del ciclo celular) como timidina durante 5 h (11% del ciclo celular) (Figura 14). Resultados muy similares aunque diferentes en el número de h de los tratamientos con colchicina o timidina se habían encontrado ya en células de mamífero (Brunner et al., 2000; Escriou et al., 2001; Mortimer et al., 1999; Tseng, Haselton, y Giorgio, 1999).

5.1.3. Eficiencia de distintos promotores. Utilizando el promotor de citomegalovirus (CMV) se consiguieron mayores eficiencias de transfección que con el de SV40 (datos no mostrados). Ahora bien, aunque todos los promotores comerciales de CMV poseen un mínimo de 100 pb, difieren en la longitud de sus secuencias 5' (Tabla 4), por lo que se ensayaron distintos promotores de CMV. Al ensayar los plásmidos pCMV β y pMOK β gal, se demostró un aumento de 2-3 veces en la expresión de β gal cuando se utilizó el plásmido con mayor longitud de secuencias 5' (pMOK β gal). El aumento de expresión de β gal estimado por luminiscencia podía llegar a ser de 10 veces (Figura 15), sugiriendo que el uso del promotor largo no solo aumentaba el porcentaje de células que expresaban β gal sino también la expresión por cada célula transfectada. Además, en algunos experimentos el aumento de transfección permitía visualizar monocapas azules. Sin embargo, el porcentaje de células transfectadas permanecía variable de experimento a experimento.

Un derivado más pequeño del pMOK, el denominado pMCV1.4, también era capaz de aumentar la eficiencia de transfección. Puesto que este derivado contenía además un sitio múltiple de clonaje, fue el plásmido elegido para subclonar los mutantes de la pG obtenidos en el plásmido pGEMTeasy para experimentación con genética reversa. La comparación de secuencias entre los 3 plásmidos (Tabla 4), permite concluir que la diferencia esencial está en los 218 pb adicionales que posee el promotor de CMV en los pMOK/ pMCV1.4. Ni el tamaño (el pMOK β gal es del mismo tamaño que el pCMV β), ni las secuencias bacterianas comunes a los 3 plásmidos son responsables de las diferencias observadas.

Por lo tanto, usando el gen β gal insertado en pMCV1.4 y efectuando la transfección con células tratadas con cloroquina o timidina se ha aumentado 2-4 veces la eficiencia de transfección de partida. Los estudios de expresión heteróloga en peces transgénicos (Chen et al., 1995; Chourrout, Guyomard, y Houdebine, 1986; Walker et al., 1995), los ensayos cuantitativos de fusión viral con pG transfectada objeto de este estudio tal y como se hace en mamíferos (Coll, 1999a; Fernandez-Alonso y Coll, 1999; Nussbaum, Broder, y Berger, 1994; Shokralla, Chernish, y Ghosh, 1999) y la síntesis de rbdovirus ARN negativo de peces infeccioso a partir de su cADN (Biacchesi et al., 2002; Biacchesi et al., 2000a; Biacchesi et al., 2000b; Estepa et al., 1999), se beneficiarán de la optimización de la eficiencia de transfección de la línea celular EPC (la más utilizada para estos tipos de experimentación). Por otra parte, la aplicación de estos resultados pueden servir para optimizar vectores para su uso en vacunación ADN tanto por inyección (Anderson, Mourich, y Leong, 1996; Lorenzen et al., 1998b), como por inmersión (Fernandez-Alonso et al., 1999a, Fernandez-Alonso, 2000 #2074; Fernandez-Alonso et al., 1998; Fernandez-Alonso, Rocha, y Coll, 2001).

5.1.4. Optimización del ensayo de formación de sincitios. Después de los experimentos preliminares, se concluyó que para que el ensayo de formación de sincitios sirviera para cuantificar la fusión inducida por la transfección y expresión de la pG, era necesario obtener una mayor eficiencia de transfección y una alta adherencia de las monocapas de células EPC. Para la transfección se utilizaron las condiciones optimizadas discutidas anteriormente. Para la adherencia se realizaron los ensayos a pH 6 en vez de a pH 5.6 y se utilizaron monocapas de al menos 24 h después de iniciado el cultivo, ya que se demostró que eran más estables que las monocapas más jóvenes.

Alrededor de un 25-35 % de las células EPC de la monocapa se transfectaron reproduciblemente y un porcentaje similar expresaban pG en su membrana. Puesto que número máximo de núcleos en sincitios que se obtuvieron fue de ~ 30%, es muy posible que no todas las células EPC transfectadas sean capaces de fusionar, pero la cantidad de sincitios fue suficiente para efectuar el ensayo.

En presencia de ascitis de ratón o sueros de trucha inmunizados con VSHV, el número de núcleos en sincitios se reducía hasta valores de fondo en contraste con los obtenidos en presencia de ascitis o sueros de animales control. Estos datos demostraban por una parte que la fusión es debida a la expresión de pG en la membrana de las células transfectadas y que el ensayo de formación de sincitios de células transfectadas con pG

podía usarse para ensayo de fusión de VSHV así como para ensayo de anticuerpos anti-fusión (de importancia práctica para test de campo).

Aunque los AcP anti-VSHV, los AcP anti-frg#11, los AcM neutralizantes y los sueros de trucha con alto título de neutralización mostraron también los títulos más altos de inhibición de la fusión, fue difícil reducir la fusión al 0 % (Estepa et al., 2001). Este fenómeno podría deberse a que el cambio de conformación inducido por el pH es muy rápido y dificulta el reconocimiento y reacción con los Acs.

5.1.5. Aplicación a la detección de anticuerpos anti-VSHV en ausencia de VSHV. Las rabdovirus de peces, incluyendo la producida por VSHV, son una de las enfermedades infecto-contagiosas más devastadoras en la acuicultura de salmónidos (Lorenzen et al., 2000), siendo el transporte de peces vivos una de las maneras más comunes de diseminación de la enfermedad (DeKinkelin et al., 1995).

Los métodos tradicionales basados en los ensayos de neutralización requieren el uso de rabdovirus vivos y ello no se permite en todos los países (Jorgensen et al., 1991; Lorenzo, Estepa, y Coll, 1996). Por otra parte, todavía existen problemas técnicos para detectar los Acs anti-VSHV por ELISA basados en captura por VSHV (Olesen, Lorenzen, y Vestergaard-Jorgensen, 1991) o por pG/frg#11 recombinantes (Rocha et al., 2002a) en fase sólida. Por todo ello, el uso de la inhibición de la formación de sincitios podría aplicarse a la detección de Acs anti-VSHV en portadores asintomáticos (Lorenzen, Olesen, y Koch, 1999), sobre todo en aquellos países en los que no se permite usar rabdovirus vivos, por no haberse detectado en ellos estas infecciones.

Para ser usado como un ensayo de Acs anti-VSHV, el ensayo debería experimentarse con un mayor número de sueros de trucha y establecer las correlaciones correspondientes con otros métodos, lo que no es objeto de este estudio. En este trabajo, sin embargo se ha demostrado la posibilidad de poner a punto esta alternativa.

Debido a que los Acs de trucha anti-fusión de VSHV no se han ensayado antes, también se desconoce la importancia que puedan tener en la respuesta defensiva contra la enfermedad. La detección de dichos Acs podría ser útil en unión con otros métodos de detección de Acs neutralizantes y no neutralizantes de VSHV en sueros de trucha para ayudar al desarrollo de nuevas vacunas. La estimación de Acs anti-fusión podría ayudar a entender las complejas respuestas inmunológicas de la trucha a las infecciones de VSHV y a la vacunación ADN (Lorenzen et al., 2002b). Ensayos similares también podrían utilizarse en otros rabdovirus de peces tales como el VNHI o el SVCV.

5.2 SELECCIÓN DE LOS SEGMENTOS Y MUTANTES

A pesar de las diferencias en las secuencias de aminoácidos el alineamiento de 14 secuencias de proteína G igualmente representativas de 4 géneros de rabdovirus animales (*Vesiculovirus*, *Lisavirus*, *Efemerovirus* y *Novirabdovirus*) (Walker y Kongsuwan, 1999), puso de manifiesto que existen zonas conservadas en la región del ligamiento de fosfolípidos (frg#11) y péptido de fusión (Figura 6, 7 y 8). Entre las semejanzas más importantes que pueden encontrarse entre todos los rabdovirus están:

(i) las regiones de ligamiento de fosfolípidos están flanqueadas por 2 cisteínas: C:I y C:III, (C:I unida a C:XII, que en el VSHV se corresponde con C64-C315 y C:III unida a C:V, que en el VSHV se corresponde con C110-C152) (Einer-Jensen et al., 1998),

(ii) el péptido de fusión tiene una cisteína C:V que le une a otro dominio amino terminal, que en el caso de VSHV es el identificado como el de ligamiento de fosfolípidos,

(iii) existen G y P conservadas, como la P65 y la G98 (en VSHV) y también está conservado el motivo (F,Y)PXPXXCX(W,Y) en el péptido de fusión,

(iv) todas contienen perfiles hidrófilos/hidrófobos similares (Figura 8) y,

(v) existe un dominio hidrófilo de 25 a 45 aa, con una media de 26 % aa cargados, localizado entre los dominios de ligamiento de fosfolípidos y del péptido de fusión (Figura 8).

La comparación entre las secuencias de 22 aislados de VSHV mostró muy pocas variaciones, restringidas fundamentalmente a la posición 81 en la mitad del frg#11 (separación entre p9 y p2) y la posición 136 en el bucle hidrófilo (adyacente a los mutantes MAR del AcM neutralizante C10 y a la secuencia parcial de los péptidos incrementadores de la infección), demostrando que los motivos estructurales de esta región están muy conservados (C, P, G, heptadas hidrófobas y R).

Para estudiar la relación de esta región (aa 56-159) con la fusión de VSHV, se seleccionaron y se sintetizaron por separado 4 segmentos que rodean al principal dominio de ligamiento de fosfolípidos, el segmento p2 (aa 82-109) identificado en trabajos anteriores (Estepa y Coll, 1996a). La selección se efectuó de acuerdo con sus diferentes características de hidrofiliidad/hidrofobicidad y otras consideraciones. Los

segmentos seleccionados fueron del amino al carboxilo: p9 (aa 58-80), p2, frg#11 (p9+p2, frg#11 aa 56-110), p3 (aa 110-122) y p4 (aa 123-144). Sus secuencias y posiciones relativas pueden encontrarse en las Figuras 4A, 4B, 8 y 9

El segmento p9 se eligió por contener la otra mitad de las heptadas repetidas parcialmente presentes en el segmento p2 y por poseer un extremo amino terminal polar con características simétricas a la del p2. El segmento p2, por ser el dominio principal de ligamiento de fosfolípidos. Los péptidos p9 y p2 se encuentran separados por la posición 81, intermedia entre ambos y es una de las pocas posiciones variables entre las cepas de VSHV, por ese motivo el frg#11 (aa 56-110) se eligió como la unión del p9 y del p2. El p3 constituye una región hidrófoba cuya secuencia es idéntica en todos los rhabdovirus de peces de agua fría (VSHV, VNHI y HIRV) (Walker y Kongsuwan, 1999). Y por último, el segmento p4 se corresponde con una región hidrófila que contiene uno de los residuos (K140) que varía en los mutantes resistentes al anticuerpo monoclonal neutralizante C10 (Bearzotti et al., 1995; Gaudin, DeKinkelin, y Benmansour, 1999) y 3 residuos (E133, A134 y T135) que aparecen en el péptido incrementador de fusión (Mas et al., 2002).

Una vez seleccionados los segmentos en los que se dividió la región estudiada se analizaron las posibles mutaciones a introducir en el dominio p2 de ligamiento de fosfolípidos (ensayo de ligamiento de fosfatidilserina (PS) marcada en fase sólida) (Estepa y Coll, 1996b) y en toda la región (ensayos de fusión de células transfectadas con plásmidos mutados en la pG) (Shokralla, Chernish, y Ghosh, 1999; Shokralla et al., 1998) (Figura 9).

Se eligieron todas las posiciones de la parte carboxi terminal del p2 para sintetizar péptidos mutantes individuales de sustitución por A, así como variaciones en su cabeza polar, introducción de P y sustitución por varias A. Al coincidir la posición 96 con una A, en su lugar se introdujo el mutante S97N presente en un 27 % de los aislados de VSHV y en un 60 % de los aislados de peces marinos.

La elección de las mutaciones puntuales a lo largo de la región potencialmente implicada en la fusión fueron:

(i) las mutaciones P59A, P79A, P86A, G98A y P86AG98A, debido a la importancia en la estructura de las proteínas y a que formaban “codos” según indicaban los modelos construidos con la secuencia con programas de ordenador,

(ii) las mutaciones R103A y R107A que son posiciones potencialmente implicadas en las interacciones iónicas entre el p2-PS,

(iii) en varias posiciones de las heptadas hidrófobas repetidas del frg#11, como I82S, L85S, V92S A96E y G98AH99S, potencialmente implicadas en una estructura de hélice alfa anfipática (aa hidrófobo a So E),

(iv) en F115K por ser una de las 3 posiciones más hidrófobas y más conservadas en todos los rabdovirus del dominio p3 (Figura 7),

(v) en T135E debido a que era una de las posiciones con homología al péptido incrementador de fusión del VSHV (Mas et al., 2002), y

(vi) en F147K, P148K y W154K, situados en el péptido de fusión, debido a que en VSV se habían obtenido mutantes deficientes en fusión en posiciones homólogas (Jeetendra et al., 2002; Li et al., 1993; Shokralla et al., 1998; Whitt et al., 1990; Zhang y Ghosh, 1994), y a que estaban localizadas en el motivo conservado en todos los péptidos de fusión de rabdovirus animales (**E**,Y)**P**XPXXC**X**(**W**,F) (Figura 7).

5.3 PROPIEDADES DE LOS SEGMENTOS SELECCIONADOS

5.3.1. Evidencias anteriores de las relaciones de los segmentos con la fusión.

Existen evidencias, que sugieren que los dominios homólogos al p2 en otros rabdovirus están relacionadas con la fusión. Por ejemplo, entre los dominios que se han encontrado fotomarcados por lípidos reactivos incorporados a membranas, se encuentran los aa 74-237 de VSV y los aa 122-198 de VR (Durrer et al., 1995; Gaudin, Ruigrok, y Brunner, 1995). Estos dominios fotomarcados incluyen a las heptadas hidrófobas repetidas amino terminales en ambos rabdovirus (Coll, 1995b). Además, la localización de los mutantes defectivos en fusión de VSV identificó el segmento aa 123-137 como el péptido de fusión (Fredericksen y Whitt, 1995; Li et al., 1993; Whitt et al., 1990; Zhang y Ghosh, 1994). El que la región de máxima interacción con fosfolípidos aniónicos de la pG pudiese ser relevante para la fusión del VSHV (Coll, 1995c), lo sugirió el requerimiento de bajo pH de AcP anti-p2 para: reconocer p2 y VSHV (Estepa y Coll, 1996b), inhibir el ligamiento de fosfatidilserina a VSHV (Estepa y Coll, 1996a) e inhibir la fusión célula-célula de EPC infectadas con VSHV (Estepa y Coll, 1997). Por otra parte, p2 inducía agregación de vesículas, aposición de membranas y desestabilización de bicapas de fosfolípidos aniónicos, todos los pasos que se requieren para la fusión (Nuñez et al., 1998). Además el ligamiento de fosfolípidos aniónicos y la fusión mostraban perfiles de dependencia de pH idénticos (Estepa y Coll, 1996a). Por otra parte las mutaciones en los aa hidrófobos de las heptadas repetidas de la pG de varios paramixovirus (Rapaport,

Ovadia, y Shai, 1995; Reitter, Sergel, y Morrison, 1995; Sergel-Germano, McQuain, y Morrison, 1994), baculovirus (Monsma y Blissard, 1995), HIV (Wild et al., 1994) y virus de la leucemia murina (Ramsdale, Kingsman, y Kingsman, 1996), inhibían la fusión sugiriendo que no solo el péptido de fusión es importante para la fusión sino también los segmentos adyacentes a él (Reitter, Sergel, y Morrison, 1995). Aunque todavía no existe evidencia de que la interacción PS-p2 sea relevante en la entrada viral, todos los descubrimientos anteriores soportan la hipótesis de que los dominios p2 de la pG de rabdovirus podrían jugar un papel central en los procesos fusogénicos de los rabdovirus.

5.3.2. Participación del frg#11/p2 en la fusión del VSHV. De todos los segmentos seleccionados para este estudio: p9, p2, p3, p4 y frg#11 (p9+p2), el frg#11 fue el único capaz de inducir fusión de monocapas de células EPC (Figura 10). A los datos obtenidos en este trabajo, se añade su actividad específica más alta en su interacción con fosfolípidos aniónicos y su capacidad de translocar fosfatidilserina en la membrana desde la cara más interna (Mas et al., 2002). Además, la inhibición con anti-frg#11 de la fusión célula-célula de monocapas celulares transfectadas con pG a bajo pH también confirmaba la implicación de este segmento en la fusión (Figura 21).

En trabajos en colaboración, se ha demostrado por Infrarrojos (IR) y Dicroísmo Circular (DC) (Estepa y Coll, 1996a; Nuñez et al., 1998), que el frg#11 adopta diferentes conformaciones dependientes del pH, tal y como sugería la disminución de su solubilidad al aumentar el pH, fenómeno que resultó reversible (datos no mostrados). Además, aunque el ligamiento de PIPP (Figura 9A) confirmó la especificidad de p2 en el ligamiento de fosfolípidos aniónicos (Estepa y Coll, 1996a; Nuñez et al., 1998), el frg#11 era más activo en la agregación de fosfolípidos aniónicos que el p2 (Mas et al., 2002). Estas interacciones no tenían lugar con fosfolípidos neutrales indicando la especificidad de la agregación y la importancia de sus componentes electrostáticos..

Todos los resultados comentados con anterioridad demuestran que mientras que el p9 en la parte amino-terminal del frg#11, añade las interacciones péptido-péptido causantes de la agregación del frg#11 a pH neutro, las interacciones con fosfolípidos aniónicos están restringidas al p2 en la parte carboxi-terminal del frg#11. Los resultados obtenidos en este trabajo junto a los descritos anteriormente también sugieren que la correspondiente estructura del frg#11 en la pG podría estar enterrada en la estructura global de la pG o implicada en la formación de los trímeros de pG a pH neutro. Cuando el

pH disminuye, los cambios conformacionales en la pG no solo afectan al frg#11 adoptando una estructura β , sino que además deben de afectar a regiones más amplias de la pG debido a que el frg#11 está flanqueado por C64 y C110 formando puentes disulfuro con otras regiones distantes (Einer-Jensen et al., 1998). En VSV se han demostrado cambios más amplios de conformación durante la fusión que los del péptido de fusión aa 117-137 (Zhang y Ghosh, 1994). Dichos cambios se han confirmado para los dominios aa 395-418, aa 451-461 y secuencia transmembranal carboxi terminal de la pG (Jeetendra et al., 2002; Odell et al., 1997; Shokralla et al., 1998).

Los cambios conformacionales inducidos por la disminución de pH exponen el p2 a la superficie de la pG, tal y como demuestran la dependencia de $\text{pH} \sim 5$ de: (i) su reconocimiento por Ac anti-p2 (Estepa y Coll, 1996a) y (ii) de la inhibición de la formación de sincitios en células transfectadas con AcM anti-G (Figura 12A), AcP anti-VSHV (Figura 12B), Ac de trucha anti-VSHV (Figura 21) y los Ac anti-p2 y anti-frg#11 (Figura 20). A bajo pH, el dominio del frg#11 en la pG puede convertirse en una estructura totalmente extendida, toda β , al interaccionar con los fosfolípidos de la membrana tal y como se demuestra que ocurre en el frg#11 recombinante (Estepa y Coll, 1996a; Nuñez et al., 1998). La transición del frg#11 hacia el estado de bajo pH podría explicarse porque las histidinas presentes en posiciones 66, 84, 99 y 102 atrapan protones. La exposición de una estructura hidrófoba no identificada enterrada en la estructura nativa de la pG con la disminución del pH, se ha descrito también en VR (Gaudin et al., 1999b) y en VSV (Lenard, 1993).

El péptido p2 tiene muchas características de los péptidos de fusión. Por ejemplo, los péptidos de fusión: (i) poseen entre 15 a 25 aa de longitud, (ii) son relativamente hidrófobos, (iii) pueden modelarse como alfa hélices anfipáticas (heptadas repetidas), (iv) tienen residuos de P que rompen las alfa hélices en su centro y (v) los péptidos sintéticos derivados de los péptidos de fusión adoptan estructuras de alfa-hélice o lamina β cuando se encuentran dentro de las membranas (White, 1992). Todo lo antes mencionado sugiere que en VSHV y probablemente en otros rabdovirus, existen 2 péptidos de fusión o un péptido de fusión constituido por 2 dominios unidos por un puente disulfuro, el p2 y el péptido de fusión homólogo al ya identificado por mutantes defectivos en fusión en la pG de VSV.

Hay que resaltar el hecho de que la adición de frg#11 a monocapas de EPC a bajo pH sea capaz de causar fusión celular en ausencia del resto de la molécula de pG (Figura 10E). Aunque la adición de p2 a bajo pH a una monocapa de EPC expandía las células

(probablemente debido a su inserción en la membrana)(Nuñez et al., 1998), solo la adición del frg#11 inducía tanto la expansión (Figura 11A) como la fusión célula-célula (Figura 11C, E), sugiriendo que la diferencia observada es causada por la presencia del p9. Por otra parte, es difícil imaginar como el frg#11 sin la ayuda del p9, podría translocar PS de uno a otro lado de la membrana (Mas et al., 2002). Ahora bien, el frg#11 era 200 veces menos eficiente que la pG en inducir fusión aunque esta actividad específica es probablemente 3-6 veces mayor debido a la insolubilidad del frg#11. Es decir, los resultados comparativos de eficiencia de fusión entre frg#11 y pG, también sugieren que la fusión del VSHV requiere no solo el frg#11 sino también otros dominios de la pG, confirmando lo comentado con anterioridad para el VSV (Odell et al., 1997; Shokralla et al., 1998; Zhang y Ghosh, 1994).

Puesto que una molécula de p2 interacciona con 15-17 moléculas de fosfolípidos aniónicos (Nuñez et al., 1998) y $\sim 1/20$ es la relación molar para formar agregados entre el frg#11 y los fosfolípidos aniónicos (Mas et al., 2002), podemos especular sobre el número de moléculas que podrían participar en el proceso de fusión a través de los trímeros de pG. Si en VSHV ocurre lo mismo que en VR en que el complejo mínimo de fusión se ha estimado en 6 trímeros (Gaudin et al., 1999b; Roche y Gaudin, 2002), la penetración de p2 en las membranas provocaría una concentración local de 6x3 dominios de p2 y por lo tanto de 270 a 360 fosfolípidos aniónicos por cada complejo de fusión. La translocación de todas esas moléculas de fosfolípidos aniónicos de la membrana interior a la exterior causaría una poderosa desestabilización local en la membrana que ayudaría al proceso de fusión (Budker et al., 1996).

5.3.3. Respuesta inmunológica de la trucha al frg#11. A pesar de diferentes estrategias de inmunización con diferentes formas de preparación del antígeno pG de VSHV y la variación de títulos de neutralización de los correspondientes antisueros, el análisis de reactividad frente al pepscan de la pG puso de manifiesto que la región alrededor del aa 100 es antigénica en un 40% de las truchas ensayadas (Fernandez-Alonso et al., 1999c).

Complementando trabajos iniciados anteriormente (Fernandez-Alonso, 2000), en este trabajo se ha confirmado que los sueros de truchas inmunizadas contra el VSHV generan una respuesta inmunológica frente al frg#11, sugiriendo que las mutaciones en esa región podrían utilizarse no solo para atenuar el VSHV sino también para inmunizar las truchas correspondientes. Sin embargo es de hacer notar que los sueros de trucha

inmunizada contra VSHV que reaccionan más fuertemente frente al frg#11 son precisamente aquellos que tienen una menor actividad neutralizante (Figura 22A). Además aunque la mayoría de los 46 sueros de truchas inmunizadas con G3-pcDNAI/Amp tenían Acs anti-frg#11 (Figura 22B), ninguno tenía títulos de neutralización detectables (resultados no mostrados) aunque el 50% de estas truchas quedaban protegidas frente a la contraprueba con VSHV (Fernandez-Alonso, Rocha, y Coll, 2001). Todos estos resultados sugieren por lo tanto, la complementariedad de los 2 tipos de respuesta (neutralizante y anti-frg#11) para la inmunización de las truchas frente a VSHV.

Desde un punto de vista práctico, el frg#11 podría usarse para detectar Acs anti-frg#11 en vez del G4 recombinante que se había empleado en estudios anteriores (Estepa, Thiry, y Coll, 1994). La producción de frg#11 recombinante es más fácil y reproducible que la de G4. Por ejemplo, la disolución de los cuerpos de inclusión que la G4 forma en la levadura es complicada y la pureza obtenida es de sólo un 48 % (Estepa, Thiry, y Coll, 1994) frente a un 90 % que puede obtenerse fácilmente en el frg#11. Junto con las mencionadas razones, el ELISA utilizando frg#11 tiene una alta sensibilidad y un bajo fondo, por lo que se podría poner a punto un método reproducible de estimación de anticuerpos anti-frg#11.

Efectivamente, debido a que los sueros de trucha se ligan inespecíficamente a muchas superficies y proteínas (Jorgensen et al., 1991; Olesen, Lorenzen, y Vestergaard-Jorgensen, 1991), ha sido imposible el desarrollo de ELISAS basados en VSHV purificado o capturado por AcM para la detección de anticuerpos anti-VSHV. Además, la utilización del frg#11 (peso molecular de 10355 Da) aumenta la densidad epitópica respecto a la utilización de VSHV o incluso de G4 (50000 Da), por lo que la sensibilidad aumenta 4-5 veces.

Se necesita una evaluación más rigurosa de los resultados de este test para su utilización como posible método de diagnóstico. Sin embargo queda demostrada la antigenicidad del frg#11 y por lo tanto la posibilidad de utilizar mutantes atenuados en esta región para inmunizar truchas

5.4. ANALISIS DE LOS MUTANTES

El análisis de los mutantes en la región estudiada incluye: péptidos p2 sintéticos mutantes y pG alterada por mutagénesis dirigida. Los 15 péptidos mutantes se obtuvieron en el dominio p2 de ligamiento de fosfolípidos entre las posiciones 93 a 107. Se analizaron sus propiedades por ensayo de ligamiento de fosfatidilserina marcada en fase sólida (Estepa y Coll, 1996b) (Figura 23). Los 15 mutantes en la pG en el frg#11, en p3, p4 y en el péptido de fusión se analizaron por expresión en el citoplasma (Figura 24) y en la membrana (Figura 25) y por ensayos de formación de sincitios (Figura 26) de células transfectadas con los plásmidos mutados (Shokralla, Chernish, y Ghosh, 1999; Shokralla et al., 1998) (Tabla 11).

La interacción con fosfatidilserina no parece alterarse significativamente en ninguno de los 15 péptidos mutantes analizados, con excepción de las posiciones 96 y 102 en las que se incrementa débilmente su capacidad de ligamiento. La capacidad de interacción del p2 con los fosfolípidos aniónicos de las membranas, parece no depender de la secuencia de aa sino de la presencia de un cierto número de aa hidrófobos, si bien esta situación pudiera ser diferente en un contexto de secuencia más amplio tal y como se da en la estructura tridimensional de la pG.

Por otra parte, se diseñaron e intentaron obtener 24 mutantes diferentes en la región seleccionada de la pG. Se obtuvieron 19 mutantes en la pG clonada en el plásmido pGEMTeasy-G y 16 de ellos finalmente se subclonaron al plásmido pMCV1.4. Los 16 mutantes obtenidos se expresaban en el citoplasma de células EPC transfectadas y también en sus membranas, excepto el I82S (Figura 25). La formación de sincitios podía pues interpretarse en función de las mutaciones introducidas en 15 de los mutantes obtenidos. De estos 15 mutantes, 11 resultaron afectados en la fusión y otros 4 (P79A, L85S, R103A y T135E) eran capaces de fusionar sí bien con menor actividad que el no mutante (54, 23, 63 y 32 % del no mutante, respectivamente) (Figura 26 y Tabla 11).

Los mutantes localizados en el péptido de fusión **(F,Y)PXPXXCX(W,F)** (posiciones F147, P148 y W154 en VSHV) homólogo al identificado en VSV (Jeetendra et al., 2002; Li et al., 1993; Shokralla et al., 1998; Whitt et al., 1990; Zhang y Ghosh, 1994), fueron incapaces de formar sincitios, tal y como se esperaba (Figura 26 y Tabla 11). Este triple dato aporta un importante control para la interpretación de los resultados de formación de sincitios obtenidos con el resto de los mutantes en el dominio de ligamiento

de fosfolípidos donde nunca antes habían sido ensayados ni en VSHV ni en ningún otro rabdovirus.

Por primera vez, se describen en este trabajo mutantes defectivos en fusión (P86A, G98A, A96E, R107A, P86AG98A y G98AH99S), situados en el dominio de ligamiento de fosfolípidos. Tal y como se describió en trabajos anteriores, el dominio p2 del VSHV se localiza dentro de la membrana durante la fusión a pH 5 (Nuñez et al., 1998). Todos estos resultados sugieren que las mutaciones que afectan a la fusión podrían ser aquellas localizadas en posiciones que se mantienen dentro de la membrana durante la fusión. Confirma esta hipótesis, la no alteración de la fusión en el mutante T135E, situado en el p4 altamente hidrófilo y que por lo tanto tiene muy bajas probabilidades de interactuar con los lípidos de la membrana. La posición T135 junto con las posiciones aa 88-96 son homologas al péptido incrementador de la fusión-infección del VSHV (Mas et al., 2002), pero se necesita una mayor experimentación para esclarecer una posible relación entre ambos hechos.

Si la alteración de la capacidad de fusión de una mutación en una posición de pG depende de su localización membranosa durante la fusión, el mutante L85S (débilmente fusogénico) perteneciente a la parte amino terminal del p2 y el P79A, estarían ya fuera de la membrana, así como el R103A que constituiría uno de los “codos” necesario para que una región de la pG penetrara en la membrana sin necesidad de cortes internos. En esta hipótesis, la defectividad en fusión del mutante P65A sería debida a que el dominio p9 volvería a interactuar con la membrana.

En la región del p3, la no-fusión en la posición 115 (mutante F115K), una de las 3 posiciones más hidrófobas y más conservadas en todos los rabdovirus (Figura 7), sugiere su localización dentro de la membrana, tal y como es necesario suponer si tanto el p2 como el péptido de fusión están dentro de la membrana.

5.5. MODELO PROPUESTO

Del estudio de: los mutantes defectivos en fusión del VSV (Shokralla et al., 1998; Zhang y Ghosh, 1994), los AcM neutralizantes a bajo pH en VR (Flamand et al., 1993) y la variación del pH óptimo de fusión en mutantes MAR de VSHV (Gaudin, DeKinkelin, y Benmansour, 1999), se ha podido identificar la posible localización del péptido de fusión en otros rabdovirus por alineamiento de secuencias (Walker y Kongsuwan, 1999).

Del estudio de ligamiento de fosfatidilserina en fase sólida se ha identificado en VSHV el dominio p2 de ligamiento de fosfolípidos en la región amino terminal de la pG de VSHV (Estepa y Coll, 1996a; Nuñez et al., 1998). Basándose en estos datos y por alineación con otros 14 rabdovirus animales se han localizado dominios homólogos en otros rabdovirus incluido el VSHV (Walker y Kongsuwan, 1999). Sin embargo, hasta la realización de este trabajo no existía todavía una confirmación para la función precisa de estos dominios o de otros adyacentes a ellos en VSHV, ni un mecanismo o modelo para explicar los cambios de conformación en la estructura durante la fusión en cualquier otro rabdovirus (Delos, Gilbert, y White, 2000), debido a la falta de mutantes en las regiones adyacentes al péptido de fusión.

Cualquier modelo de cambios en la estructura de la región amino terminal de la pG durante la fusión tiene que tener en cuenta que contrariamente a otros virus con envuelta, la pG de VSHV (como la pG de cualquier otro rabdovirus) no sufre procesamiento proteolítico para insertar su péptido de fusión en la membrana y que por lo tanto el péptido de fusión permanece interno a la estructura de la pG durante la fusión. Como consecuencia, los cambios conformacionales inducidos por la disminución del pH son reversibles al neutralizar el pH. Además el péptido de fusión contiene una cisteína C (Walker y Kongsuwan, 1999) lo que indica la existencia de un puente disulfuro con otro dominio (Einer-Jensen et al., 1998) y por lo tanto la probable participación de este otro dominio en la fusión.

Una inserción reversible de un péptido de fusión interno requiere una estructura en forma de U durante la fusión para poder penetrar en la membrana. Después de realizar distintas construcciones de la región con programas de ordenador, la estructura lamina β del frg#11 (aa 56-110) cumple estas expectativas para un péptido de fusión interno debido a que la localización de sus prolinas P induce las dobleces necesarias. Puesto que por alineamiento de secuencias con el péptido de fusión identificado en VSV, la región aa 142-159 del VSHV es el péptido de fusión más probable (Walker y Kongsuwan, 1999) y el dominio p2 del frg#11 penetra en la parte hidrófoba de la membrana con una estructura

lamina β extendida (Nuñez et al., 1998), la penetración del p2 arrastrará tanto al p3, como al péptido de fusión debido al puente disulfuro C110-C152 (Einer-Jensen et al., 1998). Lo mismo sucedería si fuera la penetración del péptido de fusión la que arrastrara al dominio de ligamiento de fosfolípidos. Los resultados obtenidos por ligamiento de fosfatidil inositol-bisfosfato al pepsan de la pG en fase sólida confirman que tanto el p2 como el p3 y el péptido de fusión interactúan con fosfolípidos (Tabla 11). Por otra parte, las regiones p9 y p4 deberían permanecer fuera de la membrana de acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla 12). La falta de efectos en la fusión de los mutantes P79A y L85S (localizados al extremo carboxi terminal del p9 y del p2 respectivamente), confirma que el p9 y la parte carboxi terminal del p2 no participan activamente en la penetración de la membrana durante la fusión.

Todos estos resultados incluyendo los obtenidos con los mutantes sugieren que 2 dominios de la región amino terminal de la pG unidos por un puente disulfuro y formando una doble U están implicados en la fusión: El de ligamiento de fosfolípidos y el péptido de fusión (Figura 27).

Puesto que la presencia de heptadas repetidas predice una estructura de α -hélice para el frg#11 a pH 7 y los estudios biofísicos han demostrado que el frg#11 penetra en las membranas con una estructura lamina β a pH 5 (Estepa et al., 2001), el frg#11 podría adoptar una conformación de α -hélice en la pG a pH 7 y adoptar una estructura lamina β una vez que el p2 ha penetrado en la parte hidrófoba de la membrana a pH 5. Aunque no existen evidencias directas de que esto sea así, esta hipótesis estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en este y en anteriores trabajos.

La atracción electrostática entre los aa positivamente cargados del p2 y las cabezas negativamente cargadas de los fosfolípidos aniónicos internos de la membrana podrían favorecer la estructura lamina β del frg#11 a pH 5. Debido a que ni el p9 ni el p4 interactúan con los fosfolípidos (no hay ligamiento de PIPP) (Figura 10A), solo el p2 (Nuñez et al., 1998), el p3 (aa hidrófobos y ligamiento de PIPP) y el péptido de fusión (aa hidrófobos y ligamiento de PIPP) podrían entrar en el interior de las membranas. La interferencia con la penetración de las membranas por el frg#11/p2 podría explicar la inhibición de la formación de sincitios por Ac anti-frg#11/p2, mientras que la inhibición de cambios conformacionales necesarios para la fusión en p4 podría explicar la inhibición de la formación de sincitios por anti-p4 (Figura 21).

La existencia de este primer modelo de penetración de la región amino terminal de la pG de VSHV en la membrana puede utilizarse para diseñar nuevos experimentos que ayuden a entender mejor como realizan la fusión los rabdovirus sin proteólisis de su pG tal y como sucede en otros virus. Tal conocimiento ayudaría a diseñar moléculas que interfirieran con la entrada de los rabdovirus en las células. Además, la importancia de este estudio estriba en las posibilidades que ofrece de diseño de métodos terapéuticos y/o de vacunas. Se podrían diseñar productos químicos que interfirieran en la fusión, llegando a poder utilizarse como productos terapéuticos. Por otra parte, algunas de las mutaciones detectadas puede utilizarse en el diseño de mutantes múltiples que resultaran en la atenuación del virus y que se podrían utilizar para el desarrollo de vacunas vivas o de ADN

Tabla 12.

Evidencias experimentales publicadas y obtenidas en este trabajo que sustentan el modelo propuesto de interacción con la membrana de la región amino terminal de la pG de VSHV.

Tipo	Conclusión	Dato	Referencias
Alineación de secuencias	P59, P79, P86 y G98 C(frg#11)-C(PepFus) p4 hidrófilo p9,p2,p3,p4,Pfus P.Fus localizado en aa 142-159 Frg#11+P.fus función importante	Presencia conservada en rabd Puente disulfuro conservado en rabd 25-45 aa con 23 % aa cargados Hidrofilicidad/hidrofobicidad conservada (F,Y)PXPXXCX(W,F) conservado Muy conservados en 22 cepas de VSHV	Figura 5 Figura 5 (Walker y Kongsuwan, 1999) Figura 7 Figura 6 Figura 10
Interacción con FFLA	p2 se inserta en la Mem p2 máximo ligamiento de PS p9+p4 no-interacción con PS p2 y P.Fus intervienen en fusión Frg#11>p2 interacción con PS p2 máximo ligamiento PIPP/PI p3+P.Fus ligamiento PIPP/PI p9+p4 no-ligamiento PIPP/PI	Calorimetría de barrido Ligamiento en fase sólida DC Péptidos incrementadores de fusión Interacciones en fase líquida Ligamiento en fase sólida Ligamiento en fase sólida Ligamiento en fase sólida	(Nuñez et al., 1998) (Estepa y Coll, 1996a) (Estepa et al., 2001) (Mas et al., 2002) (Estepa et al., 2001) Figura 9A Figura 9A Figura 9A
Cambios de conformación	p2 a pH 5 todo lamina β Frg#11 a pH 5 todo lamina β Frg#11 solubilidad sólo a pH 5	DC DC Solubilidad	(Estepa y Coll, 1996a) (Estepa et al., 2001) Datos no mostrados
Propiedades biológicas	Frg#11 capaz de fusión Frg#11 capaz de fusión en pG	Inducción de la formación de sincitios Inhibición de sincitios por Acs anti-frg#11	Figura 10E Figura 11
Mutantes péptidos p2	p2 interacciona con PS CaPo de p2 interacciona con PS	S97N y H102A aumentan ligamiento PS EE y KK disminuyen ligamiento PS	Figura 22A Figura 22B
Mutantes Frg#11+P.Fus	p9 fuera Membrana H.Anfipática estructura a pH 7 P.Fus implicado en Fsin	P67A: pGmemb +, Fsin - Mutantes en aa hidrófobos: pGmemb-, Fsin - F147K: pGmemb+, Fsin -	Tabla 11 Tabla 11 Tabla 11

FFLA, fosfolípidos aniónicos. **Membrana**, membrana celular. **PIPP**, fosfatidil inositol bis fosfato. **P.Fus**, péptido de fusión. **DC**, dicroísmo circular. **pGmemb**, pG en membrana. **Fsin**, formación de sincitios. **H.Anfipática**, hélice anfipática. **CaPo**, cabeza polar. **Rabdos**, 4 géneros de rhabdovirus animales.

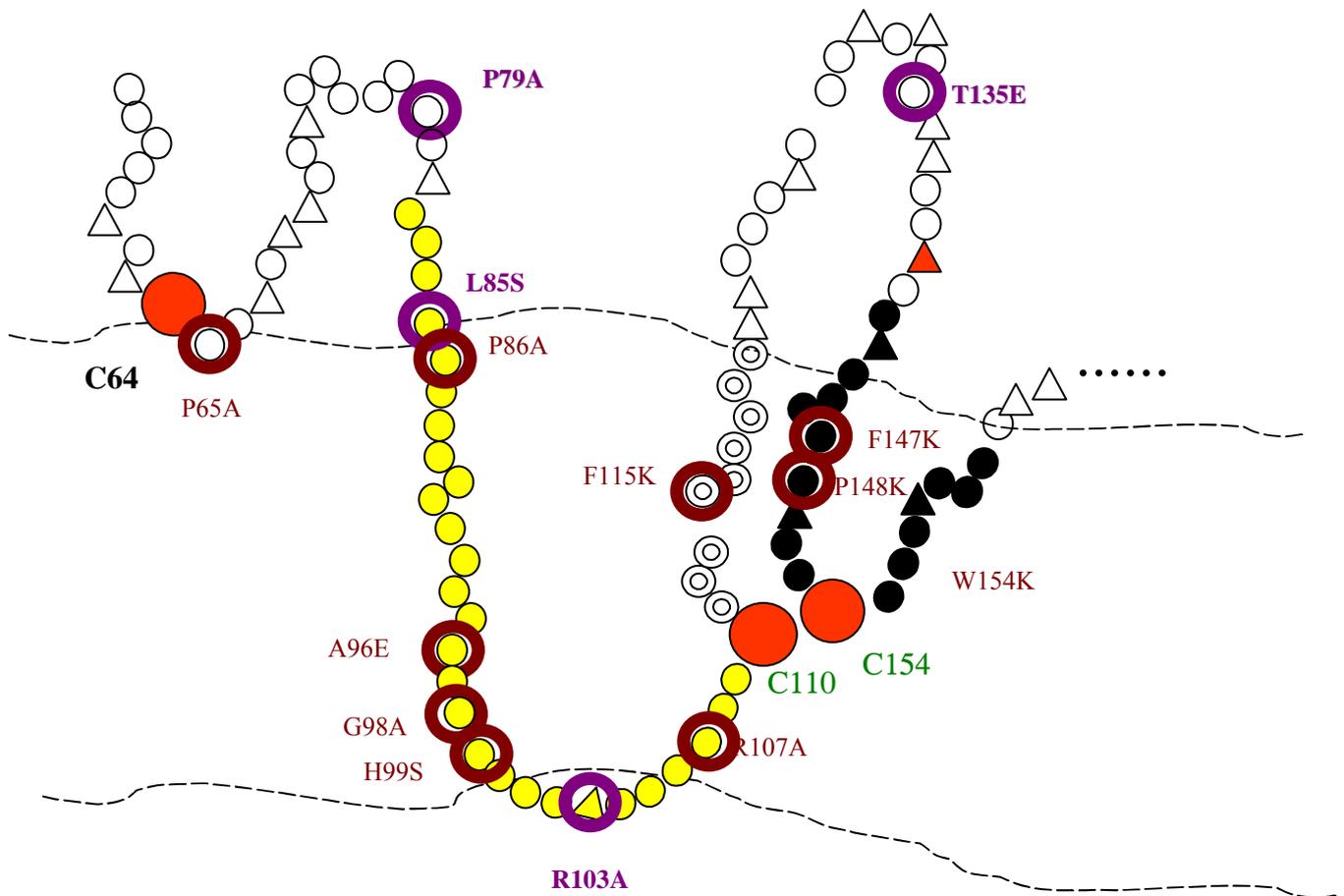


Figura 27 . Modelo propuesto para la región del aa 56-159 de la pG de VSHV cuando interacciona con la membrana de la célula huésped para su fusión posterior. Este modelo utiliza cada aa representado por un círculo o triángulo para esquematizar la siguiente hipótesis: i) el p2 coloreado de amarillo se introduce en la membrana impulsado por el cambio conformacional de la pG a bajo pH y por su afinidad por los fosfolípidos aniónicos situados en la parte interior de la membrana plasmática (esquemática por dos líneas de puntos), adopta una estructura en lamina β extendida. ii) el p2 arrastra al péptido de fusión (Gaudin, DeKinkelin, y Benmansour, 1999) en negro debido al puente disulfuro C110-C152, causando de esta forma una gran concentración de aa hidrófobos en el sitio de penetración. iii) el p9 y el bucle hidrófilo entre C110-C152 no penetran en la membrana. La proximidad del aa K140 () al frg#11 podría explicar la inhibición de la infección por el AcM C10. Solo se ha representado un monómero, en realidad esta estructura sería trimérica. Los λ son las cisteínas C64 (CI), C110 (CII) y C154 (CV). !, G98. Amarillo, dominio p2 que interacciona con fosfolípidos. Negro, péptido de fusión. , aa del p3. σ aa cargados.

El trabajo realizado permite extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha definido con precisión la región amino-terminal de la pG de VSHV que está implicada en la interacción con fosfolípidos y fusión con las membranas celulares.
2. Se han definido las condiciones óptimas y el promotor idóneo para transfectar monocapas de células EPC para su utilización en un ensayo de fusión de células transfectadas con el gen pG de VSHV. Las mejoras de eficiencia de transfección tendrán aplicaciones en la obtención de peces transgénicos, en la mejora de la obtención de VSHV ADN infeccioso y en la mejora de vectores para vacunación ADN. El ensayo de formación de sincitios también podría usarse para detectar Acs anti-VSHV para el diagnóstico de portadores asintomáticos en países que tienen prohibido el manejo de VSHV vivo.
3. Se ha descubierto que la mutación S97N presente en un 27% de las 22 cepas de VSHV estudiadas podría causar un aumento de la afinidad por los fosfolípidos aniónicos de la membrana.
4. Se describen por primera vez mutantes defectivos en fusión que afectan no sólo al péptido de fusión sino también al dominio de ligamiento de fosfolípidos. Los datos obtenidos permiten avanzar un modelo estructural que explicaría como un péptido de fusión interno de naturaleza no hidrófoba penetra en la membrana de la célula huésped. En este caso, el p2, el p3 y el péptido de fusión se introducen en la membrana mientras que el p9 y el p4 permanecen fuera de la membrana.

- Anchordoquy, J., Carpenter, J. F., y Kroll, D. J. (1997). Maintenance of transfection rates y physical characterization of lipid/DNA complexes after freeze-drying y rehydration. *Archives Biochemistry Biophysics* **348**, 199-206.
- Anderson, E. D., Mourich, D. V., y Leong, J. C. (1996). Gene expression in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA. *Molecular Marine Biology Biotechnology* **5**, 105-113.
- Aronsohn, A. J., y Hughes, J. A. (1997). Nuclear localization signal peptides enhance cationic liposome-mediated gene therapy. *Journal Drug Targeting* **5**, 163-169.
- Avrameas, A., Ternynck, T., Gasmí, L., y Buttin, G. (1999). Efficient gene delivery by a peptide derived from monoclonal anti-DNA antibody. *Bioconjugation Chemistry* **10**, 87-93.
- Bailey, C., Miller, D., y Lenard, J. (1981). Hemolysis of human erythrocytes by vesicular stomatitis virus. *Journal Cell Biology* **91**, 111-116.
- Bailey, C. A., Miller, D. K., y Lenard, J. (1984). Effects of DEAE-dextran on infection y hemolysis by VSV. Evidence that nonspecific electrostatic interactions mediate effective binding of VSV to cells. *Virology* **133**, 111-117.
- Barge, A., Gaudin, Y., Coulon, P., y Ruigrok, R. W. H. (1993). Vesicular stomatitis virus M2 protein may be inside the ribonucleocapsid coil. *Journal Virology* **67**, 7246-7253.
- Basurco, B. (1990). Estudio, identificación y caracterización del virus de la septicemia hemorrágica vírica en España. *PhD Thesis. Universidad Complutense de Madrid*. **1**, 178.
- Basurco, B., y Coll, J. M. (1989). Spanish isolates y reference strains of viral haemorrhagic septicaemia virus shown similar protein size patterns. *Bulletin European Association Fish Pathologists* **9**, 92-95.
- Basurco, B., y Coll, J. M. (1991). In vitro y in vivo variability of the first viral haemorrhagic septicaemia virus isolated in Spain compared to international reference serotypes. *Research Veterinary Science*.
- Basurco, B., y Coll, J. M. (1992). In vitro studies y in vivo immunisation with the first viral haemorrhagic septicaemia viruses isolated in Spain compared to international reference serotypes. *Research Veterinary Science* **53**, 93-97.
- Basurco, B., Sanz, F., Marcotegui, M. A., y Coll, J. M. (1991). The free nucleocapsids of the viral haemorrhagic septicaemia virus contain two antigenically related nucleoproteins. *Archives Virology* **119**, 153-163.
- Basurco, B., Vende, P., Monnier, A. F., Winton, J., DeKinkelin, P., y Benmansour, A. (1995). Genetic diversity y phylogenetic classification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Veterinary Research* **26**, 460-463.
- Basurco, B., Yun, S., y Hedrick, R. P. (1993). Comparison of selected strains of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) using neutralizing trout antisera. *Diseases Aquatic Organisms* **15**, 229-233.
- Bearzotti, M., Delmas, B., Lamoureux, A., Loustau, A. M., Chilmonczyk, S., y Bremont, M. (1999). Fish rhabdovirus cell entry is mediated by fibronectin. *Journal Virology* **73**, 7703-7709.
- Bearzotti, M., Monnier, A. F., Vende, P., Grosclaude, J., DeKinkelin, P., y Benmansour, A. (1995). The glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV): antigenicity y role in virulence. *Veterinary Research* **26**, 413-422.
- Bearzotti, M., Perrot, E., Michard-Vanhee, C., Jolivet, G., Attal, J., Theron, M. C., Puissant, C., Dreano, M., Kopchick, J. J., Powell, R., Gannon, F., Houdebine, L. M., y Chourrout, D. (1992). Gene expression following transfection of fish cells. *Journal Biotechnology* **26**, 315-325.
- Bejar, J., Hong, Y., y Alvarez, M. C. (1999). Towards obtaining ES cells in the marine fish species *Sparus aurata*; multipassage maintenance, characterization y transfection. *Genetical Analysis* **15**, 125-129.
- Benmansour, A., Basurco, B., Monnier, A. F., Vende, P., Winton, J. R., y deKinkelin, P. (1997). Sequence variation of the glycoprotein gene identifies three distinct lineages within field isolates of viral haemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Journal General Virology* **78**, 2837-2846.

- Benmansour, H., Leblois, H., Coulon, P., Tuffereau, C., Gaudin, Y., Flamand, A., y Lafay, F. (1991). Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *Journal Virology* **65**, 4198-4203.
- Bernard, J., LeBerre, M. B., y DeKinkelin, P. (1983). Viral haemorrhagic septicemia of rainbow trout: relation between the G polypeptide y antibody production of fish after infection with the F25 attenuated variant. *Infection Immunity* **39**, 7-14.
- Bernard, J., Lecocq-Xhonneux, F., Rossius, M., Thiry, M. E., y De Kinkelin, P. (1990). Cloning y sequencing the messenger RNA of the N gene of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Journal General Virology* **71**, 1669-1674.
- Betancourt, O. H., Attal, J., Théron, M. C., Puissant, C., y Houdebine, L. M. (1993). Efficiency of introns from various origins in fish cells. *Molecular Marine Biology Biotechnology* **2**, 181-188.
- Bettinger, T., Carlisle, R. C., Read, M. L., Ogris, M., y Seymour, L. W. (2001). Peptide-mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary y post-mitotic cells. *Nucleic Acid Research* **29**, 3882-3891.
- Betts, A. M., y Stone, D. M. (2000). Nucleotide sequence analysis of the entire coding regions of virulent y avirulent strains of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Virus Genes* **20**, 259-262.
- Biacchesi, S., Bearzotti, M., Bouguyon, E., y Bremont, M. (2002). Heterologous exchanges of the glycoprotein y the matrix protein in a Novirhabdovirus. *Journal Virology* **76**, 2881-2889.
- Biacchesi, S., Thoulouze, M. I., Bearzotti, M., Yu, Y. X., y Bremont, M. (2000a). Recovery of NV Knockout Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Expressing Foreign Genes. *Journal Virology* **74**, 11247-11253.
- Biacchesi, S., Yu, Y., Bearzotti, M., Tafalla, C., Fernandez-Alonso, M., y Bremont, M. (2000b). Rescue of synthetic salmonid rhabdovirus minigenomes. *Journal General Virology* **81**, 1941-1945.
- Bjorklund, H. V., Higman, K. H., y Kurath, G. (1996). The glycoprotein genes y gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus y hirame rhabdovirus: analysis of relationships with other rhabdoviruses. *Virus Research* **42**, 65-80.
- Boudinot, P., Boubekeur, S., y Benmansour, A. (2001). Rhabdovirus infection induces public y private T cell responses in teleost fish. *Journal Immunology* **167**, 6202-6209.
- Boussif, O., Delair, T., Brua, C., Veron, L., Pavirani, A., y Kolbe, H. V. (1999). Synthesis of polyallylamine derivatives y their use as gene transfer vectors in vitro. *Bioconjugation Chemistry* **10**, 877-883.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M., Scherman, D., Demeinex, B., y Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene y oligonucleotide transfer into cells in culture y in vivo: polimyethylenimine. *Proceedings National Academy Sciences USA* **92**, 7297-7301.
- Bracci, L., Antoni, G., Cusi, M. G., Iozzi, L., Nicolai, N., Petreni, S., Rustici, M., Santucci, A., Soldani, P., y Valensin, P. E. (1988). Antipeptide antibodies inhibit the binding of rabies virus glycoprotein y alpha bungarotoxin to the nicotinic acetylcholine receptor. *Molecular Immunology* **25**, 881-888.
- Brañas, M. V., Coll, J. M., y Estepa, A. (1994). A sandwich ELISA to detect VHSV y IPNV in turbot. *Aquaculture International* **2**, 206-217.
- Broughan, J. H., y Wunner, W. H. (1995). Characterization of protein involvement in rabies virus binding to BHK-21 cells. *Archives Virology* **140**, 75-93.
- Brown, J. C., Newcomb, W. W., y Lawrence-Smith, S. (1988). pH dependent accumulation of the vesicular stomatitis virus glycoprotein at the ends of intact virions. *Virology* **167**, 625-632.
- Brown, M. D., Schatzlein, A., Brownlie, A., Jack, V., Wang, W., Tetley, L., Gray, A. I., y Uchegbu, I. F. (2000). Preliminary characterization of novel amino acid based polymeric vesicles as gene y drug delivery agents. *Bioconjugation Chemistry* **11**, 880-891.
- Brunner, S., Sauer, T., Carota, S., Cotten, M., Saltik, M., y Wagner, E. (2000). Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex y recombinant adenovirus. *Gene Therapy* **7**, 401-407.
- Brunson, R., True, K., y Yancey, J. (1989). VHS virus isolated at Makah National Fish Hatchery. *American Fish Society Fish Health Newsletter* **17**, 3.

- Budker, V., Gurevich, V., Hagstrom, J. E., Bortzov, F., y Wolff, J. A. (1996). pH-sensitive, cationic liposomes: A new synthetic virus-like vector. *Nature Biotechnology* **14**, 760-764.
- Bunschoten, H., Gore, M., Classen, I. J. T. M., Uytdehaag, F. G. C. M., Wunner, W., y Osterhaus, A. D. M. E. (1989). Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential on the rabies virus Glycoprotein. *Journal General Virology* **70**, 291-298.
- Carneiro, F. A., Bianconi, M. L., Weissmuller, G., Stauffer, F., y DaPoian, A. T. (2002). Membrane recognition by vesicular stomatitis virus involves enthalpy-driven protein-lipid interactions. *Journal Virology* **76**, 3756-3764.
- Carneiro, F. A., Stauffer, F., Lima, C. S., Juliano, M. A., Juliano, L., y DaPoian, A. T. (2003). Membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus depends on histidine protonation. *Journal Biological Chemistry*.
- Chan, A. W. S., Homan, E. J., Ballou, L. U., Burns, J. C., y Bremel, R. D. (1998). Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proceedings National Academy Sciences USA* **95**, 14028-14033.
- Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., y Kim, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263-273.
- Chen, T. T., Lu, J. K., Shambloot, M. J., Cheng, C. M., Lin, C. M., Burns, J. C., Reimschuessel, R., Chatakondi, N., y Dunham, R. A. (1995). Transgenic fish: ideal models for basic research y biotechnological applications. *Zoological Studies* **34**, 215-234.
- Chourrout, D., Guyomard, R., y Houdebine, L. M. (1986). High efficiency gene transfer in rainbow trout by microinjection into egg cytoplasm. *Aquaculture* **51**, 143-150.
- Chu, G., Hayakawa, H., y Berg, P. (1987). Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. *Nucleic Acid Research* **15**, 1311-1317.
- Ciftci, K., y Levy, R. J. (2001). Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts. *International Journal Pharmacology* **218**, 81-92.
- Colin, M., Maurice, M., Trugnan, G., Komprobost, M., y al, e. (2000). Cell delivery, intracellular trafficking y expression of an integrin-mediated gene transfer vector in tracheal epithelial cells. *Gene Therapy* **7**, 139-152.
- Coll, J. M. (1988). La Acuicultura Española. *Tecnología XXI* **7**, 2-5.
- Coll, J. M. (1989a). Injection of physiological saline facilitates recovery of ascitic fluids for antibody production. *Journal Immunological Methods* **104**, 219-222.
- Coll, J. M. (1989b). Low-background substrate buffer for peroxidase-o-phenylenediamine enzyme immunoassays. *Revista Española Fisiología* **45**, 41-46.
- Coll, J. M. (1994). Synthetic peptides reveal a phospholipid-binding domain in the glycoprotein of salmonid rhabdoviruses. *Virus Research*.
- Coll, J. M. (1995a). The glycoprotein G of rhabdoviruses. *Archives Virology* **140**, 827-851.
- Coll, J. M. (1995b). Heptad-repeat sequences in the glycoprotein of rhabdoviruses. *Virus Genes* **10**, 107-114.
- Coll, J. M. (1995c). Low-pH increases the binding of haemorrhagic septicemia rhabdovirus to membrane phospholipids. *Journal Fish Diseases* **18**, 519-527.
- Coll, J. M. (1997). Synthetic peptides from the heptad repeats of the glycoproteins of rabies, vesicular stomatitis y fish rhabdoviruses bind phosphatidylserine. *Archives Virology* **142**, 2089-2097.
- Coll, J. M. (1999a). Early steps in rhabdoviral infection. *Recent Research Developments Virology* **1**, 75-83.
- Coll, J. M. (1999b). Prevalencia de las rhabdovirus en la Acuicultura Europea. *AquaTic* **6**, <http://aquatic.unizar.es/n2/art602/rabdoUE.htm>.
- Coll, J. M. (2001). Actualidad y futuro de la Acuicultura española. *AquaTic* **14**, http://aquatic.unizar.es/n3/art1403/acuicultura_sp.htm.
- Collas, P., y Allestrom, P. (1998). Nuclear localization signals enhance germline transmission of a transgene in zebrafish. *Transgenic research* **7**, 303-309.
- Colosimo, A., Goncz, K. K., Holmes, A. R., Kunzelmann, K., Novelli, G., Malone, R. W., Bennett, M. J., y Gruenert, D. C. (2000). Transfer y expression of foreign genes in mammalian cells. *BioTechniques* **29**, 314-318.

- Conti, C., Hauttecoeur, B., Morelec, M. J., Bizzini, B., Orsi, N., y Tsiang, H. (1988). Inhibition of rabies virus infection by a soluble membrane fraction from the rat central nervous system. *Archives Virology* **98**, 73-86.
- Cupit, P. M., Lorenzen, N., Strachan, G., Kemp, G. J., Secombes, C. J., y Cunningham, C. (2001). Neutralisation y binding of VHS virus by monovalent antibody fragments. *Virus Research* **81**, 47-56.
- Darquet, A. M., Cameron, B., Wils, P., Scherman, D., y Crouzet, J. (1997). A new DNA vehicle for non viral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene Therapy* **4**, 1341-1349.
- Dean, D. A. (1997). Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Experimental Cell Research* **230**, 293-302.
- Dean, D. A., Byrd, J. N., y Dean, B. S. (1999). Nuclear targeting of plasmid DNA in human corneal cells. *Current Eye Research* **19**, 66-75.
- Dean, D. A., Dean, B. S., Muller, S., y Smith, L. C. (1999). Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Experimental Cell Research* **253**, 713-722.
- DeKinkelin, P. (1972). Le virus D'Egtved.II-Purification. *Annals Recherche Vétérinaire* **3**, 199-208.
- DeKinkelin, P., Bearzotti, M., Castric, J., Nougayrede, P., Lecocq-Xhonneux, F., y Thiry, M. (1995). Eighteen years of vaccination against viral haemorrhagic septicemia in France. *Veterinary Research* **26**, 379-387.
- DeKinkelin, P., Geraed, J. P., Dorson, M., y Le Berre, M. (1977). Viral Haemorrhagic Septicemia: Demonstration of a protective immune response following natural infection. *Fish Health News* **6**, 43-45.
- DeKinkelin, P., y LeBerre, M. (1979). Mass virus production in fish cell system. *Developments Biological Standards* **42**, 99-104.
- Delos, S. E., Gilbert, J. M., y White, J. M. (2000). The central proline of an internal viral fusion peptide serves two important roles. *Journal Virology* **7**, 1686-1693.
- Delteil, C., Teissie, J., y Rols, M. P. (2000). Effect of serum on in vitro electrically mediated gene delivery y expression in mammalian cells. *Biochimical Biophysical Acta* **1467**, 362-368.
- Diederich, C. J., y Hynynen, K. (1999). Ultrasound technology for hyperthermia. *Ultrasound Medical Biology* **25**, 871-887.
- Dietzschold, B., Tollis, M., Rupprecht, C. E., Celis, E., y Koprowski, H. (1987). Antigenic variation in rabies y rabies-related virus cross-protection independent of glycoprotein mediated virus-neutralizing antibody. *Journal Infectious Diseases* **156**, 815-822.
- Dietzschold, B., Wiktor, T. J., MacFarlan, R., y Varrichio, A. (1982). Antigenic structure of rabies virus glycoprotein: Ordering y immunological characterization of the large CNBr cleavage fragments. *Journal Virology* **44**, 595-602.
- Dimytenko, G. M., y Bloch, R. J. (1993). Evidence for transmembrane anchoring of extracellular matrix at acetylcholine receptor clusters. *Experimental Cell Research* **206**, 323-334.
- Doms, R. W., Keller, D. S., Helenius, A., y Balch, W. E. (1987). Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly y transport of vesicular stomatitis virus G protein trimers. *Journal Cell Virology* **105**, 1957-1969.
- Durrer, P., Gaudin, Y., Ruigrok, R. W. H., Graf, R., y Brunner, J. (1995). Photolabeling identifies a putative fusion domain in the envelope glycoprotein of rabies y vesicular stomatitis viruses. *Journal Biological Chemistry* **270**, 17575-17581.
- Eidelman, o., Schlegel, R., Tralka, T., y Blumenthal, R. (1984). pH-dependent fusion induced by vesicular stomatitis virus glycoprotein reconstituted into phospholipid vesicles. *Journal Biological Chemistry* **259**, 4622-4628.
- Einer-Jensen, K., Krogh, T. N., Roepstorff, P., y Lorenzen, N. (1998). Characterization of intramolecular disulphide bonds y secondary modifications of the glycoprotein from viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. *Journal Virology* **72**, 10189-10196.
- Engelking, H., y Leong, J. C. (1989). The glycoprotein of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus eliciting antibody y protective responses. *Virus Research* **13**, 213-230.

Enzmann, P. J., Maier, B., y Bigott, K. (1981). Biochemical data on the RNA of VHS-V y RVC indicating a possible serological relationship. *Bulletin European Association Fish Pathologists* **1**, 37-39.

Escriou, V., Carriere, M., Bussone, F., Wils, P., y Scherman, D. (2001). Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer. *Journal Gene Medicine* **3**, 179-187.

Estepa, A. (1992). Estudios de inmunización con proteínas electroeluidas y clonadas del virus de la septicemia hemorrágica vírica de la trucha. *University of Madrid Spain Doctoral Thesis PHD Thesis*, 243.

Estepa, A., Bremont, M., Fernandez-Alonso, M., y Coll, J. M. (1999). Aplicación de rhabdovirus DNA infeccioso para el desarrollo de un nuevo vector para tratar ictiopatologías infecciosas. *Investigaciones Agrarias* **14**, 85-93.

Estepa, A., y Coll, J. M. (1992a). In vitro immunostimulants for optimal responses of kidney cells from healthy trout y from trout surviving viral haemorrhagic septicemia virus disease. *Journal Fish Shellfish Immunology* **2**, 53-68.

Estepa, A., y Coll, J. M. (1992b). Mitogen-Induced proliferation of trout kidney leucocytes by one-step culture in fibrin clots. *Veterinary Immunology Immunopathology* **32**, 165-177.

Estepa, A., y Coll, J. M. (1996a). Pepsan mapping y fusion related properties of the major phosphatidylserine-binding domain of the glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus, a salmonid rhabdovirus. *Virology* **216**, 60-70.

Estepa, A., y Coll, J. M. (1996b). Phosphatidylserine binding to solid-phase peptides: a new method to study phospholipid/viral protein interactions. *Journal Virological Methods* **61**, 37-45.

Estepa, A., y Coll, J. M. (1997). Temperature y pH requirements for viral haemorrhagic septicemia virus induced cell fusion. *Diseases Aquatic Organisms* **28**, 185-189.

Estepa, A., Fernandez-Alonso, M., y Coll, J. M. (1999). Structure, binding y neutralization of VHSV with synthetic peptides. *Virus Research* **63**, 27-34.

Estepa, A., Frías, D., y Coll, J. M. (1992). Neutralising epitope(s) of the glycoprotein of viral haemorrhagic septicemia virus are expressed in the membrane of infected trout macrophages. *Bulletin European Associated Fish Pathologists* **12**, 150-153.

Estepa, A., Lorenzo, G., y Coll, J. M. (1994). Revisión sobre inmunización con plásmidos de expresión transitoria. *Investigación Agraria* **9**, 261-268.

Estepa, A., Rocha, A., Pérez, L., Encinar, J. A., Nuñez, E., Fernandez, A., Gonzalez Ros, J. M., Gavilanes, F., y Coll, J. M. (2001). A protein fragment from the salmonid VHS rhabdovirus induce cell-to-cell fusion y membrane phosphatidylserine translocation at low pH. *Journal Biological Chemistry* **276**, 46268-46275.

Estepa, A., Thiry, M., y Coll, J. M. (1994). Recombinant protein fragments from haemorrhagic septicemia rhabdovirus stimulate trout leucocyte anamnestic in vitro responses. *Journal General Virology* **75**, 1329-1338.

Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., y Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings National Academy Sciences USA* **84**, 7413-7417.

Fernandez-Alonso, M. (2000). Expresión en vectores eucariontes de genes para vacunación DNA por inmersión en el modelo trucha/rhabdovirus. *pHD Thesis, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain pHD Thesis*, 169p.

Fernandez-Alonso, M., Alvarez, F., Estepa, A., Blasco, R., y Coll, J. M. (1999a). A model to study fish DNA immersion-vaccination by using the green fluorescent protein. *Journal Fish Diseases* **22**, 237-241.

Fernandez-Alonso, M., Alvarez, F., Estepa, A., y Coll, J. M. (1998). Vacunas DNA en Acuicultura. *AquaTIC* **4**, http://aquatic.unizar.es/N1/art401/DNA_vac.htm.

Fernandez-Alonso, M., Alvarez, F., Estepa, A., y Coll, J. M. (1999b). G disulphide bond native conformation is required to elicit trout neutralizing antibodies against VHSV. *Journal Fish Diseases* **22**, 219-222.

- Fernandez-Alonso, M., y Coll, J. M. (1999). Induced fusion of VHSV persistently infected fish cells. *Journal Fish Diseases* **22**, 401-406.
- Fernandez-Alonso, M., Lorenzo, G., Perez, L., Bullido, R., Estepa, A., Lorenzen, N., y Coll, J. M. (1999c). Mapping of the lineal antibody epitopes of the glycoprotein of VHSV, a salmonid rhabdovirus. *Diseases Aquatic Organisms* **34**, 167-176.
- Fernandez-Alonso, M., Rocha, A., y Coll, J. M. (2001). DNA vaccination by immersion y ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. *Vaccine* **19**, 3067-3075.
- Fijan, N., Sulimanovic, D., Bearzotti, M., Muzinic, D., Zwillenberg, L. O. Z., Chilmonczyk, S., Vautherot, J. F., y Kinkelin, P. (1983). Some properties of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp cyprinus carpio. *Annals Virology (Institute Pasteur)* **134**, 207-220.
- Flamand, A., Raux, H., Gaudin, Y., y Ruigrok, R. W. H. (1993). Mechanisms of rabies virus neutralization. *Virology* **194**, 302-313.
- Fredericksen, B. L., y Whitt, M. A. (1995). Vesicular stomatitis virus glycoprotein mutations that affect membrane fusion activity y abolish virus infectivity. *Journal Virology* **69**, 1435-1443.
- Frenkel, V., y Kimmel, E. (2000). Ultrasound-induced intercellular space widening in fish epidermis. *Ultrasound Medical Biology* **26**, 473-480.
- Frenkel, V., Kimmel, E., y Iger, Y. (1999). Ultrasound-induced cavitation damage to external epithelia of fish skin. *Ultrasound Medical Biology* **25**, 1295-1303.
- Frerichs, G. N. (1989). Rhabdoviruses of fishes. *Viruses of Lower Vertebrates*. Ahne, W. & Kurstak, E. eds. Springer, Berlin **1**, 27-32.
- Friedenreich, H., y Schartl, M. (1990). Transcript expression directed by homologous y heterologous promoter y enhancer sequences in fish cells. *Nucleic Acids Research* **18**, 3299-3305.
- 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. *Proceedings National Academy Sciences USA* **83**, 8122-8126.
- Garcia-Chaumont, C., Seksek, O., Grzybowska, J., Borowski, E., y Bolard, J. (2000). Delivery systems for antisense oligonucleotides. *Pharmacological Therapy* **87**, 255-277.
- Gastka, M., Horvath, J., y Lentz, T. L. (1996). Rabies virus binding to the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit demonstrated by virus overlay protein binding assay. *Journal General Virology* **77**, 2437-2440.
- Gaudin, Y., DeKinkelin, P., y Benmansour, A. (1999). Mutations in the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus that affect virulence for fish y the pH threshold for membrane fusion. *Journal General Virology* **80**, 1221-1229.
- Gaudin, Y., Moreira, S., Benejean, J., Blondel, D., Flamand, A., y Tuffereau, C. (1999a). Soluble ectodomain of rabies virus glycoprotein expressed in eukaryotic cells folds in a monomeric conformation that is antigenically distinct from the native state of the complete, membrane anchored glycoprotein. *Journal General Virology* **80**, 1647-1656.
- Gaudin, Y., Raux, H., Flamand, A., y Ruigrok, W. H. (1996). Identification of amino acids controlling the low-pH-induced conformational change of rabies virus glycoprotein. *Journal Virology* **70**, 7371-7378.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R. W. H., y Brunner, J. (1995). Low-pH induced conformational changes in viral fusion proteins: implications for the fusion mechanism. *Journal General Virology* **76**, 1541-1556.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R. W. H., Knossow, M., y Flamand, A. (1993). Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein y their role in membrane fusion. *Journal Virology* **67**, 1365-1372.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R. W. H., Tuffereau, C., Knossow, M., y Flamand, A. (1992). Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology* **187**, 627-632.
- Gaudin, Y., Tuffereau, C., Durrer, P., Brunner, J., Flamand, A., y Ruigrok, R. (1999b). Rabies virus-induced membrane fusion. *Molecular Membrane Biology* **16**, 21-31.

- Golzio, M., Mora, M. P., Raynaud, C., Delteil, C., Teissie, J., y Rols, M. P. (1998). Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization y gene transfer in mammalian cells. *Biophysical Journal* **74**, 3015-3022.
- Golzio, M., Teissie, J., y Rols, M. P. (2001). Control by membrane order of voltage-induced permeabilization, loading y gene transfer in mammalian cells. *Bioelectrochemistry* **53**, 25-34.
- Gomez-Chiarri, M., y Chiaverini, L. A. (1999). Evaluation of eukaryotic promoters for the construction of DNA vaccines for aquaculture. *Genetic analysis: Biomolecular Engineering* **15**, 121-124.
- Gomez-Chiarri, M., Livingston, S. K., Muro-Cacho, C., Sanders, S., y Levine, R. P. (1996). Introduction of foreign genes into the tissue of live fish by direct injection y particle bombardment. *Diseases Aquatic Organisms* **27**, 5-12.
- Gottschalk, S., Sparrow, J. T., Hauer, J., Mims, M. P., Leland, F. E., Woo, S. L., y Smith, L. C. (1996). A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer y expression in mammalian cells. *Gene Therapy* **3**, 448-457.
- Greenleaf, W. J., Bolander, M. E., Sarkar, G., Goldring, M. B., y Greenleaf, J. F. (1998). Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound Medicine Biology* **24**, 587-595.
- Grigera, P. R., Keil, W., y Wagner, R. R. (1992). Disulphide-bonded discontinuous epitopes on the glycoprotein of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype). *Journal Virology* **66**, 3749-3757.
- Haberland, A., Knaus, T., Zaitsev, S. V., Buchberger, B., Lun, A., Haller, H., y Bottger, M. (2000). Histone H1-mediated transfection: serum inhibition can be overcome by Ca⁺⁺ ions. *Pharmaceutical Research* **17**, 229-235.
- Haberland, A., Knaus, T., Zaitsev, S. V., Stahn, R., Mistry, A. R., Coutelle, C., Haller, H., y Bottger, M. (1999). Calcium ions as efficient cofactor of polycation-mediated gene transfer. *Biochemical Biophysical Acta* **1445**, 21-30.
- Hackett, P. B., y Alvarez, M. C. (2000). The molecular genetics of transgenic fish. *Recent advances in Marine Biotechnology. ed. Fingerman, M. nagabhushanam, R.* **4: Aquaculture. part B Fishes**, 77-145.
- Haensler, J., y Szoka, F. C. (1993). Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of the cell in culture. *Bioconjugation Chemistry* **4**, 372-379.
- Hama-Inaba, H., Takahashi, M., Kasai, M., Shiomi, T., Ito, A., Hanaoka, F., y Sato, K. (1987). Optimum conditions for electric pulse-mediated gene transfer to mammalian cells in suspension. *Cell Structure Function* **12**, 173-183.
- Hanham, C. A., Zhao, F., y Tignor, G. H. (1993). Evidence from the anti-idiotypic network that the acetylcholine receptor is a rabies virus receptor. *Journal Virology* **67**, 530-542.
- Hansen, E., Fernandes, K., Goldspink, G., Buterworth, P., Umeda, P. K., y Chang, K.-C. (1991). Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS Letters* **290**, 73-76.
- Harbottle, R. P., Cooper, R. G., Hart, S. L., Ladhoff, A., McKay, T., Knight, A. M., Wagner, E., Miller, A. D., y Coutelle, C. (1998). An RGD-oligolysine peptide: a prototype construct for integrin-mediated gene delivery. *Gene Therapy* **9**, 1037-1047.
- Hattenberg-Baudoy, A. M., Danton, M., Merle, G., y DeKinkelin, P. (1995). Serum neutralization test for epidemiological studies of salmonid rhabdoviroses in France. *Veterinary Research* **26**, 512-520.
- Hayasaka, K., Sato, M., Mitani, H., y Shima, A. (1990). Transfection of cultured fish cells RBCF-1 with exogenous oncogene y their resistance to malignant transformation. *Comparative Biochemical Physiology* **96**, 349-354.
- Heike, S., Egbert, M., y Mettenleiter, T. C. (1999). Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus Genes* **19**, 59-65.
- Hill, B. J., Underwood, B. O., Smale, C. J., y Brown, F. (1975). Physico-chemical y serological characterization of five rhabdoviruses infecting fish. *Journal General Virology* **27**, 369-378.

- Hopper, K. (1989). The isolation of VHSV from salmon at Glenwood Springs, Orcas Island, Washington. *American Fish Society Fish Health Newsletter* **17**, 1.
- Inoue, K., Akita, N., Yamashita, S., Shiba, T., y Fujita, T. (1990). Constitutive y inducible expression of a transgene directed by heterologous promoters in a trout liver cell line. *Biochemical Biophysical Research Communications* **173**, 1311-1316.
- Isshiki, T., Nishizawa, T., Kobayashi, T., Nagano, T., y Miyazaki, T. (2001). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Diseases Aquatic Organisms* **47**, 87-99.
- Jeetendra, E., Robinson, C. S., Albritton, L. M., y Whitt, M. A. (2002). The membrane-proximal domain of vesicular stomatitis virus G protein functions as a membrane fusion potentiator y can induce hemifusion. *Journal Virology* **76**, 12300-12311.
- Jiang, S., Lin, K., Strick, N., y Neurath, A. (1993a). Inhibition by a HIV-1 peptide. *Nature* **365**, 113.
- Jiang, S., Lin, K., Strick, N., y Neurath, A. (1993b). Inhibition of HIV-1 infection by a fusion domain binding peptide from the HIV-1 envelope glycoprotein gp41. *Biochemical Biophysical Research Communications* **195**, 533-538.
- Johnson, N., Mansfield, K. L., y Fooks, A. R. (2002). Canine vaccine recipients recognize an immunodominant region of the rabies virus glycoprotein. *Journal General Virology* **83**, 2663-2669.
- Jorgensen, P. E. V., Einer-Jensen, K., Higman, K. H., y Winton, J. R. (1995). Sequence comparison of the central region of the glycoprotein gene of neutralizable, non-neutralizable, y serially passed isolates of viral haemorrhagic septicemia virus. *Diseases Aquatic Organisms* **23**, 77-82.
- Jorgensen, P. E. V., Olesen, N. J., Lorenzen, N., Winton, J. R., y Ristow, S. (1991). Infectious hematopoietic necrosis (IHN) y viral haemorrhagic septicaemia (VHS): detection of trout antibodies to the causative viruses by means of plaque neutralization, immunofluorescence, y enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal Aquatic Animal Health* **3**, 100-108.
- Kazmierski, W. M., Hazen, R. J., Aulabaugh, A., y StClair, H. (1996). Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 derived from gp41 transmembrane protein: structure-activity studies. *Journal Medical Chemistry* **39**, 2681-2689.
- Kelley, J. M., Emersom, S. U., y Wagner, R. R. (1972). The glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus is the antigen that gives rise to y react with neutralizing antibodies. *Journal Virology* **10**, 1231-1236.
- Khaw, B. A., daSilva, J., Vural, I., Narula, J., y Torchilin, V. P. (2001). Intracytoplasmic gene delivery for in vitro transfection with cytoskeleton-specific immunoliposomes. *Journal Control Release* **75**, 199-210.
- King, J. A., Snow, M., Smail, D. A., y Raynaerd, R. S. (2001). Distribution of viral haemorrhagic septicaemia virus in wild fish species of the North Sea, north east Atlantic Ocean y Irish Sea. *Diseases Aquatic Organisms* **47**, 81-86.
- Knutson, J. C., y Yee, D. (1987). Electroporation: parameters affecting transfer of DNA into mammalian cells. *Analytical Biochemistry* **164**, 44-50.
- Konieczko, E. M., Whitaker-Dowling, P. A., y Widnell, C. C. (1994). Membrane fusion as a determinant of the infectibility of cells by vesicular stomatitis virus. *Virology* **199**, 200-211.
- Kono, K., Torikoshi, Y., Mitsutomi, M., Itoh, T., Emi, N., Yanagie, H., y Takagishi, T. (2001). Novel gene delivery systems: complexes of fusogenic polymer-modified liposomes y lipoplexes. *Gene therapy* **8**, 5-12.
- Kontseikova, E., Macikova, I., Novak, M., Dedek, L., Vrzal, V., y Kontsek, P. (1992). Conformation-dependent accessibility of the linear epitopes located on the rabies virus glycoprotein. *Viral Immunology* **5**, 213-220.
- Kurath, G., Higman, K. H., y Bjorklund, H. V. (1995). The NV genes of fish rhabdoviruses: development of RNase protection assays for rapid assesment of genetic variation. *Veterinary Research* **26**, 477-485.
- Lafon, M., Wiktor, T. J., y Macfarlan, R. I. (1983). Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies. *Journal General Virology* **64**, 843-851.

- Lam, A. M. I., y Cullis, P. R. (2000). Calcium enhances the transfection potency of plasmid DNA-cationic liposome complexes. *Biochimical Biophysical Acta* **1463**, 279-290.
- Lam, Y. H., Wassall, S. R., Morton, C. J., Smith, R., y Separovic, F. (2001). Solid-state nmr structure determination of melittin in a lipid environment. *Biophysical Journal* **81**, 2752-2761.
- 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. (1996). Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proceedings National Academy Sciences USA* **93**, 2186-2191.
- LaPatra, S. E., Corbeil, S., Jones, G. R., Shewmaker, W. D., Lorenzen, N., Anderson, E. D., y Kurath, G. (2001). Protection of rainbow trout against infectious hematopoietic necrosis virus four days after specific or semi-specific DNA vaccination. *Vaccine* **19**, 4011-4019.
- Larsson, M., Lovgren, K., y Morein, B. (1993). Immunopotential of synthetic oligopeptides by chemical conjugation to iscoms. *Journal Immunological Methods* **162**, 257-260.
- Lasic, D. D., Strey, H., Stuart, M. C. A., Podgornik, R., y Frederick, P. M. (1997). The structure of DNA-liposome complexes. *Journal American Chemical Society* **119**, 832-833.
- Lawrie, A., Briskin, A. F., Francis, S. E., Tayler, D. I., Chamberlain, J., Crossman, D. C., Cumberland, D. C., y Newman, C. M. (1999). Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells in vitro. *Circulation* **99**, 2617-2620.
- Lawson, N. D., Stillman, E. A., Whitt, M. A., y Rose, J. K. (1995). Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proceedings National Academy Sciences USA* **92**, 4477-4481.
- Lebedeva, I., Benimetskaya, L., Stein, C. A., y Vilenchik, M. (2000). Cellular delivery of antisense oligonucleotides. *European Journal Pharmacological Biopharmacy* **50**, 101-119.
- LeBerre, M., De Kinkelin, P., y Metzger, A. (1977). Identification sérologique des rhabdovirus des salmonidés. *Bulletin Office International Epizooties* **87**, 391-393.
- Lecocq-Xhonneux, F., Thiry, M., Dheur, I., Rossius, M., Vanderheijden, N., Martial, J., y DeKinkelin, P. (1994). A recombinant viral haemorrhagic septicaemia virus glycoprotein expressed in insect cells induces protective immunity in rainbow trout. *Journal General Virology* **75**, 1579-1587.
- Legendre, J. Y., Trzeciak, A., Bohrmann, B., Deuschle, U., Kitas, E., y Supersaxo, A. (1997). Dioleoylmelittin as a novel serum-insensitive reagent for efficient transfection of mammalian cells. *Bioconjugation Chemistry* **8**, 57-63.
- Lemkine, G. F., y Demeneix, B. A. (2001). Polyethylenimines for in vivo gene delivery. *Current Opinion Molecular Therapy* **3**, 178-182.
- Lenard, J. (1993). Vesicular stomatitis virus fusion. *Viral fusion mechanisms. Ed. Bentz, Journal. CRC Press*, 425-435.
- Lentz, T. L., Benson, J. J., Klimowicz, D., Wilson, P. T., y Hawrot, E. (1986). Binding of rabies virus to purified Torpedo acetylcholine receptor. *Molecular Brain Research* **1**, 211-219.
- Lentz, T. L., Burrage, T. G., Smith, A. L., Crick, J., y Tignor, G. H. (1982). Is the acetylcholine receptor a rabies receptor? *Science* **215**, 182-184.
- Leong, J. C., Bootland, L., Anderson, E., Chiou, P. W., Drolet, B., Kim, C., Lorz, H., Mourich, D., Ormonde, P., Perez, L., y Trobridge, G. (1995). Viral vaccines for aquaculture. *Journal Marine Biotechnology* **3**, 16-23.
- Leong, J. C., y Fryer, J. L. (1993). Viral vaccines for aquaculture. *Annual Review Fish Diseases* -, 225-240.
- Li, S., MacLaughlin, F. C., Fewell, J. G., Gondo, M., Wang, J., Nicol, F., Dean, D. A., y Smith, L. C. (2001). Muscle-specific enhancement of gene expression by incorporation of SV40 enhancer in the expression plasmid. *Gene Therapy* **8**, 494-497.
- Li, Y., Drone, C., Sat, E., y Ghosh, H. P. (1993). Mutational analysis of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G for membrane fusion domains. *Journal Virology* **67**, 4070-4077.

- Liang, M., Alestrom, P., y Collas, P. (2000). Glowing zebrafish: integration, transmission y expression of a single luciferase transgene promoted by non-covalent DNA-nuclear transport peptide complexes. *Molecular Reproduction Development* **55**, 8-13.
- Lin, A. J., Slack, N. L., Ahmad, A., Koltover, I., George, C. X., Samuel, C. E., y Safinya, C. R. (2000). Structure y structure-function studies of lipid/plasmid DNA complexes. *Journal Drug Targeting* **8**, 13-27.
- Liu, J., Lewis, T. N., y Prausnitz, M. R. (1998). Non-invasive assessment y control of ultrasound-mediated membrane permeabilization. *Pharmaceutical Research* **15**, 918-924.
- Liu, M. A., Hilleman, M. R., y Kurth, R. (1995). DNA vaccines. A new era in vaccinology. *Annals New York Academy Sciences* **772**, 1-294.
- Lopez, A., Fernandez-Alonso, M., Rocha, A., Estepa, A., y Coll, J. M. (2001). Transfection of epithelioma cyprini (EPC) carp cells. *Biotechnology Letters* **23**, 481-487.
- Lorenzen, N., Cupit, P. M., Einer-Jensen, K., Lorenzen, E., Ahrens, P., Secombes, C. J., y Cunningham, C. (2000). Immunoprophylaxis in fish by injection of mouse antibody genes. *Nature Biotechnology* **18**, 1177-1180.
- Lorenzen, N., Einer-Jensen, K., Lorenzen, E., Ahrens, P., Cunningham, P., y Cunningham, C. (1998a). Two neutralization epitopes of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Virus Research* **in press**.
- Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., y LaPatra, S. E. (2002a). DNA vaccines as a tool for analysing the protective immune system response against rhabdoviruses in rainbow trout. *Fish Shellfish Immunology* **12**, 439-453.
- Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., y LaPatra, S. E. (2002b). Immunity induced shortly after DNA vaccination of rainbow trout against rhabdoviruses protects against heterologous virus but not against bacterial pathogens. *Developmental Comparative Immunology* **26**, 173-179.
- Lorenzen, N., Lorenzen, E., Einer-jensen, K., Heppell, J., Wu, T., y Davis, H. (1998b). Protective immunity to VHS in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunology* **8**, 261-270.
- Lorenzen, N., Olesen, N. J., y Koch, C. (1999). Immunity to VHS virus in rainbow trout. *Aquaculture* **172**, 41-61.
- Lorenzen, N., Olesen, N. J., y Vestergaard-Jorgensen, P. E. (1990). Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures y fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. *Journal General Virology* **71**, 561-567.
- Lorenzen, N., Olesen, N. J., Vestergaard-Jorgensen, P. E., Etzerodt, M., Holtet, T. L., y Thorgersen, M. C. (1993). Molecular cloning y expression in *Escherichia coli* of the glycoprotein gene of VHS virus y immunization of rainbow trout with the recombinant protein. *Journal General Virology* **74**, 623-630.
- Lorenzo, G., Estepa, A., y Coll, J. M. (1996). Fast neutralization/immunoperoxidase assay for viral haemorrhagic septicemia with anti-nucleoprotein monoclonal antibody. *Journal Virological Methods* **58**, 1-6.
- Luo, D., y Saltzman, M. (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nature Biotechnology* **18**, 33-37.
- Lupas, A., Van Dyke, M., y Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**, 1162-1169.
- Luthman, H., y Magnusson, G. (1983). High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acid Research* **11**, 1295-1308.
- Ma, H., y Diamond, S. L. (2001). Non viral gene therapy y its delivery systems. *Current Pharmacological Biotechnology* **2**, 1-17.
- Maillard, A. P., Domanski, M., Brunet, P., Chaffotte, A., Guittet, E., y Gaudin, Y. (2003). Spectroscopic characterization of two peptides derived from the stem of rabies virus glycoprotein. *Virus Research* **93**, 151-158.
- Maillard, A. P., y Gaudin, Y. (2002). Rabies virus glycoprotein can fold in two alternative, antigenically distinct conformations depending on membrane-anchor type. *Journal General Virology* **83**, 1465-1476.

- Marcusson, E. G., Bhat, B., Manoharan, M., Bennett, C. F., y Dean, N. M. (1998). Phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides dissociate from cationic lipids before entering the nucleus. *Nucleic Acid Research* **26**, 2016-2023.
- Martin, C. J., Pratt, B. M., y Watmough, D. J. (1983). Observations of ultrasound-induced effects in the fish *Xiphophorus maculatus*. *Ultrasound Medical Biology* **9**, 177-183.
- Martinez, J., y Coll, J. M. (1987). Preliminary clinical studies of C-reactive protein quantified by enzyme-immunoassay. *Clinical Chemistry* **33**, 2185-2190.
- Martinez, J. A., y Coll, J. M. (1988). Selection y performance of monoclonal anti-C-reactive protein in ELISA quantitative assay. *Clinical Chemistry Acta* **176**, 123-132.
- Mas, V., Perez, L., Encinar, J. A., Pastor, M. T., Rocha, A., Perez-Paya, E., Ferrer-Montiel, A., Gonzalez-Ros, J. M., Estepa, A., y Coll, J. M. (2002). Salmonid viral haemorrhagic septicemia virus: fusion-related enhancement of virus infectivity by peptides derived from viral glycoprotein G or a combinatorial library. *Journal General Virology* **83**, 2671-2681.
- Mastromarino, P., Conti, C., Goldoni, P., Hauttecouer, B., y Orsi, N. (1987). Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment y fusion at acidic pH. *Journal General Virology* **68**, 2359-2369.
- McAllister, P. E., Schill, W. B., Owens, W. J., y Hodge, D. L. (1991). Infectious pancreatic necrosis virus: a comparison of methods used to detect y identify virus in fluids y tissues os fish. In proceedings of II International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates. *Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA.* -, 191-201.
- Melkonyan, H., Sorg, C., y Klempt, M. (1996). Electroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO). *Nucleic Acids Research* **24**, 4356-4357.
- Midoux, P., Kichler, A., Boutin, V., Maurizot, J. C., y Monsigny, M. (1998). Membrane permeabilization y efficient gene transfer by a peptide containing several histidines. *Bioconjugation Chemistry* **9**, 260-267.
- Moav, B., Liu, Z., Groll, Y., y Hackett, P. B. (1992). Selection of promoters for gene transfer into fish. *Molecular Marine Technology Biotechnology* **1**, 338-345.
- Monsma, S. A., y Blissard, G. W. (1995). Identification of a membrane fusion domain y a oligomerization domain in the baculovirus GP64 envelope fusion protein. *Journal Virology* **69**, 2583-2595.
- Morales, C. R., Zhao, Q., y LeFrancois, S. (1999). Biogenesis of lysosomes by endocytic flow of plasma membrane. *Biocell* **23**, 149-160.
- Morein, B., Sundquist, B., Hoglund, S., Dalsgaard, K., y Osterhaus, A. (1984). ISCOM, a cagelike immunostimulating complex of membrane proteins. in *Modern approaches to vaccines*. R.M.Chanock y R.A.Lerner. Ed. Cold Spring Harbour Laboratory, New York, USA **1**, 363-367.
- Morris, M. C., Chaloin, L., Heitz, F., y Divita, G. (2000). Translocating peptides y proteins y their use for gene delivery. *Current Opinion Biotechnology* **11**, 461-466.
- Morris, M. C., Chaloin, L., Mery, J., Heitz, F., y Divita, G. (1999). A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. *Nucleic Acid Research* **27**, 3510-3517.
- Morris, M. C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F., y Divita, G. (1997). A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotide into nontransformed mammalian cells. *Nucleic Acid Research* **25**, 2730-2736.
- Mortimer, I., Tam, P., MacLachlan, I., Graham, R. W., Saravolac, E. G., y Joshi, P. B. (1999). Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity. *Gene Therapy* **6**, 403-411.
- Morzunov, S. P., Winton, J. R., y Nichol, S. T. (1995). The complete genome structure y phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Research* **38**, 175-192.
- Nehete, P. N., Arlinghaus, R. B., y Sastry, K. J. (1993). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection y syncytium formation in human cells by V3 loop synthetic peptides from gp120. *Journal Virology* **67**, 6841-6846.

- Newman, C. M., Lawrie, A., Brisken, A. F., y Cumberland, D. C. (2001). Ultrasound gene therapy: on the road from concept to reality. *Echocardiography* **18**, 339-347.
- Nichol, S. T., Rowe, J. E., y Winton, J. R. (1995). Molecular epizootiology y evolution of the glycoprotein y non-virion protein genes of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *Virus Research* **38**, 159-173.
- Niidome, T., Ohmori, N., Ichinose, A., Wada, A., Mihara, H., Harayama, T., y Aoyagi, H. (1997). Binding of cationic alpha-helical peptides to plasmid DNA y their gene transfer abilities into cells. *Journal Biological Chemistry* **272**, 15307-15312.
- Nishikawa, M., y Huang, L. (2001). Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Human Gene Therapy* **12**, 861-870.
- Nishizawa, T., Iida, H., Takano, R., Isshiki, T., Nakajima, K., y Muroga, K. (2002). Genetic relatedness among Japanese, American y European isolates of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) based on partial G y P genes. *Diseases Aquatic Organisms* **48**, 143-148.
- Núñez, E., Fernandez, A. M., Estepa, A., Gonzalez-Ros, J. M., Gavilanes, F., y Coll, J. M. (1998). Phospholipid interactions of a peptide from the fusion-related domain of the glycoprotein of VHSV, a fish rhabdovirus. *Virology* **243**, 322-330.
- Nussbaum, O., Broder, C. C., y Berger, E. A. (1994). Fusogenic mechanisms of enveloped-virus glycoproteins analyzed by a novel recombinant vaccinia virus-based assay quantitating cell fusion-dependent reporter gene activation. *Journal Virology* **68**, 5411-5422.
- Odell, D., Wanas, E., Yan, J., y Ghosh, H. P. (1997). Influence of membrane anchoring y cytoplasmic domains on the fusogenic activity of vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Journal virology* **71**, 7996-8000.
- Ogris, M., Carlisle, R. C., Bettinger, T., y Seymour, L. W. (2001). Melittin enables efficient vesicular escape y enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors. *Journal Biological Chemistry*.
- Olesen, N. J., Lorenzen, N., y Vestergaard-Jorgensen, P. E. (1991). Detection of rainbow trout antibody to Egtved virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence (IF), y plaque neutralization tests (50% PNT). *Diseases Aquatic Organisms* **10**, 31-38.
- Olesen, N. J., Ariel, E., y Slierendrecht, W. (1998). Report of the second annual meeting of EU National Reference Laboratories for Fish Diseases. *Bruxelles, Belgium*. **Sept 15-16**, 21.
- Olesen, N. J., y Korsholm, H. (1997). Control measures for viral diseases in Aquaculture: eradication of VHS y IHN. *Bulletin European Association Fish Pathologists* **17**, 229-233.
- Olesen, N. J., Lorenzen, N., y Jorgensen, P. E. V. (1993). Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicemia virus detected by neutralizing monoclonal y polyclonal antibodies. *Diseases Aquatic Organisms* **16**, 163-170.
- Oshima, K. H., Arakawa, C. K., Higman, K. H., Landolt, M. L., Nichol, S. T., y Winton, J. R. (1995). The genetic diversity y epizootiology of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Research* **35**, 123-141.
- Owens, R. J., Tanner, C. C., Mulligan, M. J., Srinivas, R. V., y Compas, R. W. (1990). Oligopeptide inhibitors of HIV-induced syncytium formation. *AIDS Research Human Retroviruses* **6**, 1289-1296.
- PedrosoDeLima, M. C., Simoes, S., Pires, P., Faneca, H., y Duzgunes, N. (2001). Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Advances Drug Delivery Reviews* **47**, 277-294.
- Perez, L., Estepa, A., y Coll, J. M. (1998). Purification of the glycoprotein G from VHSV, a fish rhabdovirus, by lectin affinity chromatography. *Journal Virological Methods* **76**, 1-8.
- Radler, J. O., Koltover, I., Salditt, T., y Safinaya, C. R. (1997). Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* **275**, 810-814.

Ramsdale, E. E., Kingsman, S. M., y Kingsman, A. J. (1996). The "putative" leucine zipper region of murine leukemia virus transmembrane protein (p15e) is essential for viral infectivity. *Virology* **220**, 100-108.

Rapaport, D., Ovadia, M., y Shai, Y. (1995). A synthetic peptide corresponding to a conserved heptad repeat domain is a potent inhibitor of Sendai virus-cell fusion: an emerging similarity with functional domains of other viruses. *EMBO Journal* **14**, 5524-5531.

Reitter, J. N., Sergel, T., y Morrison, T. G. (1995). Mutational analysis of the leucine zipper motif in the Newcastle disease virus fusion protein. *Journal Virology* **69**, 5995-6004.

Renard, A., y Thiry, M. (1990). Recombinant polypeptides of the hemorrhagic septicemia virus of fish. *Patent: Eurogentec SA (BE) WO 9004028-A 2*.

Rigaut, K. D., Birk, D. E., y Lenard, J. (1991). Intracellular distribution of input vesicular stomatitis virus proteins after uncoating. *Journal Virology* **65**, 2622-2628.

Rinaldi, A. C., DiGiulio, A., Liberi, M., Gualtieri, G., Oratore, A., Bozzi, A., Schinina, M. E., y Simmaco, M. (2001). Effects of temporins on molecular dynamics y membrane permeabilization in lipid vesicles. *Journal Peptide Research* **58**, 213-220.

Rocha, A., Fernandez-Alonso, M., Mas, V., Perez, L., Estepa, A., y Coll, J. M. (2002a). Antibody response to a linear epitope of the protein G of a rhabdovirus in immunized trout. *Veterinary Immunology Immunopathology* **86**, 89-99.

Rocha, A., Fernandez-Alonso, M., Mas, V., Perez, L., Estepa, A., y Coll, J. M. (2002b). Antibody response to a linear epitope of the protein G of VHS rhabdovirus in immunized trout. *Veterinary Immunology Immunopathology* **86**, 89-99.

Roche, S., y Gaudin, Y. (2002). Characterization of the equilibrium between the native y fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is made of several trimers. *Virology* **297**, 128-135.

Rols, M. P., y Teissie, J. (1998). Electroporation of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration. *Biophysical Journal* **75**, 1415-1423.

Sadaghiani, B., Crawford, B. J., y Vielkind, J. R. (1994). Generation of poly- y monoclonal antibodies against trout fibronectin (FN) y their use in FN immunodetection in teleost fishes. *Biochemical Cell Biology* **72**, 343-348.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*.

Sanchez, C., Coll, J. M., y Dominguez, J. (1991). One step purification of rainbow trout immunoglobulin. *Veterinary Immunology Immunopathology* **27**, 383-392.

Sanz, F., y Coll, J. M. (1992a). Detection of viral haemorrhagic septicemia virus by direct immunoperoxidase with selected anti-nucleoprotein monoclonal antibody. *Bulletin European Association Fish Pathologists* **12**, 116-119.

Sanz, F. A., y Coll, J. M. (1992b). Detection of hemorrhagic septicemia virus of salmonid fishes by use of an enzyme-linked immunosorbent assay containing high sodium chloride concentration y two noncompetitive monoclonal antibodies against early viral nucleoproteins. *American Journal Veterinary Res* **53**, 897-903.

Sato, Y., Yamauchi, N., Takahashi, M., /.../, y Niitsu, Y. (2000). In vivo gene delivery to tumor cells by transferrin-streptavidin-DNA conjugate. *FASEB Journal* **14**, 2108-2118.

Scherman, D., Bessodes, M., Cameron, B., Herscovici, J., Hofland, H., Pitard, B., Soubrier, F., Wils, P., y Cruzet, J. (1998). Application of lipids y plasmid design for gene delivery to mammalian cells. *Current Opinion Biotechnology* **9**, 480-485.

Schiavone, N., Papucci, L., Luciani, P., Lapucci, A., Donnini, M., y Capaccioli, S. (2000). Induction of apoptosis y mitosis inhibition by degraded DNA lipotransfection mimicking genotoxic drug effects. *Biochemical Biophysical Research Communications* **270**, 406-414.

Schlegel, R., Sue, T. T., Willingham, M. C., y Pastan, I. (1983). Inhibition of VSV binding y infectivity by phosphatidylserine: Is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell* **32**, 639-646.

Schlegel, R., y Wade, M. (1983). Neutralized vesicular stomatitis virus binds to host cells by a different receptor. *Biochemical Biophysical Research Communication* **114**, 774-779.

- Schlegel, R., Willigan, M. C., y H.Pastan, I. H. (1982). Saturable binding sites for vesicular stomatitis virus on the surface of Vero cells. *Journal Virology* **43**, 871-875.
- Schlotfeldt, H. J., Ahne, W., Vestergard-Jorgensen, P. E., y Glende, W. (1991). Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*)-A natural outbreak. *Bulletin European Association Fish Pathologists* **11**, 105-107.
- Schuetze, H., Egbert, M., y Mettenleiter (1999). Complete genomic sequence of viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. *Virus genes* **19**, 59-65.
- Schuetze, H., Enzmann, P. J., Kuchling, R., Mundt, E., Niemann, N., y Mettenleiter, T. C. (1995). Complete genomic sequence of the fish rhabdovirus infectious haematopoietic necrosis virus. *Journal General Virology* **76**, 2519-2527.
- Schulz, G. E., y Schimer, R. H. (1984). Principles of protein structure. *ed. Springer-Verlag, N.Y.*, 2.
- Schuster, M., Wu, G. Y., Walton, C. M., y Wu, C. H. (1999). Multicomponent DNA carrier with a vesicular stomatitis virus G-peptide greatly enhances liver-targeted gene expression in mice. *Bioconjugation Chemistry* **10**, 1075-1083.
- Sebestyen, M. G., Ludtke, J. J., Bassik, M. C., Zhang, G., Budker, V., Lukhtanov, E. A., Hagstrom, J. E., y Wolf, J. A. (1998). DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nature Biotechnology* **16**, 80885.
- Sergel-Germano, T., McQuain, C., y Morrison, T. (1994). Mutations in the fusion peptide y heptad repeat regions of the Newcastle disease virus fusion protein block fusion. *Journal Virology* **68**, 7654-7658.
- Sharps, A., Nishiyama, K., Collodi, P., y Barnes, D. (1992). Comparison of activities of mammalian viral promoters directing gene expression in vitro zebrafish y other fish cell lines. *Molecular Marine Biology Biotechnology* **1**, 426-341.
- Shokralla, S., Chernish, R., y Ghosh, H. P. (1999). Effects of double-site mutations of vesicular stomatitis virus glycoprotein G on membrane fusion activity. *Virology* **256**, 119-129.
- Shokralla, S., He, Y., Wanas, E., y Ghosh, H. P. (1998). Mutations in a carboxy-terminal region of vesicular stomatitis virus glycoprotein G that affect membrane fusion activity. *Virology* **242**, 39-50.
- Simoes, S., Slepushkin, V., Duzgunes, N., y PedrosoDeLima, M. C. (2001). On the mechanisms of internalization y intracellular delivery mediated by pH-sensitive liposomes. *Biochemical Biophysical Acta* **1515**, 23-37.
- Singh, M., Balram, S., y Ariatti, M. (2001). Lipoplex-mediated stable gene transfer into HeLa cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **20**, 889-891.
- Skehel, J. J., y Wiley, D. C. (1998). Coiled coils in both intracellular vesicle y viral membrane fusion. *Cell* **95**, 871-874.
- Slepushkin, V. A., Kornilaeva, G. V., Andreev, S. M., Sidorova, M. V., Petrukhina, A. O., Matsevich, G. R., Raduk, S. V., Grigoriev, V. B., Makarova, T. V., Lukashov, V. V., y Karamov, E. V. (1993). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) penetration into target cells by synthetic peptides mimicking the N-terminus of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Virology* **194**, 294-301.
- Snow, M., y Smail, D. A. (1999). Experimental susceptibility of turbot *Scophthalmus maximus* to viral haemorrhagic septicemia virus isolated from cultivated turbot. *Diseases Aquatic organisms* **38**, 163-168.
- Stamatatos, L., Leventis, R., Zuckerman, M. J., y Silviu, J. R. (1988). Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles y biological membranes. *Biochemistry* **27**, 3917-3925.
- Superti, F., Derer, M., y Tsiang, H. (1984). Mechanism of rabies virus entry into CER cells. *Journal General Virology* **65**, 781-789.
- Superti, J., Seganti, L., Tsiang, H., y Orsi, N. (1984). Role of phospholipids in rhabdovirus attachment to Cer cells: Brief report. *Archives Virology* **81**, 321-328.
- Tang, F., y Hughes, J. A. (1998). Introduction of a disulphide bond into a cationic lipid enhances transgene expression of plasmid DNA. *Biochemical Biophysical Research Communications* **242**, 141-145.

- Thiry, M., Lecoq-Xhonneux, F., Dheur, I., Renard, A., y Kinkelin, D. (1991a). Molecular cloning of the m-RNA coding for the G protein of the viral haemorrhagic septicaemia (VHS) of salmonids. *Journal Veterinary Microbiology* **23**, 221-226.
- Thiry, M., Lecoq-Xhonneux, F., Dheur, I., Renard, A., y Kinkelin, D. (1991b). Sequence of a cDNA carrying the glycoprotein gene y part of the matrix protein M2 gene of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *Biochimica Biophysica Acta* **1090**, 345-347.
- Tordo, N., Bourhy, H., Sather, S., y Ollo, R. (1993). Structure y expression in baculovirus of the Mokola virus glycoprotein: an efficient recombinant vaccine. *Virology* **194**, 59-69.
- Tseng, W. C., Haselton, F. R., y Giorgio, T. D. (1999). Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes. *Biochimica Biophysica Acta* **1445**, 53-64.
- Unger, E. C., McCreery, T. P., y Sweitzer, R. H. (1997). Ultrasound enhances gene expression of liposomal transfection. *Investigation Radiology* **32**, 723-727.
- Vacik, J., Dean, B. S., Zimmer, W. E., y Dean, D. A. (1999). Cell-specific nuclear import of plasmid DNA. *Gene Therapy* **6**, 1006-1014.
- Verri, T., Argenton, F., Tomanin, R., Scarpa, M., Storelli, C., Costa, R., Colombo, L., y Bortolussi, M. (1997). The bacteriophage T7 binary system activates transient transgene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Biochemical Biophysical Research Communications* **237**, 492-495.
- Vestergaard-Jorgensen, P. E. (1972). Egtved virus: antigenic variation in 76 virus isolates examined in neutralization test y by means of the fluorescent antibody technique. *Symposiums Zoological Society* **30**, 333-339.
- Wagner, E., Ogris, M., y Zauner, W. (1998). Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery. *Advances Drug Delivery Reviews* **30**, 97-113.
- Walker, P. J., y Kongsuwan, K. (1999). Deduced structural model for animal rhabdovirus glycoproteins. *Journal General Virology* **80**, 1211-1220.
- Walker, S. P., Symonds, J. E., Sin, I. L., y Sin, F. Y. T. (1995). Gene transfer by electroporated chinook salmon sperm. *Journal Marine Biotechnology* **3**, 232-234.
- Wasan, E. K., Reimer, D. L., y Bally, M. B. (1996). Plasmid DNA is protected against ultrasonic cavitation-damage when complexed to cationic liposomes. *Journal Pharmacological Science* **85**, 427-433.
- White, J. M. (1992). Membrane fusion. *Science* **258**, 917-924.
- Whitt, M. A., Buonocore, L., Prehaud, C., y Rose, J. K. (1991). Membrane fusion activity, oligomerization, y assembly of the rabies virus glycoprotein. *Virology* **185**, 681-688.
- Whitt, M. A., Zagouras, P., Crise, B., y Rose, J. K. (1990). A fusion-defective mutant of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Journal Virology* **64**, 4907-4913.
- Wild, C., Dubay, J. W., Greenwell, T., Baird, T., Oas, T. G., McDanal, C., Hunter, E., y Matthews, T. (1994). Propensity for a leucine zipper-like domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to form oligomers correlates with a role in virus-induced fusion rather than assembly of the glycoprotein complex. *Proceedings National Academy Sciences USA* **91**, 12676-12680.
- Wild, C., Greenwell, T., y Matthews, T. (1993). A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *Aids Research y Human Retroviruses* **9**, 1051-1053.
- Wild, C., Greenwell, T., Shugars, D., Rimsky-Clarke, L., y Matthews, T. (1995). The inhibitory activity of an HIV type 1 peptide correlates with its ability to interact with a leucine zipper structure. *Aids Research y Human Retroviruses* **11**, 323-325.
- Wild, C., McDanal, C., Bolognesi, D., y Mathews, T. (1992). A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure y viral inhibition. *Proceedings National Academy Sciences USA* **77**, 3273-3277.
- Wild, T. F., y Buckland, R. (1997). Inhibition of measles virus infection y fusion with peptides corresponding to the leucine zipper region of the fusion protein. *Journal General Virology* **78**, 107-111.

- Wilke, M., Fortunati, E., VanDenBroek, M., Hoogeveen, A. T., y Scholte, B. J. (1996). Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. *Gene Therapy* **3**, 1133-1142.
- Wilson, G. L., Dean, B. S., Wang, G., y Dean, D. A. (1999). Nuclear import of plasmid DNA in digitonin-permeabilized cells requires both cytoplasmic factors and specific DNA sequences. *Journal Biological Chemistry* **274**, 22025-22032.
- Winton, J., Batts, W., Deering, R., Brunson, R., Hopper, K., Nishizawa, T., y Stehr, C. (1991). Characteristics of the first North American isolations of viral hemorrhagic septicemia virus. *Proceedings second international symposium on viruses of lower vertebrates. Oregon State Univ.Press. Corvallis.* **1**, 43-50.
- Winton, J. R., Ahrens, P., y Einer-Jensen, K. (2001). Molecular Diagnosis of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus y Viral Hemorrhagic Septicemia Virus. *GenBank* **AF345857**.
- Wunner, W. H., Reagan, K. J., y Koprowski, H. (1984). Characterization of saturable binding sites for rabies virus. *Journal Virology* **50**, 691-697.
- Wyber, J. A., Andrews, J., y D'Emmanuele, A. (1997). The use of sonication for the efficient delivery of plasmid DNA into cells. *Pharmaceutical Research* **14**, 750-756.
- Wyman, T. B., Nicol, F., Zelpathi, O., Scaria, P. V., Plank, C., y Szoka, F. C. (1997). Design, synthesis y characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids y permeabilizes bilayers. *Biochemistry* **27**, 3008-3017.
- Xing, Y. Y., Vende, P., Biacchesi, S., Lamoureux, A., Bearzotti, M., y Bremont, M. (1998). Completion of the viral hemorrhagic septicemia virus genome sequence: the L gene encoding the RNA-dependent RNA polymerase. *GenBank* **AJ233396**.
- Yamada, S., y Ohnishi, S. (1986). Vesicular stomatitis virus binds y fuses with phospholipid domain in target cell membranes. *Biochemistry* **25**, 3703-3708.
- Yao, Q., y Compans, R. W. (1996). Peptides corresponding to the heptad repeat sequence of human parainfluenza virus fusion protein are potent inhibitors of virus infection. *Virology* **223**, 103-112.
- Zhang, L., y Ghosh, H. P. (1994). Characterization of the putative fusogenic domain in vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Journal Virology* **68**, 2186-2193.

*Fabregas, J., García, D., Fernandez-Alonso, M, **Rocha, A.I.**, Gómez-Puertas, P., Escribano, Otero, A. y Coll, J.M. In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VSHV) y African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. Antiviral Research. 44 (1999)67-73.

***Rocha, A.** y Coll, J.M. Investigación actual en vacunas para la Acuicultura. AquaTIC. <http://aquatic.unizar.es/n3/art110vacunas.htm> (2000)

*Fernandez-Alonso, M., **Rocha, A.** y Coll, J.M. ADN vaccination by immersion y ultrasound to trout viral haemorrhagic septicaemia virus. Vaccine 19(2001)3067- 3075

*López, A., Fernandez-Alonso, M., **Rocha, A.**, Estepa, A. y Coll, J.M. Transfection of epithelioma papulosum cyprini (EPC) carp cells. Biotech. Letters 23 (2001)481-4

*Estepa, A., **Rocha, A.**, Mas, V., Perez, L., Encinar, J.A., Nuñez, E., Fernandez, A.A., Gonzalez-Ros, J.M. y Coll, J.M. A fragment from the rhabdoviral protein G induces pH-dependent cell-to-cell fusion invreasing β -sheet conformation, anionic phospholipid binding y phosphatidylserine exposure. J.Biol.Chemistry 276 (2001) 46268-:46275

***Rocha,A.**, Ruiz,S., Estepa,A. y Coll, J.M. Biología Molecular de los peces <http://aquatic/unizar.es/n3/art1502/biolmolpez.htm> 15 (2001)

***Rocha,A.** Fernandez-Alonso, M., Mas,V. Perez,L., Estepa, A. y Coll, J.M. Antibody response to a linear epitope of the protein G of VHS rhabdovirus in immunized trout. Vet.Immunol. Immunopathol. 86 (2002)89-99

*Mas, V., Pérez, L., Encinar, J.A., Pastor, M., **Rocha, A.**, Perez, E., Barrera, F.N., Ferrer-Montiel, A., Gonzalez Ros. J.M., Estepa, A. y Coll, J.M. Salmonid viral haemorrhagic septicemia virus: fusion related enhancement of virus infectivity by peptides derived from viral glycoprotein G or a combinatorial library. J. General Virology 83(2002)2671-2681.

***Rocha,A.**, Ruiz,S., y Coll, J.M. Estudios sobre translocación de complejos ADN-liposomas a través de membranas celulares para mejorar la transfección en células eucariontes. Investigaciones Agrarias 17(2002)5-20

***Rocha,A.**, Ruiz,S., y Coll, J.M. Método sencillo para producir huevos embrionados de pez cebra. Investigaciones Agrarias 17(2002)93-102

***Rocha,A.**, Ruiz,S., Estepa,A. y Coll, J.M. Review. Fish as a biofactory: inducible genetic systems and gene targeting. Spanish Journal of Agricultural Research 1 (3)(2003) 3-11.

***Rocha,A.**, Ruiz,S., Estepa,A. y Coll, J.M. Review on the application of inducible y targeted gene-strategies to produce transgenic fish. Marine Biotechnology (en prensa)(2003).

***Rocha,A.**, Ruiz,S., y Coll, J.M. Improvement of transfection efficiency of epithelioma papulosum cyprini carp cells by modification of their cell cycle y by using an optimal promoter. Marine Biotechnology (en prensa)(2003).

***Rocha,A.I.**, Ruiz, S. y Coll, JM. Characterization of the syncytia formed by VHS salmonid rhabdovirus G-gene transfected cells Vet.Immunol. Immunopathol (en prensa) (2003).

*Mas, V. **Rocha, A.**, Coll, J.M. y Estepa, A. Reversible inhibition of spreading of in vitro infection and imbalance of viral protein accumulation at low pH in VHSV, a salmonid rhabdovirus. J. of Virology. (en prensa) (2003).