

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CC. QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**ESTRUCTURA, PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO Y
ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA F DEL VIRUS
RESPIRATORIO SINCITAL HUMANO**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Luis González Reyes

Bajo la dirección de los Doctores:
José Antonio Melero Fondevila
Blanca García Barreno

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-1827-2

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

**ESTRUCTURA, PROCESAMIENTO
PROTEOLÍTICO Y ACTIVACIÓN DE LA
PROTEÍNA F DEL VIRUS
RESPIRATORIO SINCITIAL HUMANO**

Luis González Reyes

Madrid, mayo 2001



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

**ESTRUCTURA, PROCESAMIENTO
PROTEOLÍTICO Y ACTIVACIÓN DE LA
PROTEÍNA F DEL VIRUS
RESPIRATORIO SINCITIAL HUMANO**

DIRECTORES

Dr. José Antonio Melero Fondevila

Dra. Blanca García Barreno

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR QUE PRESENTA
LUIS GONZÁLEZ REYES
MAYO 2001

Bueno, ya estamos en el final, por lo menos para mi. Ahora es el momento de las recapitulaciones y lo primero que habría que decir es que, este trabajo, como todo lo que hacemos los humanos, en lugar de llevar en la portada un autor debería llevar unos cuantos más.

A los primeros que obviamente hay que nombrar es a los que han actuado como mis directores de tesis: José Antonio Melero y Blanca García. Es indudable que sin ellos este trabajo no habría llegado a ser real.

Todas las imágenes de microscopía electrónica que se presentan no las he hecho yo, se las debo a Leslie Calder del laboratorio de John Skehel.

Además, tampoco he sido yo el que ha realizado los ensayos de espectrometría de masas ni de secuenciación N-terminal, ya que los hizo Juan Antonio López del laboratorio de Juan Pablo Albar. A Juan Antonio, también le tengo que estar agradecido por toda la herencia que me ha dejado tras su paso por el laboratorio, especialmente por un par de vaccinias recombinantes a los que he dado bastante juego.

En un lugar destacado también debe estar Begoña Ruiz, ya que con ella he trabajado en mi última etapa en el laboratorio y sus manos hicieron parte del trabajo que aquí se presenta, especialmente ese vaccinia recombinante de la proteína F_{TM}- con un cambio en el sitio II.

Y, ¿cómo no? tengo que nombrar al resto de compañeras (han sido más ellas que ellos) del laboratorio, las primeras y las últimas que, en mayor o menor medida, me han echado una manita y me han enseñado mucho de lo que he aprendido en estos años. Muchas gracias a Nuria, Isidoro, Concha, Patricia, Tito, Mariano, Mariasun, Silvia, Sandra, Teresa, Regina, Luis, Odalys, Mar y María José.

Además tengo que agradecer su trabajo a Lucinio, que ha sido el que se ha encargado de pinchar a los conejos y a Pablo y Blanca, que han realizado la secuenciación del DNA.

A Paco Montero le tengo que agradecer (y ya van dos veces) el haberme dado la oportunidad de entrar en este mundo y conocerlo. Así se ha cumplido uno de mis sueños de hace muchos años.

Aquí empezaría el terreno, mucho más difuso, de lo subjetivo. Ahora es cuando habría que agradecer una mirada cómplice, una charla amena, unas orejas que escuchan, una paciencia a veces demasiado grande, un ofrecimiento de ayuda muy generoso, un beso (y otro más), una noche loca o tranquila, un ejemplo de lucha, un contraste en la vida ... Pero, aunque se pudiera, ya sabéis que yo no dejo propinas, que creo que hay cosas que se dan por descontado o no tienen sentido y que lo que sale de dentro tiene un valor que no se mide en palabras agradecidas.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Clasificación del VRSH	3
I.2 Características de la enfermedad	4
I.2.1 Epidemiología	4
I.2.2 Manifestaciones clínicas y diagnóstico	5
I.2.3 Tratamiento y prevención del VRSH	6
I.3 Biología molecular del VRSH	7
I.3.1 Genoma	7
I.3.2 Proteínas virales	8
I.4 La glicoproteína F del VRSH	11
I.4.1 Estructura primaria y maduración	11
I.4.2 Estructura secundaria	13
I.4.3 Estructura terciaria y cuaternaria	14
I.4.4 Características estructurales comunes entre las proteínas F de los paramixovirus	15
I.4.4.1 Estructura primaria y maduración	15
I.4.4.2 Estructura tridimensional	17
I.5 Fusión de membranas	21
II OBJETIVOS	25
III MATERIALES Y MÉTODOS	29
III.1 Materiales	31
III.1.1 Material biológico	31
III.1.1.1 Líneas celulares de mamífero	31
III.1.1.2 Anticuerpos monoclonales (AcMs)	31
III.1.1.3 Virus	31
III.1.1.4 Bacterias y plásmidos	31
III.1.2 Enzimas y oligonucleótidos	32
III.1.2.1 Enzimas	32
III.1.2.2 Oligonucleótidos	32
III.1.3 Reactivos	33
III.1.3.1 Productos químicos	33

III.1.3.2 Productos inmunoquímicos	33
III.1.3.3 Productos radioactivos	33
III.1.4 Medios de cultivo	34
III.1.4.1 Células eucariotas	34
III.1.4.2 Bacterias	34
III.2 Métodos	34
III.2.1 Manipulación de células animales y virus	34
III.2.1.1 Cultivo de células eucariotas	34
III.2.1.2 Crecimiento y purificación del VRSH	34
III.2.1.3 Crecimiento de virus vaccinia	35
III.2.1.4 Titulación del virus vaccinia por plaqueo en agar	35
III.2.1.5 Construcción de virus vaccinia recombinantes	35
III.2.2 Manipulación y clonaje de ácidos nucleicos	36
III.2.2.1 Cultivo de bacterias y preparación de células competentes	36
III.2.2.2 Clonaje de DNA	36
III.2.2.3 Caracterización de plásmidos recombinantes	37
III.2.3 Purificación de AcMs y proteínas	37
III.2.3.1 Purificación de AcMs	37
III.2.3.2 Preparación de columnas de inmunoafinidad	38
III.2.3.3 Purificación de la proteína F _{TM} -	38
III.2.3.4 Purificación de la proteína F	38
III.2.4 Expresión y caracterización de proteínas en células eucariotas	39
III.2.4.1 Marcaje metabólico de proteínas	39
III.2.4.2 Preparación de extractos celulares	39
III.2.4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida, electrotransferencia e inmunodetección de proteínas (<i>western blot</i>)	40
III.2.4.4 Inmunoprecipitación	40
III.2.4.5 ELISA	41
III.2.4.6 Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa	41
III.2.4.7 Microscopía electrónica	41
III.2.4.8 Secuencia N-terminal y espectrometría de masas	41
III.2.4.9 Digestión con N-glicosidasa F	42

III.2.5 Obtención de sueros anti-péptido y anti-F	42
III.2.6 Alineamiento de secuencias	43
IV RESULTADOS	45
IV.1 Purificación de las proteínas F y F_{TM-} a partir de virus vaccinia recombinantes que expresan ambas proteínas	47
IV.1.1 Puesta a punto de la purificación de la proteína F _{TM-}	47
IV.1.2 Puesta a punto de la purificación de la proteína F	50
IV.2 Comparación de las proteínas F y F_{TM-}	52
IV.2.1 Movilidad electroforética en distintas condiciones de calentamiento y reducción	52
IV.2.2 Susceptibilidad a la digestión con tripsina	53
IV.2.3 Reactividad en ELISA con a AcMs específicos de la proteína F	54
IV.2.4 Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa	55
IV.2.5 Microscopía electrónica	56
IV.3 Análisis estructural de las proteínas F y F_{TM-} por inmunomicroscopía electrónica	58
IV.4 Procesamiento proteolítico de las proteínas F y F_{TM-}. Descripción de un nuevo sitio de procesamiento	61
IV.4.1 Caracterización de estadios intermedios de procesamiento de la proteína F _{TM-}	62
IV.4.2 Procesamiento proteolítico de la proteína F	70
IV.4.3 Preparación y caracterización de proteínas F y F _{TM-} con cambios en los sitios de procesamiento I y II	72
IV.4.3.1 Caracterización de mutantes de la proteína F _{TM-} en el sitio de procesamiento I	72
IV.4.3.2 Caracterización de mutantes de la proteína F en el sitio de procesamiento I	74
IV.4.3.2 Caracterización de un mutante de la proteína F _{TM-} en el sitio de procesamiento II	74
IV.4.4 Cooligomerización de moléculas de F _{TM-} con diversos grados de procesamiento	75
IV.5 Estudio de la activación de la proteína F	78
IV.5.1 Obtención y caracterización de proteína F _{TM-} totalmente procesada proteolíticamente	78
IV.5.2 Obtención y caracterización de proteína F totalmente procesada proteolíticamente	84

IV.5.3 Caracterización de los mutantes F _{TM} -R108N/R109N y F _{TM} -Δ131-134	86
V DISCUSIÓN	89
V.1 Estructura de la proteína F	91
V.1.1 Plegamiento de proteínas de fusión en ausencia de las regiones transmembrana y citoplasmática	91
V.1.2 Estructura de las proteínas F y F _{TM} -	92
V.1.3 Estructura cuaternaria de la proteína F	96
V.2 Procesamiento de la proteína F	97
V.2.1 Comparación del procesamiento de la proteína F del VRSH con el de proteínas de fusión de otros paramixovirus	97
V.2.2 Procesamiento de la proteína F del VRSH	100
V.3 Activación de la proteína F	101
V.3.1 Mecanismo de activación de la proteína F del VRSH	101
V.3.2 Analogías y diferencias entre los mecanismos de fusión de los paramixovirus	105
VI CONCLUSIONES	109
VII BIBLIOGRAFÍA	113

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura I.1.1: Comparación de los genomas de la familia <i>Paramyxoviridae</i>	4
Figura I.3.1: Mapa genético de la cepa Long del VRSH	7
Figura I.3.2: Representación esquemática de la estructura de la partícula del VRSH	9
Figura I.4.1: Estructura primaria de la proteína F del VRSH	12
Figura I.4.2: Predicción de la estructura secundaria de la proteína F del VRSH	14
Figura I.4.3: Estructura del complejo RHA-RHB de la proteína F del VRSH	15
Figura I.4.4: Estructura primaria de los paramixovirus	16
Figura I.4.5: Estructura de la proteína F de virus de la enfermedad de Newcastle	18
Figura I.4.6: Estructura de las regiones heptádicas adyacentes al péptido de fusión	20
Figura IV.1.1: Expresión de la proteína F _{TM-} en células infectadas con VRBF _{TM-} en presencia de distintos porcentajes de STF	47
Figura IV.1.2: Precipitación de proteína F _{TM-} con (NH ₄) ₂ SO ₄	48
Figura IV.1.3: Purificación de la proteína F _{TM-} por cromatografía de inmunoafinidad	49
Figura IV.1.4: Optimización de la purificación de proteína F _{TM-}	50
Figura IV.1.5: Purificación de proteína F	51
Figura IV.2.1: <i>Western blot</i> de las proteínas F _{TM-} y F en distintas condiciones de reducción y calentamiento	52
Figura IV.2.2: Susceptibilidad a la digestión con tripsina de las proteínas F _{TM-} y F	53
Figura IV.2.3: Reactividad en ELISA de las proteínas F y F _{TM-} purificadas	54
Figura IV.2.4: Ultracentrifugación de las proteínas F y F _{TM-} en gradientes de sacarosa	55
Figura IV.2.5: Microscopía electrónica de las proteínas F y F _{TM-}	56
Figura IV.2.6: Esquema de las proteínas F _{TM-} y F observadas al microscopio electrónico	57
Figura IV.3.1: Inmunomicroscopía electrónica de las proteínas F y F _{TM-} con los AcMs 2F, 47F y 56F	59
Figura IV.3.2: Inmunomicroscopía electrónica de los complejos AcM-proteína F	60
Figura IV.3.3: Unión de AcMs a las proteínas F y F _{TM-}	61
Figura IV.4.1: Análisis de la proteína F _{TM-} purificada	63

Figura IV.4.2: Espectrometría de masas de los péptidos trípticos de las bandas α , β , γ y δ	64
Figura IV.4.3: Secuencia N-terminal de las bandas β y γ	68
Figura IV.4.4: Digestión de la proteína F_{TM-} con N-glicosidasa F	70
Figura IV.4.5: <i>Western blot</i> de preparaciones de proteína F y F_{TM-}	71
Figura IV.4.6: Comparación del tamaño de las cadenas F2 de las proteínas F_{TM-} y F	72
Figura IV.4.7: Análisis de las proteínas F_{TM-} mutantes en el sitio de procesamiento I	73
Figura IV.4.8: Análisis de las proteínas F mutantes en el sitio de procesamiento I	74
Figura IV.4.9: <i>Western blot</i> de las proteínas F_{TM-} , $F_{TM-\Delta 131-134}$ y $F_{TM-R108N/R109N}$ purificadas	75
Figura IV.4.10: Inmunoprecipitación del sobrenadante de células infectadas con VRBF $_{TM-}$ con una mezcla de AcMs anti-F1 y con el suero $\alpha F_{104-117}$	76
Figura IV.4.11: Cooligomerización de moléculas no totalmente y totalmente procesadas	77
Figura IV.5.1: <i>Western blot</i> de la digestión con tripsina de proteína F_{TM-}	78
Figura IV.5.2: SDS-PAGE de la digestión con tripsina de estadios intermedios de procesamiento en la proteína F_{TM-}	79
Figura IV.5.3: Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa de la proteína F_{TM-} sin digerir y digerida con tripsina	80
Figura IV.5.4: Microscopía electrónica de preparaciones de proteína F_{TM-} sin digerir o digerida con tripsina	81
Figura IV.5.5: Digestión con tripsina de proteína F_{TM-} a distintas temperaturas	82
Figura IV.5.6: Proteína F_{TM-} sin digerir o digerida con tripsina a distintas temperaturas	83
Figura IV.5.7: Digestión con tripsina de proteína F	84
Figura IV.5.8: Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de la proteína F sin digerir o digerida con tripsina	85
Figura IV.5.9: Microscopía electrónica de preparaciones de proteína F sin digerir o digerida con tripsina	86
Figura IV.5.10: Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de las proteínas F_{TM-} , $F_{TM-R108N/R109N}$ y $F_{TM-\Delta 131-134}$	87
Figura IV.5.11: Microscopía electrónica de fracciones de los gradintes de proteína F_{TM-} , $F_{TM-R108N/R109N}$ y $F_{TM-\Delta 131-134}$	88
Figura V.1.1: Diagrama de la estructura primaria de la proteína F y localización de las regiones antigénicas en las espículas	93
Figura V.2.1: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la cadena F2 de la proteína F de distintas cepas del VRSH	98

Figura V.2.2: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la cadena F2 de la proteína F de los pneumovirus	
Figura V.2.3: Comparación del número de residuos de la cadena F2 de distintos paramixovirus	99
Figura V.3.1: Modelo de activación de la proteína F del VRSH	104

TABLAS

Tabla III.1.1: Plásmidos utilizados	31
Tabla III.1.2: Secuencia de los oligonucleótidos empleados	32

ABREVIATURAS

A	Amperios
Abs	Absorbancia
AcM	Anticuerpo monoclonal
AcMs	Anticuerpos monoclonales
ATTC	Colección estadounidense de cultivos tipo
b	Bases
βME	β-Mercaptoetanol
°C	Grados Celsius
cDNA	DNA complementario
Ci	Curio
col.	Colaboradores
cpm	Cuentas por minuto
cRNA	RNA complementario
Da	Daltons
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etilen diamino tetracetato sódico
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
Fab	Parte de la molécula de Ig que contiene el sitio de unión con el antígeno
g	Gramo
h	Hora
HA	Hemaglutinina
HEPES	4 -(2- hidroxietil)-piperazina-1-etano-ácido sulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
Ig	Inmunoglobulina
i.p.	Intraperitoneal
KLH	Keyhol limpet haemocianina
l	Litro
M	Molaridad
m	Metro
mdi	Multiplicidad de infección
min	Minutos
mRNA	RNA mensajero
m/z	masa por unidad de carga
N	Normalidad
ND	No determinado
NDV	Virus de la enfermedad de Newcastle
nt	Nucleótido
NVA	Neumovirus aviar
OPD	O-fenildiamina
ORF	Fase de lectura abierta
P ₃₅	Placa de Petri de 35 mm de diámetro

P ₁₀₀	Placa de Petri de 100 mm de diámetro
P ₁₅₀	Placa de Petri de 150 mm de diámetro
pb	Pares de bases
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pRB/F	Plásmido pRB21 con el gen de la proteína F del VRSH
pRB/F _{TM-}	Plásmido pRB21 con el gen de la proteína F _{TM-} del VRSH
PSA	Persulfato amónico
Q	Calor
RAM	Suero de conejo anti-ratón
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SAB	Seroalbúmina bovina fracción V
SC	Suero de cerdo
SDS	Dodecil sulfato sódico
STF	Suero de ternera fetal
SV5	Virus simio 5
T	Temperatura
TEMED	N-N'-N'-N'-tetrametil-etilendiamina
TPCK	Tosilamida-fenil etil clorometil cetona
Tris	Tris(hidroximetil)-aminoetano
U	Unidades
ufp	Unidades formadoras de placa
V	Voltios
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
VIH-2	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2
VIS	Virus de la inmunodeficiencia simia
VLMM	Virus de la leucemia murina Moloney
vol	Volumen
VPIH-1	Virus de la parainfluenza humana tipo 1
VPIH-2	Virus de la parainfluenza humana tipo 2
VPIH-3	Virus de la parainfluenza humana tipo 3
VPR	Virus de la pneumonía de ratón
vRNA	RNA viral
VRB12	Virus vaccinia carente del gen VP37
VRBF	Virus vaccinia recombinante que expresa la proteína F
VRBF _{TM-}	Virus vaccinia recombinante que expresa la proteína F _{TM-}
VRS	Virus respiratorio sincitial
VRSB	Virus respiratorio sincitial bovino
VRSH	Virus respiratorio sincitial humano
xg	Veces la aceleración de la gravedad

I. INTRODUCCIÓN

Introducción

El virus respiratorio sincitial humano (VRSH) es el principal agente causante de infecciones del tracto respiratorio inferior en lactantes y en niños/as de corta edad, produciendo neumonías y bronquiolitis (Chanock y col., 1957). Es un virus ampliamente difundido que afecta a la totalidad de los niños/as durante los primeros años de vida. Además, existen evidencias de que este virus produce infecciones respiratorias graves en adultos inmunodeprimidos y en ancianos/as (Falsey y col., 1995). El virus se aisló por primera vez en 1956 de un chimpancé que padecía coriza y presentaba síntomas semejantes a los del resfriado común (Morris y col., 1956). Su nombre procede de la capacidad que posee de formar sincitios en células en cultivo.

No se dispone, todavía, ni de terapias antivirales efectivas, ni de vacunas frente al VRSH. Los intentos de vacunación, realizados en los años sesenta utilizando virus inactivado, no tuvieron éxito en inducir protección y, tras una infección natural en los individuos vacunados, se produjo una enfermedad más grave que en los controles sin vacunar (Kapikian y col., 1969; Kim y col., 1969). Los avances en la biología molecular de este virus están siendo muy importantes para el desarrollo de una vacuna eficaz o de un tratamiento adecuado.

I. 1 CLASIFICACIÓN DEL VRSH

El VRSH está clasificado dentro del orden *Mononegavirales* (virus RNA de banda negativa, no segmentados, con una nucleocápsida helicoidal) y pertenece a la familia *Paramyxoviridae*. Las otras familias del orden son: *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* y *Bornaviridae*. Los paramixovirus poseen las siguientes características: i) el genoma está formado por una única cadena de RNA de polaridad negativa que se encuentra en el interior de una nucleocápsida helicoidal (que contiene el complejo polimerasa), que le confiere resistencia a RNasas; ii) el genoma se transcribe secuencialmente por la polimerasa viral, mediante un mecanismo en el que para y reinicia la síntesis de RNAs obedeciendo a señales que actúan en *cis*, dando lugar a la formación de mRNAs; iii) el ciclo viral replicativo es citoplásmico; iv) los viriones adquieren una envuelta lipídica que procede de la membrana plasmática; y v) la entrada en la célula huésped está mediada por la fusión de las membranas viral y celular en una primera etapa de la infección.

La familia *Paramyxoviridae* contiene a su vez dos subfamilias: *Paramyxovirinae* (que se divide en los géneros *Respirovirus*, *Morbillivirus* y *Rubulavirus*) que incluye, entre otros, los virus Sendai, del sarampión, de la enfermedad de Newcastle, simio 5, de la parainfluenza humana (VPIH), de las paperas y Rinderpest; y *Pneumovirinae*, que posee dos géneros, el *Pneumovirus*, representado por el VRSH, así como los virus respiratorios sincitiales bovino, ovino y caprino y el virus de la neumonía del ratón; y el *Metapneumovirus*, con un único representante, el neumovirus aviar (también denominado virus de la rinotraqueítis del pavo).

La subfamilia *Pneumovirinae* se distingue de la *Paramyxovirinae* en que presenta una mayor complejidad genómica (codifica más proteínas como se indica en la

Introducción

Figura I.1.1) y carece de proteínas con actividades de hemaglutinación y/o neuraminidasa. Así, mientras que la proteína HN del género *Respirovirus* posee ambas actividades, la proteína H de los *Morbillivirus* sólo tiene la capacidad de hemaglutinación y la proteína G de los *Pneumovirus*, excepto la del virus de la neumonía de ratón, carece de ambas (Pringle, 1987; Kingsbury, 1990; McIntosh y Chanock, 1990; Collins, 1991).

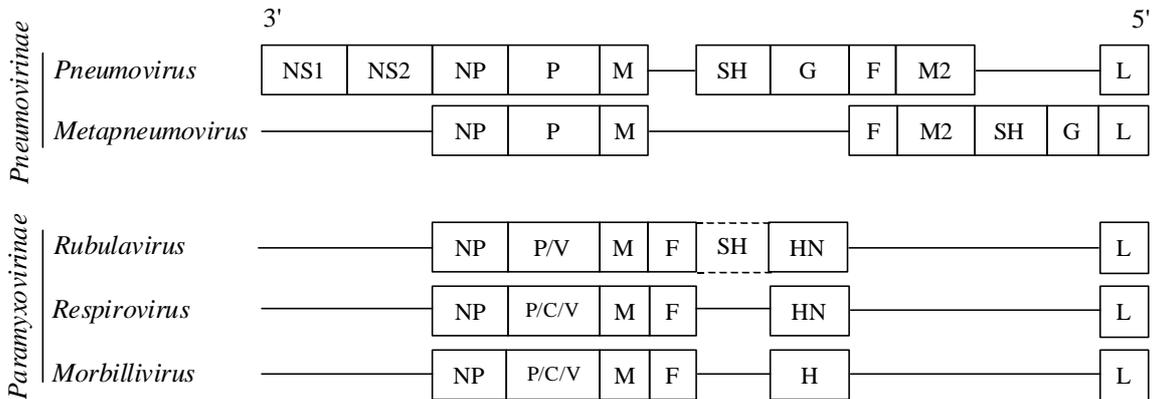


Figura I.1.1: Comparación de los genomas de la familia *Paramyxoviridae*. Cada rectángulo indica un gen diferente. La línea discontinua indica que el gen no aparece en todos los virus del género.

I.2 CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD

I.2.1 EPIDEMIOLOGÍA

El VRSH presenta una distribución mundial y produce epidemias anuales. La mayor susceptibilidad a desarrollar bronquiolitis o neumonía tiene lugar entre las 6 semanas y los 9 meses de edad. Las reinfecciones son frecuentes en todas las edades, aunque en adultos disminuye la incidencia de las mismas y la gravedad de los síntomas (Vikerfors y col., 1987). El VRSH es muy contagioso y se transmite por la dispersión de secreciones respiratorias infectadas o por contacto de las manos con superficies contaminadas y subsiguiente inoculación de la mucosa conjuntiva o nasal (Hall y Douglas, 1981).

Dentro del VRSH se han identificado dos grupos antigénicos por el patrón de reactividad con anticuerpos monoclonales (AcMs): A y B (Anderson y col., 1985; García-Barreno y col., 1989; Mufson y col., 1985; Norrby y col., 1986) y, por análisis de secuencia, se ha demostrado que constituyen dos grupos genéticos diferentes (Cane y Pringle, 1991; Sullender y col., 1991). Ambos grupos antigénicos pueden cocircular en la misma comunidad durante la misma epidemia, variando la frecuencia relativa de su aislamiento de un año a otro, o en el mismo año si se consideran comunidades distintas, aunque, en general, el grupo A circula en mayor proporción (Anderson y col., 1991;

Introducción

Cane y col., 1994; Cane y Pringle, 1991; Hendry y col., 1989, 1986; Monto y Ohmit, 1990; Russi y col., 1989; Tsutsumi y col., 1988). Dentro de cada grupo también se ha puesto de manifiesto la existencia de variabilidad antigénica (Akerlind y col., 1988; Storch y Park, 1987) y genética (Cristina y col., 1990, 1991), así como la cocirculación de virus pertenecientes a múltiples linajes durante la misma epidemia en la misma comunidad y la existencia de virus muy similares circulando en lugares distintos y en diferentes años (Cane y col., 1994; Cane y Pringle, 1991; García y col., 1994).

Cuando se produce una segunda infección en niños/as previamente infectados por virus del grupo A suele ser por un virus del grupo antigénico B (Mufson y col., 1987) y, por otro lado, cada año tienden a predominar virus de diferentes cepas (Cane y col., 1994), sugiriendo que, aunque la respuesta inmune frente a una estirpe viral no es de larga duración, puede estar limitando la propagación del virus y seleccionando nuevas variantes.

La distribución ubicua de la infección por el VRSH, la prevalencia global de un número discreto de genotipos y el agrupamiento temporal (y no local) de los aislados, sugieren que el virus se disemina rápida y continuamente por toda la población mundial (Spence y Barratt, 1986).

I.2.2 MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO

La infección se inicia con la multiplicación del virus en las células epiteliales del tracto respiratorio superior, causando fiebre, tos, congestión nasal, faringitis y/u otitis media (Heikkinen, 1999). Después de 1-3 días progresa hacia el tracto respiratorio inferior, probablemente a través de la aspiración de secreciones infectadas (Roberts y col., 1995).

La infección primaria es responsable de afecciones severas del tracto respiratorio inferior, tales como neumonías, bronquiolitis y traqueobronquitis, en aproximadamente el 1% de las personas entre 2 y 6 meses de edad (McIntosh y Chanock, 1990). En niños/as menores de tres semanas la infección es atípica, presentando irritabilidad y letargo, siendo raras las bronquiolitis y las bronconeumonías (Hall, 1979; Hall y col., 1979a, 1979b). Las infecciones en personas de más edad corresponden, en su mayoría, a reinfecciones y suelen ser leves o asintomáticas. Generalmente afectan sólo al tracto respiratorio superior y son clínicamente indistinguibles del resfriado común. La sintomatología, sin embargo, es más grave en ancianos/as y en adultos inmunodeprimidos, siendo frecuentes las bronquitis y neumonías (Fransen y col., 1967; Garvie y Gray, 1980).

El diagnóstico de la infección por el VRSH suele hacerse a partir de secreciones respiratorias mediante la detección de antígenos virales por ELISA o inmunofluorescencia (Orstavik y col., 1980).

I.2.3 TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DEL VRSH

La dificultad en el tratamiento de las infecciones por el VRSH radica en el hecho de que, la mayor parte de las manifestaciones clínicas, parecen estar relacionadas con la respuesta inmunopatológica que sigue a la fase de replicación del virus. Por ello, la terapia antiviral debería ser extremadamente eficaz para que se pudieran apreciar disminuciones sustanciales en los tiempos de hospitalización y convalecencia, que son generalmente cortos.

La ribavirina es un análogo de la guanosina que, desde 1985, se ha utilizado para el tratamiento de las infecciones por el VRSH. Su eficacia terapéutica es dudosa, aunque *in vitro* (Hruska y col., 1980) inhibe la replicación del virus y algunos estudios demuestran una disminución de la producción de virus en el tracto respiratorio de niños/as infectados (Smith y col., 1991; Mills, 1999). Actualmente sólo se recomienda su utilización, en forma de aerosoles, en el caso de niños/as pertenecientes a grupos de alto riesgo (prematuros/as, con displasia pulmonar, etc.).

La administración intravenosa o tópica de inmunoglobulinas humanas purificadas con un título alto de anticuerpos neutralizantes contra el VRSH o de fragmentos Fab de AcMs humanos recombinantes anti-VRSH (Crowe y col., 1994) demostró ser eficaz desde un punto de vista profiláctico en modelos animales (Hemming y col., 1985; Prince y col., 1987), aunque estudios más recientes sugieren una menor o incluso nula capacidad terapéutica (Prober y Wang, 1997; Rimensberger y col., 1996; Rodríguez y col., 1997). Actualmente, el único tratamiento profiláctico específico aprobado para su uso en niños/as de alto riesgo es la administración intravenosa de inmunoglobulinas de alto título frente al VRSH o de un AcM “humanizado” dirigido contra la proteína F del virus (Johnson y col., 1997).

La administración combinada de ribavirina e inmunoglobulinas a pacientes transplantados de médula ósea infectados por el VRSH aumentó la supervivencia de los mismos en un 22% (Whimbey y col., 1995), lo que sugiere que éste podría ser el tratamiento a seguir en los casos más graves.

Otras terapias que se están probando a nivel experimental son el uso de oligonucleótidos antisentido (Cirino y col., 1997; Jairath y col., 1997) y la quimioterapia con diferentes compuestos que actúen a nivel de adsorción y/o replicación viral: sustancias polianiónicas, EICAR, pirazofurina o ciclopentenilcitosina.

Se han investigado numerosas estrategias vacunales a escala experimental: péptidos sintéticos (Bastien y col., 1997); antígenos virales recombinantes (Plotnicky-Gilquin y col., 1999); vectores basados en virus vaccinia recombinantes defectivos en replicación (Wyatt y col., 1999), en virus recombinantes de la estomatitis vesicular (Kahn y col., 1999) o en virus de la parainfluenza (Schmidt y col., 2001); y vacunas de subunidades que incluyen las proteínas F y G purificadas a partir de células infectadas con el VRSH (Tebbey y col., 1999). Por último, también se han evaluado las vacunas de DNA (Li y col., 1998b; Bembridge y col., 2000) o combinaciones de DNA con proteínas purificadas (Martínez y col., 1999). Un estudio reciente ha demostrado que una vacuna con el virus vivo atenuado en combinación con una vacuna de subunidades proteicas es capaz de proteger a niños/as y ancianos/as de la infección (González, 2000).

En la actualidad todo parece apuntar al desarrollo de vacunas mediante técnicas de biología molecular, las cuales han permitido el rescate de virus genéticamente manipulados a partir de cDNAs, así como la obtención de mutantes termosensibles que

Introducción

tienen disminuida su capacidad de replicación *in vivo* (Crowe, 1999). Así, los progresos realizados en la obtención de virus infectivos a partir de clones de cDNA permitirán el diseño de nuevos virus atenuados con mutaciones específicas o capaces de modular la respuesta inmune por expresión de genes adicionales, tales como citoquinas y/o quimioquinas (Bukreyev y col., 1996).

I.3 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VRSH

I.3.1 GENOMA

El genoma del VRSH está constituido por una molécula de RNA monocatenario, de polaridad negativa y de aproximadamente 15 kb (Lambert y col., 1980; Huang y Wertz, 1982, 1983), que, según se aprecia en la Figura I.3.1, codifica 11 mRNAs (Collins y Wertz, 1983; Venkatesan y col., 1983; Huang y Wertz, 1983; Collins y col., 1984b). Cada gen contiene un marco de lectura abierto (ORF), a excepción del gen M2, que tiene dos. Los mRNAs tienen CAP en el extremo 5' y están poliadenilados en el extremo 3'. Cada gen comienza con una secuencia de 9 nucleótidos denominada *gene start* (GS) altamente conservada, excepto en el gen L (Kuo y col., 1997), y cuya función es controlar el inicio de la transcripción y la adición de CAP. Los dos últimos genes, M2 y L, solapan en 68 nucleótidos, por lo que la señal GS del gen L se localiza dentro del gen M2 (Figura I.3.1). Por este motivo, esta secuencia solapante se transcribe dos veces (Collins y col., 1987; Fearn y Collins, 1999a). Los genes acaban con una secuencia semi-conservada de 12-13 nucleótidos denominada *gene end* (GE), que dirige la terminación de la transcripción y la poliadenilación del mRNA (Collins y col., 1986; Kuo y col., 1996, 1997). Los nueve primeros genes están separados por regiones intergénicas con longitudes de 1-56 nucleótidos y carecen de secuencias consenso (Collins y col., 1986; Johnson y Collins, 1988b).

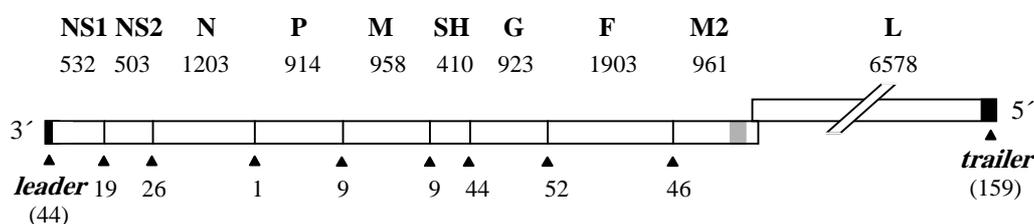


Figura I.3.1: Mapa genético de la cepa Long del VRSH. En la parte superior se indica el nombre y la longitud (nucleótidos) de cada gen. En la parte inferior se señalan las posiciones y longitudes de las secuencias intergénicas, la región de solapamiento entre los genes M2 y L y las secuencias *leader* y *trailer*. La segunda fase de lectura del gen M2 (M2-II) se indica con un cuadro gris.

En cada extremo del RNA viral se encuentran dos regiones no codificantes; un RNA *leader* de 44 nucleótidos en el extremo 3' y una región *trailer* de 159 nucleótidos en el extremo 5' (Mink y col., 1991) (Figura I.3.1). Veintiuno de los primeros 24-26

Introducción

nucleótidos de ambos extremos son complementarios, lo que indica un alto grado de identidad entre los promotores de los extremos 3' del RNA genómico y antigenómico.

La transcripción se produce de forma secuencial desde un único promotor situado en el extremo 3' (la región *leader*), como se pudo comprobar mediante estudios de cinéticas de inactivación de la transcripción por luz ultravioleta y la caracterización de mRNAs policistrónicos. En el modelo propuesto, la polimerasa viral pararía y reiniciaría la síntesis de mRNA en cada secuencia intergénica (Dickens y col., 1984). En el caso concreto del gen L todavía se desconoce cómo la polimerasa accede a la región GS, que se encuentra dentro de la región solapante con el gen M2. Se ha propuesto un modelo en el que la polimerasa primero transcribiría el gen M2 y luego retrocedería para transcribir el gen L (Fearn y Collins, 1999a). Como en todos los mononegavirus, existe un gradiente transcripcional, de manera que los genes más próximos al promotor son transcritos con más frecuencia. Este mecanismo, junto con la presencia de regiones intergénicas, actúa como regulador de la transcripción (Kuo y col., 1997; Hardy y col., 1999), aunque se ha propuesto que la longitud de los genes también influye. La transcripción también es dependiente de proteínas celulares como actina y profilina (Burke y col., 1998, 2000).

La replicación implica la síntesis de un intermediario replicativo encapsidado de polaridad positiva, el antígenoma (cRNA), que es una copia exacta del genoma completo (vRNA) (Conzelmann, 1996). Este último se sintetiza empleando como molde el antígenoma. Ambos se encuentran siempre en forma de nucleocápsidas y su síntesis se inhibe cuando la nucleoproteína es limitante.

I.3.2 PROTEÍNAS VIRALES

Las partículas virales están constituidas por una nucleocápsida helicoidal recubierta por una envuelta lipoproteica que el virus adquiere al salir de la célula por gemación (Norby y col., 1970). La nucleocápsida es una hélice simétrica en la que está el RNA viral asociado con la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), un factor antiterminador de la transcripción (M2-I o 22k) y la polimerasa (L) (Figura I.3.2).

La proteína matriz (M) forma una cubierta proteica en la cara interna de la envuelta (Figura I.3.2). La envuelta viral contiene tres glicoproteínas transmembranales: la proteína de unión al receptor o proteína G, la proteína de fusión o proteína F y una proteína pequeña hidrofóbica o proteína SH, de función todavía desconocida. Las glicoproteínas están organizadas por separado en espículas virales, que se visualizan como proyecciones cortas (11-20 nm) y poco separadas entre sí (6-10 nm).

Introducción

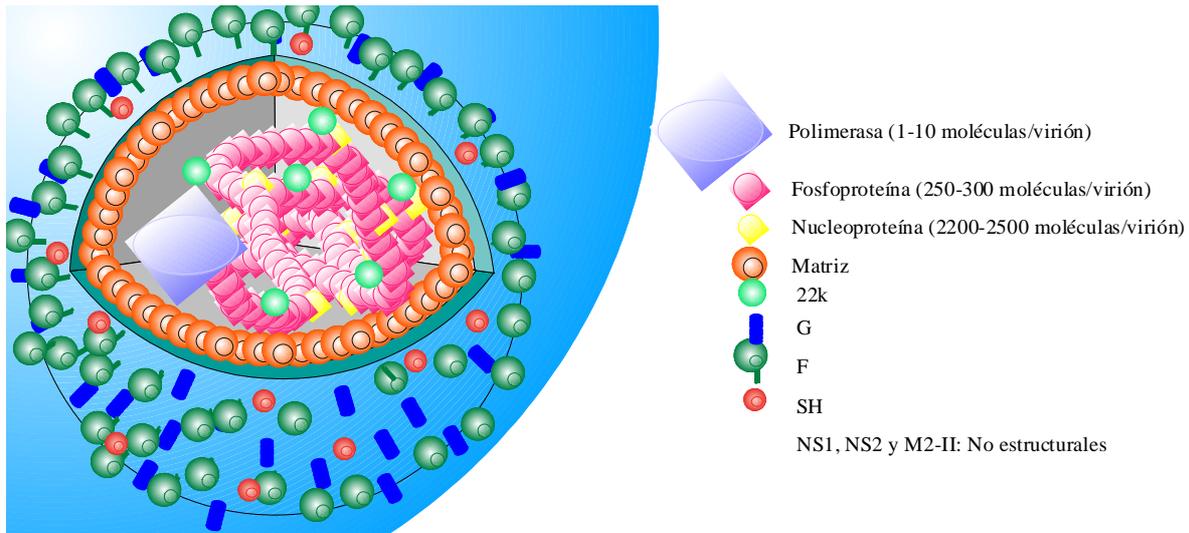


Figura I.3.2: Representación esquemática de la estructura de la partícula del VRSH. Se señala la localización de las distintas proteínas que componen el virión.

A continuación se indican, brevemente, las características principales de las once proteínas codificadas por el genoma del VRSH.

- **Nucleoproteína (N):** Es la proteína principal de la nucleocápsida y es ligeramente básica. Se localiza, con las proteínas P, 22k y, probablemente, L, en inclusiones citoplásmicas presentes en células infectadas con el virus o transfectadas con plásmidos que expresan los genes correspondientes (García y col., 1993). El complejo N-RNA es el molde funcional para la polimerasa viral.
- **Fosfoproteína (P):** Es ácida, hidrofílica y está fosforilada en residuos de Ser localizados principalmente en las zonas central y C-terminal de la molécula (Mazumder y Barik, 1994; Navarro y col., 1991; Sánchez-Seco y col., 1995; Villanueva y col., 1994). El extremo C-terminal de la proteína P es esencial para la interacción con la proteína N (García-Barreno y col., 1996). La fosfoproteína es un cofactor esencial de la RNA polimerasa viral.
- **Proteína L:** Es la RNA polimerasa dependiente de RNA del VRSH. Es básica y relativamente hidrofóbica, con un alto contenido en Leu e Ile. Tiene seis regiones altamente conservadas entre las RNA polimerasas de distintas familias de virus que, posiblemente, corresponden a distintos dominios funcionales de la proteína (Stec y col., 1991).
- **Proteína matriz (M):** Proteína no glicosilada que se localiza en la cara interna de la envuelta viral (Lambert, 1988). Es relativamente básica y posee un dominio hidrofóbico en el tercio C-terminal de la molécula que mediaría la interacción con la membrana (Satake y Venkatesan, 1984). Se piensa que tiene dos funciones generales: mantener la nucleocápsida transcripcionalmente inactiva antes del empaquetamiento y mediar la asociación de la nucleocápsida con la envuelta naciente durante la morfogénesis del virus (Teng y Collins, 1998).

Introducción

- **Proteína 22k:** El gen M2 contiene dos fases de lectura abiertas que solapan en 32 nucleótidos (Collins y col., 1990). El producto del primer marco de lectura (ORF-1) da lugar a un polipéptido de 22kDa de masa molecular. La segunda fase de lectura (ORF-2) codifica una proteína más pequeña, la M2-II. La proteína 22k es muy básica, relativamente hidrofílica y colocaliza con las proteínas N y P en los cuerpos de inclusión citoplásmicos presentes en las células infectadas por el VRSH (Routledge y col., 1987; García y col., 1993). La proteína 22k es un antiterminador de la transcripción y es esencial para la viabilidad del virus (Collins y col., 1996, 1999; Fearn y Collins, 1999b; Hardy y col., 1999).
- **Proteína M2-II:** La proteína M2-II se ha encontrado en extractos de células infectadas (Ahmadian y col., 1999), aunque no se sabe todavía si se incorpora al virión. La proteína M2-II parece actuar como factor regulador implicado en el equilibrio entre la replicación y la transcripción del vRNA (Birmingham y Collins, 1999).
- **Proteínas no estructurales NS1 y NS2:** Son proteínas de pequeño tamaño que se consideran no estructurales porque no se han encontrado en virus maduros (Collins y Wertz, 1985; Huang y col., 1985), aunque abundan en células infectadas. La NS1 coprecipita con la proteína M (Evans y col., 1996), mientras que la NS2 colocaliza en las células con la proteína N, pero no coprecipita con ninguna proteína viral (Weber y col., 1995; Evans y col., 1996). La NS1 es un inhibidor de la síntesis de vRNA (Atreya y col., 1998), aunque esa inhibición no es específica sólo del VRSH y, por tanto, se desconoce cuál es su verdadera función. La proteína NS2 no es esencial para la replicación viral, aunque en su ausencia los virus son atenuados (Teng y Collins, 1999; Whitehead y col., 1999).
- **Proteína SH:** Es una proteína de membrana ligeramente básica, con una larga región hidrofóbica central y dos sitios potenciales de glicosilación, uno a cada extremo de la proteína (Collins y Mottet, 1993). Se acumula en células infectadas en cuatro formas diferentes (SH₀, SH_t, SH_g y SH_p), dos de ellas glicosiladas (SH_g y SH_p) (Anderson y col., 1992a; Olmsted y Collins, 1989), pero sólo se incorpora en pequeñas cantidades en los viriones (Olmsted y Collins, 1989). La función de esta proteína es todavía desconocida, aunque algunos trabajos implican a la proteína SH, junto con las proteínas F y G, en la formación de sincitios (Heminway y col., 1994a; Pastey y Samal, 1997), a pesar de que la eliminación de este gen no afecta a la viabilidad del virus en cultivo (Bukreyev y col., 1997; Karger y col., 2001). La expresión de la proteína SH en bacterias aumenta la permeabilidad de la membrana bacteriana a compuestos de bajo peso molecular. Este resultado sugiere que la proteína SH podría estar implicada en la desestabilización de la membrana de la célula infectada (Pérez y col., 1997).
- **Glicoproteína G:** Es la responsable de la unión del virus al receptor celular en las primeras etapas del ciclo infectivo (Levine y col., 1987; Sullender y col., 1991). Se ha propuesto que el receptor está constituido por los proteoglicanos sulfatados presentes en la superficie celular (Martínez y Melero, 2000). No comparte homologías de secuencia con proteínas de unión al receptor de otros paramixovirus y carece de actividades hemaglutinina y neuraminidasa. Está altamente glicosilada (Satake y col., 1985) y tiene una estructura no globular cuyo ectodominio tiene similitud con las mucinas (glicoproteínas que forman una barrera protectora en los tractos respiratorio, reproductor y gastrointestinal).

Introducción

Es una glicoproteína transmembrana tipo II, con una región hidrofóbica cerca del extremo N-terminal que le sirve tanto de péptido señal como de anclaje a la membrana, dejando en el extremo C-terminal dos terceras partes de la molécula orientadas hacia el exterior. Es en este último dominio donde se localizan cuatro residuos de Cys conservados en todas las cepas de virus secuenciadas y que forman parte de un motivo estructural que se ha propuesto como el sitio de unión al receptor (Johnson y col., 1987). La proteína G también se sintetiza como forma soluble, debido al comienzo de la traducción en un segundo codón de iniciación en fase con el primero, situado en el aminoácido 48 (dentro de la región hidrofóbica) (Hendricks y col., 1988; Roberts y col., 1995). Aproximadamente el 16-20% del total de las moléculas de proteína G sintetizadas en cultivo son solubles. La función de la forma soluble de la glicoproteína G es todavía desconocida.

- **Proteína F:** Puesto que esta proteína es el tema de este trabajo, su estructura y características se detallan a continuación de forma más extensa.

I.4 LA GLICOPROTEÍNA F DEL VRSH

La proteína F del VRSH facilita la entrada del virus en la célula por fusión de sus membranas, permitiendo la descarga de la nucleocápsida en el citoplasma de la célula huésped (Srinivasakumar y col., 1991). Así mismo, la proteína F media la fusión de la membrana de la célula infectada con las de células adyacentes, dando lugar a la formación de sincitios (Walsh y Hruska, 1983).

I.4.1 ESTRUCTURA PRIMARIA Y MADURACIÓN

La proteína F es una glicoproteína tipo I que se sintetiza como un precursor inactivo (F0) (Gruber y Levine, 1983b) de 574 aminoácidos (Collins y col., 1984a; Elango y col., 1985), que posteriormente es procesado proteolíticamente dando lugar a dos cadenas (F1 y F2).

En el extremo N-terminal de la proteína inmadura F0 hay una región hidrofóbica (Figura I.4.1), denominada péptido señal (aminoácidos 1-22, aproximadamente), que se elimina del polipéptido naciente durante su translocación al lumen del retículo endoplásmico. En el extremo N-terminal de la cadena F1 se encuentra una segunda región hidrofóbica, el péptido de fusión (residuos 137-156) (Scheid y Chopin, 1977) y, a continuación, la región heptádica A (RHA) (residuos 156-201) (Zhao y col., 2000). En la zona central de la cadena F1 se encuentra una zona que contiene 11 residuos de Cys muy cercanos entre sí. Cerca del extremo C-terminal de la cadena F1 se sitúa la tercera región hidrofóbica de la proteína, que corresponde a la región transmembrana (residuos 525-551) y que está precedida por una segunda región

Introducción

heptádica (RHB) (residuos 488-516) (Zhao y col., 2000). Finalmente, en el extremo C-terminal se localiza la cola citoplasmática que tiene 23 aminoácidos.

Entre las proteínas F de distintas cepas del VRSH existe una alta homología de secuencia, siendo las regiones de menor homología el péptido señal y la región citoplasmática (Naylor y col., 1998).

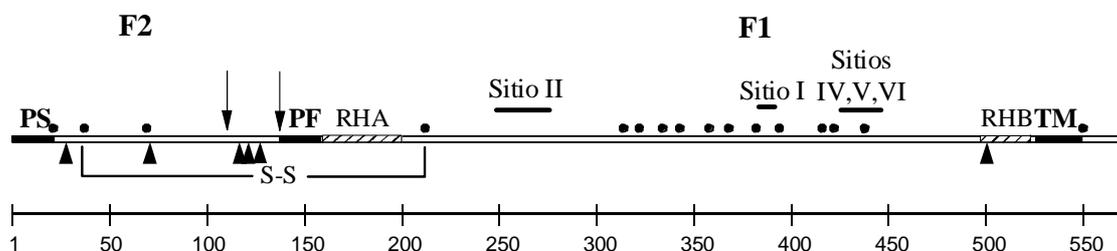


Figura I.4.1: Estructura primaria de la proteína F del VRSH. Se representan con rectángulos negros las regiones hidrofóbicas (el péptido señal, PS; el péptido de fusión, PF; y la región transmembrana, TM). Con rectángulos rayados se indican las regiones heptádicas (RHA y RHB). Con puntos negros se señalan los residuos de Cys y con triángulos negros los sitios potenciales de N-glicosilación. Las dos flechas indican los sitios de procesamiento proteolítico entre las cadenas F1 y F2. También se indica la localización en la estructura primaria de los sitios antigénicos I, II, IV, V y VI.

En la proteína F del VRSH se han identificado cinco áreas antigénicas (Figura I.4.1), de las cuales, al menos cuatro, contienen epítomos reconocidos por AcMs neutralizantes (II, IV, V y VI) (López y col., 1998). Anticuerpos pertenecientes a esas áreas antigénicas inhiben además la fusión de membranas mediada por la proteína F (García-Barreno y col., 1989; Taylor y col., 1992). El área antigénica I, situada en el centro de la región rica en Cys, contiene epítomos reconocidos por AcMs débilmente neutralizantes (López y col., 1998).

El análisis de mutantes que escaparon a la neutralización por AcMs anti-F (López y col., 1998; Arbiza y col., 1992) y ensayos de unión de los AcMs a péptidos sintéticos (Bourgeois y col., 1991; Arbiza y col., 1992; Trudel y col., 1987; López y col., 1993) o a fragmentos de la proteína expresados en bacterias (Martín-Gallardo y col., 1991; Naval y col., 1997), permitieron localizar las diferentes áreas antigénicas en la estructura primaria de la proteína F (Arbiza y col., 1992). Además, el agrupamiento de los epítomos de los distintos AcMs en áreas antigénicas se determinó mediante ensayos de competición al antígeno entre AcMs.

Durante la maduración de la proteína F del VRSH, el polipéptido F0 es modificado co-traducionalmente en el retículo endoplásmico por la adición de azúcares en residuos de Asp (Gruber y Levine, 1985a; Peeples y Levine, 1979). La proteína tiene 5 ó 6 sitios potenciales de N-glicosilación, dependiendo de la cepa, de los cuales sólo uno se encuentra en la cadena F1 (Figura I.4.1). La proteína F madura de la cepa Long se encuentra glicosilada en los residuos 27, 70 y 500 (Zimmer y col., 2001).

El precursor F0 experimenta un procesamiento proteolítico (Collins y Mottet, 1991, Anderson y col., 1992b) por proteasas celulares en las cisternas distales del *trans*-Golgi o en etapas posteriores, durante su transporte a la superficie celular (Collins y

Introducción

Mottet, 1991). Las dos cadenas resultantes, F1 y F2, quedan unidas covalentemente por uno o varios puentes disulfuro antes de alcanzar la superficie celular (Scheid y Choppin, 1977; Fernie y col., 1985; Gruber y Levine, 1985b).

El sitio de corte descrito hasta la actualidad para la proteína F del VRSH consta de seis residuos de Arg y Lys (131-KKRKRR-136) (Collins y col., 1984a) y es reconocido por proteasas del tipo proproteínas convertasas. En este trabajo se expondrá la utilización de un segundo sitio de procesamiento (106-RARR-109) por la proteína F del VRSH, que también tiene la secuencia consenso de las proproteínas convertasas. Las proproteínas convertasas son serín-proteasas del tipo subtilisina dependientes de Ca^{2+} que engloban: furina (PACE), PC1 (PC3), PC2, PC4, PACE4, PC5 (PC6) y PC7 (LPC, PC8) (Steiner, 1998; Sediah y Chrétien, 1999; Barr, 1991; Molloy y col., 1992). Distintos estudios apuntan hacia la proteína PC7 (Basak y col., 2001) o la furina (Bolt y col., 2000) como las enzimas implicadas en el procesamiento de la proteína F del VRSH. La capacidad del precursor F0 de ser procesado por proteasas tan ubicuas sugiere que este paso no es un factor limitante en el tropismo y la patogénesis del VRSH.

Durante su maduración, la proteína F del VRSH también adquiere una cadena de ácido palmítico que se une covalentemente a la Cys 550 (Arumughan y col., 1989b).

I.4.2 ESTRUCTURA SECUNDARIA

La cadena F2 contiene una tercera región heptádica (además de las regiones RHA y RHB de la cadena F1) (residuos 53-100) (Lambert y col., 1996) que adopta, probablemente, una estructura de hélice α (Figura I.4.2).

El primer tercio N-terminal de la subunidad F1 es parcialmente resistente a proteasas y, a partir de su secuencia aminoacídica y del análisis de péptidos de dicha región, se ha predicho la existencia de varias hélices α , incluyendo la que formaría la región heptádica (López y col., 1998; Torion y col., 1995) (Figura I.4.2). A continuación se encuentra la región rica en Cys, que se predice sea rica en lámina β (López y col., 1998). Por último, en la región C-terminal de la cadena F1, tanto la RHB, como la región transmembrana (Deisenhofer y col., 1985), probablemente adopten una estructura de hélice α .

Introducción

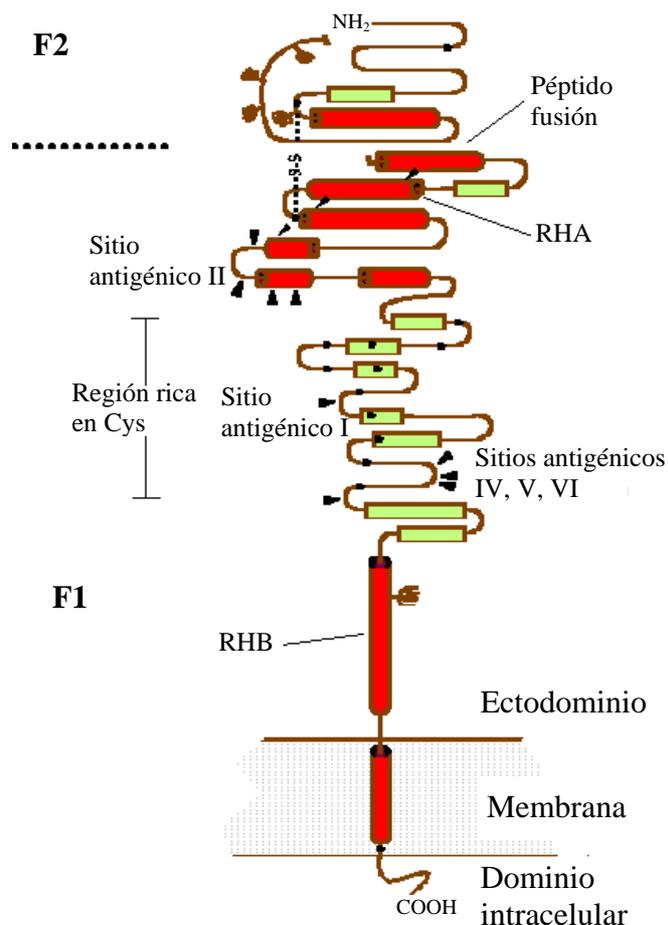


Figura I.4.2: Predicción de la estructura secundaria de la proteína F del VRSH. Con cilindros rojos se señalan las hélices α , con rectángulos verdes se indican las láminas β , los puntos negros son residuos de Cys, los triángulos negros indican los sitios donde se localizan residuos de los distintos sitios antigénicos (I, II, IV, V o VI) y los sitios potenciales de N-glicosilación se indican con el símbolo . Tomado de López y col., 1998.

I.4.3 ESTRUCTURA TERCIARIA Y CUATERNARIA

Péptidos de la RHA de la proteína F del VRSH tienen un porcentaje de hélice α entre el 38% y el 55% y son capaces de oligomerizar formando trímeros (Matthews y col., 2000; Zhao y col., 2000), mientras que péptidos sintéticos de la RHB no están muy estructurados en disolución (Lambert y col., 1996). La difracción de rayos X de cristales de los complejos formados por los péptidos de estas dos regiones heptádicas de la proteína F del VRSH indican que la RHA forma un trímero de hélices α enrolladas entre sí, recubierto antiparalelamente por tres hélices de la RHB (Zhao y col., 2000), como se aprecia en la Figura I.4.3. La interacción entre la RHA y la RHB es por regiones hidrofóbicas, donde los residuos que contribuyen a la unión están altamente conservados. Las hélices α de la RHA tienen en su extremo C-terminal un patrón anormal (3-4-4-3), lo que permite la correcta orientación de los residuos para que tenga lugar la interacción con la RHB. Esto es lo único que se conoce hasta el momento de la estructura terciaria de la proteína F del VRSH.

La proteína se ensambla en el retículo endoplásmico para formar un homooligómero (Walsh y col., 1985; Arumugham y col., 1989a). Utilizando reactivos de entrecruzamiento químico, Collins y Mottet (1991) llegaron a la conclusión de que la proteína F del VRSH forma tetrámeros y Arumugham y col. (1989a) a que se compone

Introducción

de dímeros. Pero, como se ha comentado anteriormente, la estructura que forman péptidos de las regiones heptádicas es un trímero (Zhao y col., 2000). A esta misma conclusión se ha podido llegar mediante estudios de equilibrio de sedimentación de los oligómeros de los péptidos de esas regiones heptádicas (Matthews y col., 2000; Lawless-Delmedico y col., 2000; Zhao y col., 2000). Puesto que, como se comenta más adelante, los datos sobre estructura de la proteína F de otros paramixovirus apoyan la idea de que sean homotrímeros, lo más probable es que la proteína F del VRSH también sea un trímero de monómeros idénticos formados por las cadenas F1 y F2.

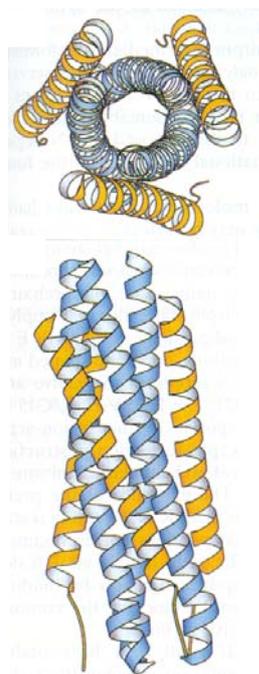


Figura I.4.3: Estructura del complejo RHA-RHB de la proteína F del VRSH. En la parte de arriba se muestra una vista superior del complejo de seis hélices α que forman péptidos de la RHA (azul) y de la RHB (amarillo). En la parte inferior se muestra una vista lateral. Tomado de Zhao y col., 2000.

I.4.4 CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES COMUNES ENTRE LAS PROTEÍNAS F DE LOS PARAMIXOVIRUS

I.4.4.1 Estructura primaria y maduración

En los paramixovirus no existen grandes regiones de homología de secuencia entre las proteínas de fusión (Collins y col., 1984a). Además, la proteína F del VRSH es la que tiene una secuencia más divergente entre las proteínas de fusión de los paramixovirus (menos de un 20% de homología) (Morrison y Porter, 1991; Baker y col., 1999). Sin embargo, la longitud similar del precursor F0 (540-580 residuos), la disposición de los residuos de Cys, Gly y Pro, junto con el patrón general de hidrofobicidad y la presencia de las regiones heptádicas, como se muestra en la Figura I.4.4, sugieren una estructura similar de todas las proteínas de fusión de los paramixovirus.

La posición de los residuos de Cys está relativamente conservada en todas las proteínas F de los paramixovirus y, probablemente, esté jugando un papel importante en el plegamiento y en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la proteína (Morrison, 1988; Shoichi y col., 1994). En los pneumovirus hay 4 Cys más en la

Introducción

cadena F1 que en el resto de paramixovirus (Shioda y col., 1986) (Figura I.4.4). Durante el plegamiento de la proteína, los residuos de Cys desempeñan un papel fundamental mediante la formación de puentes disulfuro, algunos de los cuales se reorganizan en etapas posteriores de la maduración de la proteína (McGinnes y col., 1985; Morrison y col., 1987).

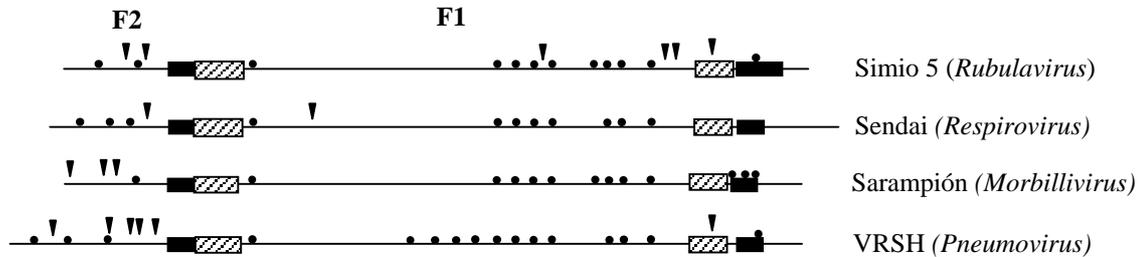


Figura I.4.4: Estructura primaria de los paramixovirus. Se representa la estructura primaria de cuatro paramixovirus representantes de sus respectivos géneros. Con rectángulos negros se indican las regiones hidrofóbicas (el péptido de fusión y la región transmembrana), los rectángulos rayados señalan regiones heptádicas (la RHA y la RHB), los puntos negros los residuos de Cys y los triángulos los sitios potenciales de N-glicosilación. La figura está adaptada de Morrison, 1988.

La proteína F también se glicosila en otros paramixovirus como Sendai (Segawa y col., 2000) o sarampión (Alkhatib y col., 1994b). Los morbillivirus son los únicos que no tienen sitios potenciales de N-glicosilación en la cadena F1 (Lamb y Kolakofky, 1996) (Figura I.4.4). La glicosilación probablemente juegue un papel importante estabilizando el correcto plegamiento de la proteína (Segawa y col., 2000; Watanabe y col., 1995).

En general, en las glicoproteínas virales sólo las moléculas correcta y completamente plegadas se transportan fuera del retículo endoplásmico (Doms y col., 1993). La glicosilación tiene lugar antes o durante el plegamiento y, si no se produce este paso, normalmente el plegamiento es incorrecto y no progresa (Rose y Doms, 1988; Gething y Sambrook, 1992; Hurlley y Helenius, 1989; Vidal y col., 1989; Ng y col., 1990). La proteína F del VRSH sería una excepción, ya que la proteína sin glicosilar se expresa en la superficie celular, como se comprobó con una proteína F mutada en los sitios potenciales de N-glicosilación (Zimmer y col., 2001).

Como se comentó anteriormente, la proteína F del VRSH se encuentra palmitoilada. Las proteínas F del virus del sarampión, del virus de la enfermedad de Newcastle y del virus simio 5 también están palmitoiladas, pero no así la proteína del virus Sendai (Caballero y col., 1998).

El procesamiento en la proteína F para dar lugar a dos cadenas unidas por puente(s) disulfuro es un suceso común a todas las proteínas de fusión de paramixovirus (Lamb y Kolakofsky, 1996; Kawahara y col., 1992). Este procesamiento proteolítico es indispensable para que las proteínas F de los paramixovirus puedan fusionar membranas (Scheid y Choppin, 1974, 1977; Kiyotani y col., 1993; Li y col., 1998a; Alkhatib y col., 1994a). Hasta el momento sólo se han identificado los residuos de Cys que forman los

Introducción

puentes disulfuro entre las cadenas F1 y F2 en la proteína F del virus Sendai (Iwata y col., 1994) y en la del virus de la enfermedad de Newcastle (Chen y col., 2001).

La secuencia de corte reconocida por la mayoría de las proproteínas convertasas (R-X-K/R-R) se encuentra presente en las proteínas F de numerosos paramixovirus, como el virus del sarampión (Varsanyi y col., 1984), cepas virulentas del virus de la enfermedad de Newcastle (Toyoda y col., 1987; Glickman y col., 1988), el virus de la parainfluenza humana tipo 3 (VPIH-3) (Coelingh y Winter, 1990), el virus simio 5 o el virus de las paperas (Lamb y Kolakofsky, 1996). Así, las proproteínas convertasas son las responsables del procesamiento proteolítico de las proteínas F de la mayoría de los paramixovirus (Gotoh y col., 1992a; Ortmann y col., 1994; Sakaguchi y col., 1994) aunque, en algunos como el VPIH-3, que también tiene un sitio de procesamiento reconocido por estas enzimas, actuarían otras proteasas (Sakaguchi y col., 1994). Las secuencias reconocidas por proproteínas convertasas también se encuentran en muchas proteínas de fusión de otros virus (Toyoda y col., 1987; Basak y col., 2001), como en togavirus (Garoff y col., 1980), coronavirus (Cavanagh y col., 1986), retrovirus (Shinnick y col., 1981) y citomegalovirus (Cranage y col., 1986) y son probablemente las responsables del procesamiento en cepas con secuencias de corte R-X-K/R-R en la hemaglutinina del virus de la gripe (Walker y col., 1994; Basak y col., 2001), en la gp160 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-1) (Decroly y col., 1996; Hallenberger, 1992) y en la GP2 del virus Ébola (Volchokov y col., 1998; Basak y col., 2001).

Las desviaciones de la secuencia R-X-K/R-R no son compatibles con proteínas procesables intracelularmente, como se ha descrito en mutantes en la región de procesamiento de la proteína F del virus simio 5 (Paterson y col., 1989), en cepas avirulentas del virus de la enfermedad de Newcastle (Pritzer y col., 1990; Glickman y col., 1988), en el virus Sendai (Lamb y Kolakofsky, 1996), en el virus de la parainfluenza humana tipo 1 (VPIH-1) (Lamb y Kolakofsky, 1996), en el virus del sarcoma de Rous (Pérez y Hunter, 1987), en mutantes del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (McCune y col., 1988) o en algunas cepas del virus de la gripe (Vey y col., 1992; Skehel y Wiley, 2000). En la mayoría de estos virus, como el virus Sendai (Hsu y col., 1987) o el VPIH-1 (Merson y col., 1988), el procesamiento se produce extracelularmente por factores secretados por células epiteliales, como el factor Xa de células de embrión de pollo (Gotoh y col., 1992b; Nagai, 1993; Ogasawara, 1992), lo que confiere a estos virus una especificidad de tejido en la infección (Ogasawara y col., 1992; Toyoda y col., 1987, 1989; Glickman y col., 1988).

I.4.4.2 Estructura tridimensional

Recientemente se ha cristalizado y resuelto mediante difracción de rayos X la mayor parte de la estructura tridimensional de la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle (Chen y col., 2001). La estructura cristalizada se propone que sea una mezcla de dos conformaciones distintas de la proteína: la anterior a la fusión de membranas (pre-activa) y la posterior (post-activa). La estructura resultante es un trímero cónico en el que se distinguen tres partes: la cabeza (que tiene forma triangular), el cuello y el tallo (Figura I.4.5 A). Además, aparecen dos canales, uno axial y otro radial, conectados entre sí. La cabeza tiene dos dominios ordenados en forma de lámina β y está compuesta por la región rica en Cys (Figura I.4.5 B). En el cuello se encuentran

Introducción

y Wild, 1989). Al igual que ocurre con péptidos de la RHB del VRSH, péptidos equivalentes de proteínas de fusión de otros virus como Sendai (Ghosh y col., 1998), sarampión, VPIH-3 (Lambert y col., 1996) y VIH-1 (Wild y col., 1994) no se encuentran estructurados en disolución. En cambio, un péptido de la RHB del virus de la enfermedad de Newcastle tiene una estructura intermedia entre una hélice α y una cadena 3_{10} , donde las Leu e Ile se orientan alineadas en una cara de la hélice, como se determinó mediante resonancia magnética nuclear y ensayos bioquímicos (Young y col., 1997).

Un resultado equivalente al de la estructura tridimensional del complejo de péptidos RHA-RHB del VRSH se ha obtenido con péptidos de la proteína F del virus simio 5 (Baker y col., 1999), como se muestra en la Figura I.4.6. Las estructuras de los complejos RHA-RHB son casi superponibles para los péptidos del VRSH y del virus simio 5 (Zhao y col., 2000) y aminoácidos conservados en este último virus son claves también en la estructura del VRSH (Matthews y col., 2000).

La presencia de tres hélices α paralelas es un elemento estructural muy conservado en las proteínas de fusión virales. En la gp41 del VIH-1 (Chan y col., 1997; Tan y col., 1997; Weissenhorn y col., 1997), la gp41 del virus de la inmunodeficiencia simia (VIS) (Caffrey y col., 1998; Malashkevich y col., 1998; Yang y col., 1999), la HA del virus de la gripe A (Bullough y col., 1994), la HEF del virus de la gripe C (Rosenthal y col., 1998), la GP2 del virus Ébola (Weissenhorn y col., 1998; Malashkevich y col., 1999), la proteína gp21 del virus de la leucemia humana tipo 1 de células T (Kobe y col., 1999) y la proteína Env-TM del virus de la leucemia murina Moloney (VLM) (Fass y col., 1996) se ha podido determinar esta zona central de tres hélices α paralelas (Figura I.4.6). Además, en algunas de estas proteínas (gp41, HA, F, GP2) también existe una segunda serie de hélices que se unen antiparalelamente al núcleo central de tres hélices.

Se ha propuesto que este complejo trimérico de hélices α antiparalelas es la estructura parcial que las proteínas de fusión de los paramixovirus adoptan tras el cambio conformacional que se produce en el proceso de fusión de membranas por: i) la comparación con la estructura molecular del estado post-activo de otras proteínas de fusión de membranas (Skehel y Wiley, 1998); ii) la alta estabilidad de la estructura que forman, como se ha determinado en distintos virus como el VRSH, el virus simio 5, el VIH, el VIS o el virus Ébola (Lu y col., 1995; Ji y col., 2000; Weissenhorn y col., 1998; Zhao y col., 2000; Lawless-Delmedico y col., 2000; Lamb y col., 1999; Dutch y col., 1999; Joshi y col., 1998); y iii) los resultados en los cuales péptidos análogos de la RHA y la RHB son capaces de inhibir la fusión en numerosos paramixovirus como el VRSH (Lambert y col., 1996), el VPIH-2 (Yao y Compans, 1996), el VPIH-3 (Yao y Compans, 1996; Lambert y col., 1996), el virus del sarampión (Lambert y col., 1996; Wild y Buckland, 1997), el virus de la enfermedad de Newcastle (Young y col., 1997, 1999), el virus simio 5 (Lamb y col., 1999; Joshi y col., 1998) y el virus Sendai (Ghosh y col., 1997, 1998; Rapaport y col., 1995). En otros virus se ha podido observar que péptidos de la región equivalente a la RHB también inhiben la fusión, como en el VIH-1 (Wild y col., 1992, 1993, 1994; Jiang y col., 1993a, 1993b) y el virus de la inmunodeficiencia felina (Lombardi y col., 1996).

Las proteínas F de los paramixovirus son, por tanto, trímeros. En el virus de la enfermedad de Newcastle la estructura trimérica se ha visto mediante la resolución de la estructura atómica de la proteína F (Chen y col., 2001). En el virus simio 5 también se

Introducción

ha podido determinar, como se ha comentado anteriormente, mediante la cristalización y resolución por difracción de rayos X, de la estructura que forman péptidos de las regiones heptádicas de la proteína F (Baker y col., 1999). A esta misma conclusión se ha podido llegar mediante estudios de equilibrio de sedimentación de estos complejos (Lamb y col., 1999; Dutch y col., 1999; Joshi y col., 1998). El análisis de las formas resultantes tras utilizar reactivos de entrecruzamiento en las proteínas F del virus simio 5, del VPIH-3 (Russell y col., 1994) y del VPIH-2 (Tong y Compans, 2000) apoyan la idea de que dichas proteínas forman trímeros.

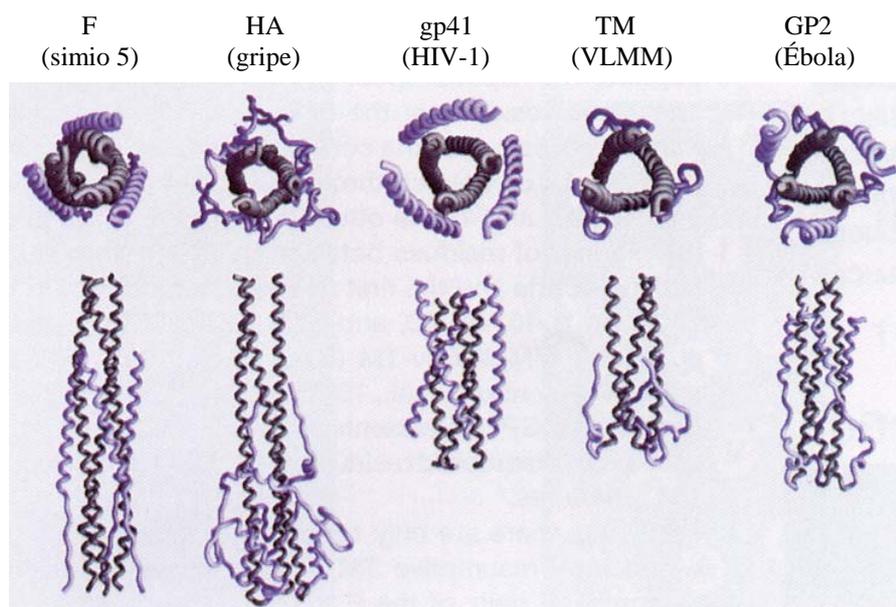


Figura I.4.6: Estructura de las regiones heptádicas adyacentes al péptido de fusión. Se representan las estructuras del complejo RHA-RHB, o regiones equivalentes, de la proteína F del virus simio 5 (Baker y col., 1999), la proteína HA solubilizada por el corte con bromelina tras la exposición a pH ácido (tBHA2) (Bullough y col., 1994), la proteína gp41 del VIH-1 (Chan y col., 1997), la proteína Env-TM del VLMM (Fass y col., 1996) y la proteína GP2 del virus Ébola (Weissenhorn y col., 1998). El trímero interno está representado en gris (regiones equivalentes a la RHA) y el polipéptido externo en violeta. Para cada molécula se muestra la vista superior y la lateral. Tomado de Baker y col., 1999.

En otras proteínas de fusión (gp41 del VIH-1, gp41 del VIS, HA del virus de la gripe A, HEF del virus de la gripe C, GP2 del virus Ébola, Env-TM del VLMM, gp64 de baculovirus (Volkman y Goldsmith, 1984) y gp21 del virus de la leucemia humana tipo 1 de células T) también se ha demostrado que su estructura cuaternaria es trimérica (Weissenhorn y col., 1999).

Resumiendo, las proteínas de fusión de distintas familias de virus comparten características comunes que se encuentran conservadas (White, 1990; Hernández y col., 1996): i) son glicoproteínas oligoméricas de tipo I integrales de membrana sintetizadas como precursores inactivos que se procesan por proteasas celulares para activarse (Hunter y Swanstrom, 1990; Klenk y Garten, 1994b); ii) el nuevo extremo amino-terminal que se genera tras el procesamiento proteolítico contiene el péptido fusión (en

Introducción

virus como Ébola el péptido de fusión es interno (Volchkov y col., 1998), así como en el virus de la estomatitis vesicular o en el de la rabia (Gaudin y col., 1995)) y iii) tienen una región heptádica adyacente al péptido de fusión que se pliega en una cadena superenrollada trimérica en algún momento durante la fusión de membranas (White, 1990; Stegmann y col., 1989; Skehel y Wiley, 1998). Sin embargo, el ectodominio de la cadena F1 de la proteína F de los paramixovirus es considerablemente más largo (unos 380 aminoácidos) que el de las cadenas equivalentes de otras proteínas de fusión virales (unos 175 aminoácidos para la HA2 del virus de la gripe o la gp41 del VIH-1). Además, sólo en los paramixovirus y en los retrovirus aparece una segunda región heptádica en la zona C-terminal, junto a la región transmembrana (Lu y col., 1995; Lamb y Kolakofsky, 1996; Chan y col., 1997; Weissenhorn y col., 1997).

I.5 FUSIÓN DE MEMBRANAS

La fusión de las membranas viral y celular es una etapa clave en el proceso infeccioso de los virus. Se ha demostrado que las proteínas virales implicadas en este proceso son capaces de cambiar conformacionalmente entre un estado metaestable pre-activo y otro de mayor estabilidad post-activo y que este cambio es esencial para que se produzca la fusión de membranas (Chan y Kim, 1998; Hernández y col., 1996; Lamb, 1993; Skehel y Wiley, 1998; Weissenhorn y col., 1999). En distintos virus, la unión del virus al receptor en la superficie celular induce la endocitosis de la partícula viral en vesículas que se acidifican en el interior de la célula tras su fusión, probablemente con lisosomas. Este descenso del pH induce cambios conformacionales en las proteínas virales que disparan la fusión de las membranas viral y vesicular. Así, por ejemplo, la proteína HA del virus de la gripe experimenta cambios drásticos en su estructura tras la exposición a pH ácido. Estos cambios incluyen la formación de un trímero de cadenas superenrolladas a partir de dos hélices separadas en la estructura primaria de la cadena HA2 y la relocalización del péptido de fusión a 100 Å de su posición inicial, en dirección a la membrana diana a fusionar (Bullough y col., 1994; Chen y col., 1999). Una vez insertado en la membrana diana, la formación del poro de fusión requeriría la actuación conjunta de, por lo menos, 3 ó 4 trímeros de HA (Hernández y col., 1996). Otras proteínas virales de fusión también se activan a pH ácido, como la del virus de la estomatitis vesicular y la del virus del bosque Semliki (Hernández y col., 1996). En general, la acidificación del medio es un mecanismo común de activación de las proteínas de fusión de los ortomixovirus, toga, flavivirus, rhabdovirus, bunyavirus y arenavirus (Hernández y col., 1996).

La fusión de las membranas de los retrovirus con las de las células diana ocurre en la superficie celular a pH neutro. Las proteínas encargadas de la fusión en estos virus tienen también la actividad de unión al receptor. Los cambios conformacionales se producen como consecuencia de la interacción de las glicoproteínas con sus receptores y suponen la exposición del péptido de fusión (Damico y col., 1998; Furuta y col., 1998; Hernández y col., 1997; Moore y col., 1990) y su inserción en la membrana de la célula diana.

Introducción

En los paramixovirus, que tienen en moléculas distintas las actividades de unión al receptor (proteínas G, HN o H) y de fusión de membranas (proteína F), la fusión ocurre a pH neutro en la superficie celular mediante un mecanismo de activación de la proteína F desconocido hasta el momento.

Se ha especulado con la posibilidad de que en los paramixovirus el reconocimiento del receptor por parte de la molécula G, HN o H (según el virus) provoque el cambio conformacional en la proteína F que produzca la fusión de las membranas (Lamb, 1993). En algunos de los paramixovirus es necesaria la presencia en la misma célula de la proteína de unión al receptor y de la proteína F para que se produzca la fusión de membranas. Esto se ha visto en ensayos de formación de sincitios en los cuales se expresaron las proteínas de fusión y de unión al receptor en células mediante distintos vectores (plásmidos, virus). Este es el caso del virus de la enfermedad de Newcastle (Morrison y col., 1991; Horvarth y col., 1992; Sergel y col., 1993), del VPIH-2 (Hu y col., 1992; Heminway y col., 1994b), del virus de las paperas (Tanabayashi y col., 1992) y del virus de la parainfluenza bovina tipo 3 (Sakai y Shibuta, 1989). Sin embargo, los resultados obtenidos han sido contradictorios dependiendo del vector utilizado (Horvarth y col., 1992), lo que pone en duda los trabajos en los cuales se concluye que es necesaria la coexpresión de ambas proteínas para que se produzca la fusión. En otros paramixovirus no es necesaria la presencia de la proteína de unión al receptor para que se produzca la fusión de membranas y la formación de sincitios, como en el VRSH (Karger y col., 2001; Olmsted y col., 1986), el virus simio 5 (Paterson y col., 1985; Horvarth y col., 1992; Ward y col., 1995; Dutch y col., 1998), el VPIH-3 (Spriggs y col., 1987; Horvarth y col., 1992), el virus Sendai (Gibson y col., 1988; Bagai y col., 1993) y el virus del sarampión (Alkhatib y col., 1988).

Es posible que lo que se necesite para la fusión de membranas sea una alta densidad de proteína F en algún sitio concreto de la membrana. Esto se puede conseguir, entre otros métodos, mediante altos niveles de expresión de la proteína o mediante interacción de la proteína F con la proteína HN, H o G y su colocación a altas concentraciones en sitios determinados de la superficie celular. La existencia de una correlación entre la cantidad de proteína que se expresa en la superficie y la formación de sincitios se ha demostrado en el caso del virus simio 5 y en el VPIH-3 (Dutch y col., 1998). La colocación de las proteínas HN y F en la superficie celular se ha observado en el virus Sendai (Areoti y Hemis, 1991). Alternativamente, se ha postulado que la proteína de unión al receptor sólo sea necesaria para situar las membranas a la distancia óptima para que tenga lugar la fusión celular (Horvarth y col., 1992).

El cambio conformacional que tiene lugar en la proteína F de los paramixovirus durante la fusión de membranas es desconocido en gran medida, pero parece claro que la exposición del péptido de fusión es una etapa fundamental (Martin y col., 1999; Hernández y col., 1996). La importancia del péptido de fusión en el proceso homónimo se basa en que:

- Es una región que está presente en las proteínas virales de fusión (Gallaher, 1987). En los paramixovirus es una región altamente conservada (Morrison y Porter, 1991), aunque en el VRSH tiene un grado menor de homología (Baker y col., 1999).

Introducción

- Para que la proteína sea activa se requiere el procesamiento proteolítico de la proteína de fusión, que sitúa al péptido de fusión en el nuevo extremo N-terminal de la cadena F1 (Lamb y Kolakofsky, 1996; Scheid y Choppin, 1977; Lamb, 1993; Nagai y col., 1993; Paterson y col., 1985; Toyoda y col., 1987).
- Se ha observado que el péptido de fusión se inserta en la membrana diana en experimentos realizados con la proteína F del virus Sendai (Novick y Hoekstra, 1988), del virus de la enfermedad de Newcastle (Brasseur y col., 1988) o de la HA del virus de la gripe (Durrer y col., 1996). Además, la exposición del péptido de fusión es capaz de convertir una molécula soluble en una molécula que se une a membranas (Paterson y Lamb, 1987; Damico y col., 1998; Doms y col., 1985).
- Mutaciones en el péptido de fusión dan lugar a cambios importantes en la capacidad fusogénica de proteínas F de paramixovirus, como en el virus simio 5 (Horvarth y Lamb, 1992; Ward y col., 1995) y el virus de la enfermedad de Newcastle (Sergel y col., 1993); y de otros virus, como el virus de la gripe (Gething y col., 1986, Stegmann y col., 1989), el VIH (Freed y col., 1990, 1992) y el VIS (Bosh, 1989).
- Por último, péptidos correspondientes a los péptidos de fusión de las proteínas virales son capaces de fusionar membranas (Martin y col., 1999), como en el virus Sendai (Rapaport y Shai, 1994; Ghosh y Shai, 1999), el virus del sarampión (Yeagle y col., 1991), el VIH-1 (Rafalski y col., 1990; Nieva y col., 1994), el VIS (Colotto y col., 1996; Martin y col., 1991), el virus de la gripe (Wharton y col., 1988, Lear y DeGrado, 1987), el virus de la hepatitis B (Rodríguez-Crespo y col., 1995) y el virus Ébola (Ruiz-Argüello y col., 1998).

Los péptidos de fusión se orientan de manera oblicua a la membrana diana cuando se insertan en ésta (Ghosh y Shai, 1999; Ishiguro y col., 1993; Brasseur y col., 1990; Horth y col., 1991; Martin y col., 1996, 1999), formando una hélice α en la que los residuos conservados se localizan hacia una de las caras (Server y col., 1985; Takahashi, 1990).

Otro elemento estructural clave en la fusión son las regiones heptádicas que, probablemente, juegan un papel determinante en la reestructuración de la proteína F tras su activación para fusionar membranas. Así, péptidos correspondientes a estas regiones son capaces de inhibir la fusión, como se comentó anteriormente. Además, mutaciones en las regiones heptádicas también impiden la fusión, como se ha visto en el VRSH (Zimmer y col., 2001), en el virus de la enfermedad de Newcastle (Reitter y col., 1995; Young y col., 1998; Wang y col., 1992; Sergel y col., 1993) y en el del sarampión (Buckland y col., 1992).

También se ha observado la importancia de otras regiones del ectodominio y de la región citoplasmática de la proteína F del virus simio 5 (Bagai y Lamb, 1996; Paterson y col., 2000), de la HA del virus de la gripe (Kemble y col., 1994) o de la gp41 del VIH-1 (Owen y col., 1994), para que las proteínas sean funcionales en ensayos de fusión de membranas.

Por último, existen otros factores que determinan la fusión de membranas. Por ejemplo, en el VPIH-3 se ha podido observar que la fusión virus-célula y la fusión célula-célula son procesos relacionados pero diferentes, ya que existen distintos requerimientos de densidad de ácido siálico (el receptor celular) en la superficie celular en cada caso (Moscona y Peluso, 1992). Además, se ha podido observar que la

Introducción

movilidad de la célula infectada de las proteínas F y HN en la membrana es un factor importante para la fusión célula-célula (Henis y col., 1989).

II. OBJETIVOS

Objetivos

La proteína F del VRSH es la responsable de la fusión de las membranas viral y celular, así como de la fusión de las membranas de la célula infectada con las de células adyacentes no infectadas, favoreciendo la propagación del virus. Se ha propuesto que, durante la fusión de membranas, la proteína experimenta un cambio conformacional desde un estado pre-activo metaestable a un estado post-activo estable.

Hasta el momento, el conocimiento de la estructura tridimensional de la proteína F del VRSH se limita al complejo de seis hélices α que forman péptidos análogos de las regiones heptádicas A y B y que, probablemente, corresponde al estado post-activo de la proteína. Se desconoce, sin embargo, como se ordena el resto de la proteína antes y después del cambio conformacional entre los estados pre y post-activos. Además, el procesamiento proteolítico que se produce durante la maduración de la proteína no está suficientemente caracterizado. Otro elemento más de incertidumbre es el evento que dispara el cambio conformacional en la proteína F del VRSH para que se produzca la fusión de membranas.

Por todo ello, los objetivos que nos planteamos en el presente trabajo fueron los siguientes:

- Caracterización de una forma de la proteína F que carece de las regiones transmembrana y citoplasmática (F_{TM-}) y comparación de la misma con la proteína F completa.
- Estudio de la estructura tridimensional de la proteína F mediante microscopía electrónica de la proteína purificada y de complejos de la proteína unidos a anticuerpos monoclonales.
- Análisis del procesamiento proteolítico de la proteína F del VRSH e identificación de formas intermedias del procesamiento.
- Estudio del mecanismo de activación de la proteína F. Análisis de cambios conformacionales asociados al proceso de fusión de membranas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 MATERIALES

III.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

III.1.1.1 Líneas celulares de mamífero

Las líneas celulares que se emplearon fueron las siguientes:

- HEp-2: carcinoma de laringe humano, American Type Culture Collection, ATCC:CCL-23.
- CV-1: células de riñón de mono verde africano, American Type Culture Collection, ATCC:CCL-70.

III.1.1.2 Anticuerpos monoclonales (AcMs)

Los AcMs dirigidos frente a la proteína F del VRSH se habían obtenido en nuestro laboratorio (García-Barreno y col., 1989; López y col., 1993 y 1998; Arbiza y col., 1992), en el laboratorio de G. Taylor (Taylor y col., 1992) o en el de C. Örvell (Örvell y col. 1987).

III.1.1.3 Virus

Se empleó la cepa Long del VRSH perteneciente al grupo antigénico A, aislada en Baltimore (EE.UU.) en 1956.

También se emplearon los virus vaccinia recombinantes VRBF y VRBF_{TM-}, que expresan las proteínas F y F_{TM-}, respectivamente (Bembridge y col., 1998); así como virus derivados de éstos que expresaban las siguientes proteínas: FR108N, FR109N, FR108N/R109N, F_{TM-}-R108N, F_{TM-}-R109N, F_{TM-}-R108N/R109N y F_{TM-}- Δ 131-134.

III.1.1.4 Bacterias y plásmidos

La cepa bacteriana utilizada para el crecimiento de los plásmidos ha sido *Escherichia coli* DH5 (Hanahan, 1983).

Plásmidos	Tamaño (pb)	Características	Referencia
pRB21	5537	pE/L, VV, VP37, Amp ^r	Blasco y Moss, 1995
pRB/F	7433	Plásmido pRB21 que tiene insertado el gen F del VRSH.	Bembridge y col., 1998
PRB/F _{TM-}	7283	Plásmido pRB21 que tiene insertado el gen F _{TM-} del VRSH.	Bembridge y col., 1998

Tabla III.1.1: Plásmidos utilizados. pE/L: promotor temprano tardío del virus vaccinia. VV: región de recombinación con vaccinia. VP37: gen de la proteína VP37 de vaccinia. Amp^r: gen de resistencia a ampicilina.

Materiales y Métodos

Los plásmidos que se emplearon para el desarrollo del trabajo se resumen en la Tabla III.1.1. Los plásmidos que codifican las proteínas F y F_{TM-} con las mutaciones R108N, R109N, R108N/R109N y Δ131-134 se construyeron a partir de los plásmidos pRB/F y pRB/F_{TM-}, como se describe más adelante (apartado III.2.2.2).

III.1.2 ENZIMAS Y OLIGONUCLEÓTIDOS

III.1.2.1 Enzimas

El *kit* de secuenciación automática de DNA (DNA Sequencing kit dRhodamine terminator cycle sequencing ready reaction) se obtuvo de Abi Prism (PE Biosystems, Warrington, Reino Unido). El *kit* de mutagénesis dirigida (Quik Change Site-directed mutagenesis kit) lo proporcionó Stratagene-Europe (Amsterdam, Holanda).

La tripsina-TPCK se adquirió de Sigma (San Luis, EE.UU.) y la tripsina porcina modificada de Promega (Madison, EE.UU.). La N-Glicosidasa F se obtuvo de Roche (Mannheim, Alemania).

III.1.2.2 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en el clonaje y secuenciación de los distintos genes se muestran en la Tabla III.1.2.

Nombre	Secuencia (5'→3')
OF317-358+/R108N	GCAGCAAACAATCGAGCC <u>AA</u> CAGAGAACTACCA AGGTTTATG
OF358-317-/R108N	CATAAACCTTGGTAGTTCTCT <u>GTT</u> GGCTCGATTG TTTGCTGC
OF320-358+/R109N	GCAAACAATCGAGCCAGAA <u>AC</u> GAACTACCAAGG TTTATG
OF358-320-/R109N	CATAAACCTTGGTAGTTC <u>GTTT</u> TCTGGCTCGATTG TTTGC
OF317-358+/R108N/R109N	GCAGCAAACAATCGAGCC <u>AAACAAC</u> GAACTACCA AGGTTTATG
OF358-317-/R108N/R109N	CATAAACCTTGGTAGTTC <u>GTTGTT</u> GGCTCGATTG TTTGCTGC
OF378-436+/Δ404-415	CCAAAAAACAATGTAACATTAAGCAGAAGAT TTCTTGGTTTTTTG
OF436-378-/Δ404-415	CAAAAAACCAAGAAATCTTCTGCTTAATGTTACA TTGGTTTTTTTTG
OF578-595-	GTCTAACACTTTGCTGGT

Tabla III.1.2: Secuencia de los oligonucleótidos empleados. El signo + indica que el oligonucleótido tiene la polaridad del mRNA del gen F y el signo - la complementaria. En negrita, cursiva y subrayados se indican los nucleótidos mutados respecto a la secuencia de la proteína F del VRSH (cepa Long).

III.1.3 REACTIVOS

III.1.3.1 Productos químicos

Sales inorgánicas, ácidos, bases, compuestos orgánicos (formaldehído, metanol, etanol, etc.), sacarosa, colorantes para electroforesis, detergentes, persulfato amónico (PSA), seroalbúmina bovina fracción V (SAB), glucosa, urea y glicerol fueron suministrados por Merck (Darmstad, Alemania).

Difco (Detroit, EE.UU.) proporcionó los componentes de los medios de cultivo de bacterias (bactotripton, extracto de levadura y agar).

Los reactivos para electroforesis: acrilamida, N-N'-metilen-bisacrilamida, docecil sulfato sódico (SDS), glicina, β -mercaptoetanol (β ME), N-N'-N'-N'-tetrametil-etilendiamina (TEMED), azul de bromofenol y marcadores de masa molecular preteñidos (Kaleidoscopic molecular weight markers) fueron obtenidos de Bio-Rad (Hercules, EE.UU.) y el bloqueante I-Block de Tropix (Bedford, EE.UU.).

Para los *western blots*, el Immobilon-P lo suministró Millipore (Bedford, EE.UU.) y el 3MM Whatman (Maidstone, Reino Unido). El ECL se obtuvo de Amersham-Pharmacia-Biotech (Friburgo, Alemania).

Se emplearon películas AGFA CURIX RP2 que se revelaron con productos de Eastman Kodak. Cuando fue necesario se utilizaron pantallas amplificadoras de la señal radiactiva (Dupont). El Amplify se compró a Amersham-Pharmacia-Biotech.

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

La proteína A-agarosa la suministro Roche y la Sepharosa 4B activada con CNBr Amersham-Pharmacia-Biotech.

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

Para la concentración de proteínas se utilizó Centricon 30 de Amicon (Danvers, EE.UU.).

III.1.3.2 Productos inmunoquímicos

Las inmunoglobulinas (Igs) conjugadas con peroxidasa contra Igs de ratón o de conejo fueron suministradas por Amersham-Pharmacia-Biotech.

III.1.3.3 Productos radiactivos

Fueron suministrados por Amersham-Pharmacia-Biotech: Pro-Mix L-[³⁵S], actividad específica 1000 Ci/mmol y D-[6-³H] glucosamina clorhídrica, actividad específica 15-35 Ci/mmol.

III.1.4 MEDIOS DE CULTIVO

III.1.4.1. Células eucariotas

- DMEM-10, DMEM-2,5 y DMEM-0: Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Dulbecco y Freeman, 1959) (BioWhittaker Europe, Verviers, Bélgica), con 4 mM glutamina, 100 U/ml penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomycin y enriquecido con 10%, 2,5% suero de ternera fetal (STF) o sin suero.
- DMEM-agar: Medio DMEM-2,5 conteniendo 1% de aminoácidos no esenciales (Biological Industries, Kibbutz Beit Haenak, Israel) y 0,7% de agar noble.
- Para los marcajes metabólicos con ³⁵S-Met se utilizó DMEM sin Met (Biological Industries) y para los marcajes metabólicos con ³H-Glucosamina se utilizó DMEM sin glucosa y enriquecido con uridina.
- RPMI-10: Medio RPMI 1640 con L-Glutamina y 25 mM HEPES (4-(2-hidroxietil)-piperazina-1-etano-ácido sulfónico), enriquecido con 10% STF.
- Tripsina-Verseno: 0,05% tripsina, 0,02% EDTA en PBS.

III.1.4.2 Bacterias

- LB (Miller, 1972): 1% bactotripton, 1% NaCl, 0,5% extracto de levadura.
- SOB: 2% bactotripton, 0,5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl₂, 10 mM MgSO₄.

III.2 MÉTODOS

III.2.1 MANIPULACIÓN DE CÉLULAS ANIMALES Y VIRUS

III.2.1.1 Cultivo de células eucariotas

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

Para su almacenamiento, las células se resuspendieron en STF con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y se congelaron en nitrógeno líquido (Jakoby y Pastan, 1979).

III.2.1.2 Crecimiento y purificación del VRSH

VRSH de la cepa Long se creció en células HEp-2. Para ello se infectaron placas subconfluentes con virus diluido en un volumen pequeño de DMEM-2,5. Tras 1 h de adsorción a 37°C se añadió DMEM-2,5. A las 36-48 h post-infección, cuando el efecto citopático (formación de sincitios) fue abundante, se rasparon las células de la

Materiales y Métodos

placa y se recogieron junto con el sobrenadante. Se almacenaron a -80°C o en nitrógeno líquido para su uso posterior.

El virus se purificó como se describe en García-Barreno y col. (1988). El sobrenadante de células infectadas se precipitó con un 6% de polietilenglicol (Merck), durante 4 h, a 4°C . El precipitado se recogió por centrifugación a baja velocidad, se resuspendió en tampón TNE (50 mM Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 10 mM EDTA, pH 7,5) y se centrifugó a $100000\times g$, 18 h, en un gradiente del 20-30% de sacarosa. El virus se recogió y se centrifugó a través de un colchón de sacarosa del 33% durante 1 h a $230000\times g$. Por último, el virus se resuspendió en tampón TNE y se guardó a -80°C .

III.2.1.3 Crecimiento de virus vaccinia

Para el crecimiento de virus vaccinias recombinantes se infectaron cultivos subconfluentes de células HEp-2 a una multiplicidad de infección (mdi) de 0,1 ufp/célula en DMEM-0, dejando 1 h de adsorción a 37°C , al cabo de la cual se añadió medio DMEM-0. A los 2-3 días se rasparon las células, se recogieron junto al medio de cultivo y se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm. El sedimento se lavó con PBS estéril, se resuspendió en 1 ml de 1 mM Na_2HPO_4 por cada 10^6 P₁₀₀, se congeló y descongeló tres veces y se sonicó en un baño de ultrasonidos durante 2 min, para la liberación del virus intracelular. La preparación se centrifugó de nuevo en una centrífuga de mesa a 1500 rpm durante 10 min y el sobrenadante se alicuoteó y se guardó a -80°C .

III.2.1.4 Titulación del virus vaccinia por plaqueo en agar

Placas P₃₅ con células CV-1 confluentes se infectaron por duplicado con diluciones seriadas de virus vaccinia. Después de 1 h de adsorción en medio DMEM-0, se retiró el inóculo y se añadió DMEM-agar. A las 48 h post-infección, las células se fijaron con paraformaldehído al 10% en PBS completo durante 30 min y, una vez retirado el agar, se tiñeron durante 30 min con 0,1% cristal violeta en 20% metanol.

III.2.1.5 Construcción de virus vaccinia recombinantes

La preparación de los virus VRBF y VRBF_{TM}- se describe en Bembridge y col. (1999). El resto de virus recombinantes se preparó siguiendo el mismo protocolo (Blasco y Moss, 1995). Células CV-1, creciendo en placas P₃₅, se infectaron con la cepa de vaccinia VRB12 en medio DMEM-2,5. Una hora después se transfectaron, usando lipofectina, con 3 μg del plásmido pRB21 que contenía el gen a expresar (apartado III.2.2.2). Como el VRB12 no tiene el gen VP37 y es, por tanto, incapaz de formar placas, los virus recombinantes se pudieron recuperar de las células infectadas y transfectadas a los 2 días de haberse infectado, mediante plaqueo en células CV-1. Las placas de lisis se recuperaron y clonaron por plaqueo una o dos veces más para asegurar que el virus purificado provenía de una célula infectada por una única partícula.

III.2.2 MANIPULACIÓN Y CLONAJE DE ÁCIDOS NUCLEICOS

III.2.2.1 Cultivo de bacterias y preparación de células competentes

Las bacterias se plaquearon a 37°C en medio sólido LB con 1,5% de agar noble y 100 µg/ml de ampicilina. Colonias individuales se aislaron y se crecieron a 37°C con fuerte agitación en medio LB líquido conteniendo la misma concentración de antibiótico. A alícuotas de estos cultivos se les añadió glicerol al 20% (concentración final) y se guardaron a -80°C para su uso posterior (Sambrook y col., 1989; Miller, 1972).

Para la preparación de bacterias competentes para la transformación se siguió el método del cloruro de rubidio (Hanahan, 1983). Las células se crecieron en medio SOB enriquecido con Mg²⁺, a 37°C, con agitación, hasta una densidad óptica a 550 nm de 0,45-0,55. Este cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min, a 4°C, en un rotor JA-17 (Beckman). El sedimento obtenido se resuspendió suavemente en 10 ml de tampón Tfb I (100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM AcOK, 10 mM CaCl₂, 15% glicerol) por cada 30 ml del cultivo inicial y se volvió a centrifugar. El nuevo sedimento se resuspendió con suavidad en 2,4 ml de tampón Tfb II (10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% glicerol) por cada 30 ml del cultivo inicial. Y se repartió en tubos eppendorff de 1,5 ml sumergidos en un baño de etanol/CO₂. Las bacterias se almacenaron congeladas a -80°C hasta su uso.

III.2.2.2 Clonaje de DNA

Bacterias portadoras de los plásmidos que se utilizaron como vectores se crecieron en 5 ml de medio LB líquido con antibiótico durante toda la noche, con agitación fuerte, a 37°C. El DNA se purificó empleando los *kits* Wizard Magic Minipreps DNA purification Sytem (Promega) o SNAP Miniprep (Invitrogen, Groningen, Holanda).

El clonaje de los plásmidos pRB/F y pRB/F_{TM-} ya se ha descrito anteriormente (Bembridge y col., 1998). Brevemente, el gen de la proteína F de VRSH (cepa Long) se subclonó a partir del plásmido LF1, que contiene el gen de la proteína F (Cristina y col., 1990), en el vector pRB21, digiriendo ambos plásmidos con *Stu*I y *Hind*III. Para obtener el plásmido pRB/F_{TM-} se introdujo un codon de parada prematuro en el plásmido LF1, I525Stop (ATC a TTA), mediante PCR con oligos específicos, con lo que se eliminaron los últimos 50 aminoácidos de la proteína F y después se subclonó en el plásmido pRB21.

Los plásmidos pRB/FR108N, pRB/FR109N pRB/FR108N/R109N, pRB/F_{TM-}R108N, pRB/F_{TM-}R109N, pRB/F_{TM-}R108N/R109N y pRB/F_{TM-}Δ131-134 se obtuvieron mediante PCR [95°C/3 min, (95°C/30 s, 55°C/1 min, 68°C/14 min)x18, 4°C/∞] con el *kit* Quik Change site-directed mutagenesis, usando como molde los plásmidos pRB/F o pRB/F_{TM-} y con los oligos correspondientes (apartado III.1.2.2). Las mutaciones que se introdujeron fueron: AGA a AAC (R108N), AGA a AAC (R109N) y la eliminación de los nucleótidos 404-415 (Δ131-134). El resultado de la PCR se digirió con Dpn I para eliminar el DNA parental metilado, siguiendo las instrucciones del proveedor.

Materiales y Métodos

Bacterias *E. coli* DH5 competentes se transformaron con los plásmidos resultantes. Las células competentes se incubaron 5 min en hielo y, posteriormente, se le añadió el plásmido y se incubaron 15 min a 4°C, 1,5 min a 42°C y, finalmente, 5 min a 4°C. A continuación se añadió 1 ml de LB y se incubaron durante 1 h a 37°C. Las bacterias transformadas se crecieron durante la noche a 37°C en placas de LB-ampicilina.

III.2.2.3 Caracterización de plásmidos recombinantes

Las colonias de bacterias transformadas se crecieron durante toda la noche en medio LB líquido con ampicilina, a 37°C, con agitación. Para la obtención de DNA a escala analítica, se empleó el *kit* SNAP Miniprep, según las instrucciones del proveedor.

En primer lugar, se evaluó la presencia de plásmidos que contenían el inserto de interés mediante electroforesis en geles de agarosa. Después, los insertos clonados se secuenciaron para comprobar que no se había introducido ninguna mutación no deseada. La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador automático Perkin-Elmer utilizando el *kit* DNA Sequencing kit dRhodamine terminator cycle sequencing ready reaction. Para cada reacción de PCR [94°C/3 min (96°C/10 s, 50°C/5 s, 60°C/4 min)x25, 4°C/∞) se empleó como molde 1 µg de DNA aproximadamente y 40 ng del oligonucleótido OF578-595- como iniciador. El DNA se precipitó posteriormente con etanol absoluto y 2 mM MgCl₂ y, tras centrifugar y eliminar el sobrenadante, se lavó con etanol al 75%. El precipitado se secuenció automáticamente.

III.2.3 PURIFICACIÓN DE AcMs y PROTEÍNAS

III.2.3.1 Purificación de AcMs

Los AcMs se purificaron a partir de líquido ascítico. Para la obtención de líquido ascítico se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) ratones BALB/C de 2-5 meses de edad con 0,5 ml de Pristane (2-6-10-14 tetrametil-pentadecano, Sigma) y 10-15 días después se inyectaron i.p. con 4x10⁶ células de hibridoma en 0,2 ml de PBS. Cuando se observó crecimiento tumoral se procedió al drenaje y recolección del líquido ascítico, que se clarificó por centrifugación a 10000 rpm, durante 30 min, en un rotor JA-17 y se repartió en alícuotas que se conservaron a -20°C.

El líquido ascítico se dializó frente a tampón de adsorción (1,5 M Gly, 3 M NaCl, pH 8,9) y, a continuación, se pasó por una columna de proteína A-Sepharosa, equilibrada en el mismo tampón. Los AcMs unidos a la columna se eluyeron con 0,1 M citrato sódico, pH 3,0. Una vez eluidos los AcMs, se neutralizó el pH con Tris saturado. Todo el proceso se siguió por medida de la absorbancia a 280 nm..

Alternativamente, los AcMs se purificaron en *batch*. Se pesaron 0,15 g de proteína A-Sepharosa, se hidrataron en PBS y se equilibraron en tampón de adsorción (1:5, vol/vol). Se añadieron 100 µl de líquido ascítico diluido en tampón de adsorción a 100 µl de la suspensión de Sepharosa. Se dejó agitando durante la noche a 4°C y, posteriormente, se lavó exhaustivamente la proteína A-Sepharosa con tampón de adsorción y se eluyó el AcM con 100 µl de tampón 0,1 M citrato sódico, pH 3,0

Materiales y Métodos

durante 15 min, a temperatura ambiente y con agitación. La disolución de proteína eluida se neutralizó con Tris saturado.

La capacidad de unión de los AcMs purificados a su antígeno se analizó mediante ELISA, empleando como antígeno extracto de células HEp-2 infectadas con el VRSH (cepa Long) o proteína F_{TM}- purificada. La concentración se estimó por absorbancia a 280 nm y un ensayo Bradford.

III.2.3.2 Preparación de columnas de inmunoafinidad

Se pesó 1 g de Sepharosa 4B-CNBr y se hidrató durante 15 min en 1 mM HCl a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con 1 mM HCl y H₂O exhaustivamente, dejando la Sepharosa equilibrada en tampón de acoplamiento (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3). Se dializaron 10 mg de AcM 2F frente a tampón de acoplamiento y se añadieron a la Sepharosa. La mezcla se incubó una noche, a 4°C, con agitación. A continuación se bloquearon los aniones CN⁻ que no habían reaccionado con 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0, durante 3 h a temperatura ambiente. Por último se hicieron tres lavados sucesivos con 0,1 M ácido acético, 0,5 M NaCl, pH 4,0 y 0,1 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0 y se equilibró la columna con 0,01% azida sódica en PBS.

III.2.3.3 Purificación de la proteína F_{TM}-

Células HEp-2 se infectaron con VRBF_{TM}- en medio DMEM-0 y se dejó progresar la infección durante 2-3 días hasta que el efecto citopático fue muy aparente. Se recogió el sobrenadante de las células y se centrifugó a 2000 rpm, durante 5 min, para eliminar los restos celulares.

El sobrenadante se precipitó con (NH₄)₂SO₄ al 65% de saturación, que se añadió lentamente, con agitación suave y en baño de hielo. Tras dejar reposar la suspensión durante 3-4 h a 4°C, la preparación se centrifugó a 13000 rpm, durante 45 min, en un rotor JA-14, a 4°C. El *pellet* se resuspendió en PBS en 1:50 del volumen inicial y se dializó exhaustivamente frente a PBS a 4°C. Después de la diálisis, la muestra se centrifugó a 15000 rpm, durante 30 min, en un rotor JA-17, a 4°C, descartándose el *pellet*.

Seguidamente, la preparación se pasó por una columna de Sepharosa, a la cual se había unido covalentemente el AcM 2F (apartado III.2.3.2). La columna se lavó exhaustivamente con PBS hasta alcanzar la línea base de absorbancia a 280 nm. La elución de la proteína F_{TM}- se realizó usando un tampón 0,1 M Gly-HCl, pH 2,5 y se neutralizó con Tris saturado. Por último, la proteína purificada se concentró y equilibró en PBS utilizando Centricon 30.

III.2.3.4 Purificación de la proteína F

Células HEp-2 se infectaron con VRBF en medio DMEM-0 o, alternativamente, con VRSH (cepa Long) en medio DMEM-2,5 y la infección se dejó progresar durante 2-3 días hasta que el efecto citopático fue muy aparente. Las células se desprendieron de la placa con un raspador y se lavaron con PBS. Posteriormente se

Materiales y Métodos

lisaron con tampón de lisis (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,6) con 1% de octilglucósido (10 ml/20 P₁₅₀).

El extracto de células se centrifugó a 10000 rpm, durante 15 min, en un rotor JA-17, a 4°C. El *pellet* se resuspendió en la mitad de tampón de lisis usado inicialmente y se volvió a centrifugar. El sobrenadante de esta segunda centrifugación se juntó al de la anterior y el *pellet* se descartó.

La muestra se aplicó a una columna de Sepharosa a la que previamente se había unido el AcM 2F, equilibrada con tampón de lisis con 1% de octilglucósido. Seguidamente, se lavó con PBS hasta que se alcanzó la línea base de absorbancia a 280 nm. La elución de la proteína F se realizó cambiando el pH de la columna a 2,5, usando un tampón 0,1 M Gly-HCl. La proteína eluida de la columna se neutralizó con Tris saturado.

El material eluido de la columna se volvió a pasar nuevamente por la misma matriz (en este caso en tampón PBS) siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. Finalmente, la proteína se concentró y equilibró en PBS con Centricon 30.

III.2.4 EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS EUCARIOTAS

III.2.4.1 Marcaje metabólico de proteínas

Células HEp-2 se infectaron con virus vaccinia recombinantes en medio DMEM-0 a una mdi de 5 ufp/célula. Después de 4 h a 37°C, se incubaron 1 h con medio DMEM-0 libre de Met o de glucosamina (enriquecido, en este último caso, con 2 mM uridina). Después se añadieron 200 µCi de Pro-mix L-[³⁵S] o de D-[6-³H]-glucosamina, respectivamente. A las 24 h se recogió el sobrenadante o se rasparon las células para preparar extractos celulares.

Las medidas de radiactividad se realizaron en un contador β de centelleo líquido utilizando Aquasol-2 (Dupont).

III.2.4.2 Preparación de extractos celulares

Las monocapas de células infectadas se rasparon de la placa y se recogieron por centrifugación a baja velocidad. El sedimento se lavó con PBS y se resuspendió en tampón de lisis (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,6) con 1% Tritón X-100, 1% deoxicolato sódico, o, alternativamente, sustituyendo los anteriores detergentes por 1% octilglucósido. El extracto se sonicó durante 2 min en baño de sonicación y el material no solubilizado se eliminó centrifugando a 14000 rpm durante 5 min en una centrífuga de mesa.

III.2.4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida, electrotransferencia e inmunodetección de proteínas (*western blot*)

Las proteínas diluidas en tampón de muestra (0,08 M Tris-HCl, 2% SDS, 10% glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, pH 6,8), se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de porcentajes comprendidos entre el 7,5 y el 15%, en presencia o ausencia de 5% β -mercaptoetanol, según el método descrito por Studier (1972), a 100 V.

El gel se tiñó un mínimo de 45 min con 0,05% Azul de Coomassie, 45% metanol, 7% ácido acético en agua. El exceso de colorante se eliminó con 25% metanol, 7% ácido acético en agua. Cuando el gel contenía muestras marcadas radiactivamente, además se incubó en Amplify durante 30 min antes de secarlo al vacío.

En otras ocasiones, el gel se tiñó con colorante específico de glicoproteínas (GelCode Glycoprotein Staining kit, Pierce, Rockford, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuando el gel se utilizó para realizar un *western blot* se electrotransfirió a papel Inmobilon-P (Towbin y col., 1979), en tampón de transferencia con SDS (2,5 mM Tris-HCl, 19,2 mM Glicina, 0,01% SDS, 20% metanol, pH 7,5), durante 1 h, a 295 mA. Los sitios de unión inespecífica de la membrana se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente o, alternativamente, toda la noche a 4°C con 0,2% I-Block en PBS-0,1% Tween-20. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con los anticuerpos o antisueros diluidos en 0,2% I-Block-PBS-0,1% Tween-20 con agitación. A continuación, la membrana se lavó con PBS-0,05% Tween-20. Los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron mediante la incubación con anti-Ig conjugado con peroxidasa y, tras lavar la membrana nuevamente con PBS-0,05% Tween 20, se revelaron con el sustrato ECL comercial (Amersham-Pharmacia-Biotech) o con 0,03% H₂O₂, 0,1 mM Tris-HCl, 0,8 mM luminol, 5 mM ácido p-cumárico en H₂O.

III.2.4.4 Inmunoprecipitación

Se saturaron 50 μ l de proteína A-agarosa con 5% leche desnatada en PBS durante la noche. Cuando en la inmunoprecipitación se iban a emplear AcMs, se incluyó un paso de amplificación en el que, durante 30 min, se incubó la proteína A-agarosa con 1 μ l de suero de conejo anti-Ig de ratón (RAM, 170 mg/ml, Cederlane) en 5% leche desnatada en PBS. Tras esto se lavó la proteína A-agarosa con tampón PNS (0,5% NP-40, 0,25% SAB en PBS). A continuación se incubó con los AcMs (una mezcla de los AcMs 2F, 47F, 55F, 56F y 70F) o sueros, diluidos en 5% leche desnatada en PBS, durante 2 h a 4°C y después se lavó con PNS.

Seguidamente se añadieron los extractos o los sobrenadantes, marcados con ³⁵S-Met o con ³H-Glucosamina (4x10⁷-10⁷ cpm aproximadamente), diluidos en PNS y se incubaron durante 2 h a 4°C. Finalmente, la matriz se lavó exhaustivamente con RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxicolato sódico, 0,1% SDS, pH 7,5) y PBS. Todo el proceso se llevó a cabo con agitación rotatoria. Las proteínas unidas a los anticuerpos se eluyeron con tampón de muestra para

electroforesis mediante calentamiento a 100°C durante 3 min, analizándose el resultado por SDS-PAGE y autorradiografía.

III.2.4.5 ELISA

Placas de cloruro de polivinilo de 96 pocillos se cubrieron con 50 µl de antígeno y se incubaron durante toda la noche a 4°C. El antígeno se diluyó en PBS si eran extractos o proteínas purificadas, o en 0,1 M Na₂CO₃, 0,15 M NaCl, pH 9,5 si eran péptidos. Los pocillos se saturaron durante 30 min con 5% suero de cerdo (SC), 0,05% Tween-20 en PBS. A continuación se incubó 1 h con los sueros o AcMs diluidos en el tampón anterior y se lavó con agua. Los complejos inmunes se detectaron con un anticuerpo anti-Ig conjugado con peroxidasa, diluido en 5% SC-PBS, y se reveló con el sustrato comercial OPD. La reacción colorimétrica se paró añadiendo 3 N H₂SO₄ y la absorbancia se midió a 492 nm.

III.2.4.6 Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa

Aproximadamente 100 µg de proteína se centrifugaron en gradientes de sacarosa en PBS previamente formados sobre un colchón de 0,5 ml del 70% de sacarosa. Los gradientes del 10-25% de sacarosa se ultracentrifugaron a 39000 rpm, durante 15 h, a 4°C, en un rotor SW40 y los del 10-30% de sacarosa a 34000 rpm. Se recogieron 13 fracciones de 1 ml desde la parte superior del gradiente.

III.2.4.7 Microscopía electrónica

Las proteínas se adsorbieron a rejillas de carbono y se tiñeron con 1% silicotungstato sódico a pH 7,0. Para visualizar las muestras se utilizó un microscopio electrónico Jeol 1200 a 100 kV. Las micrografías se tomaron con una dosis mínima, en condiciones de desenfoque que permitieron una resolución de 1,5 nm, aproximadamente (Wrigley y col., 1986).

III.2.4.8 Secuenciación N-terminal y espectrometría de masas

Para la secuenciación N-terminal, tras la separación de las proteínas mediante SDS-PAGE, el gel se transfirió con tampón 30 mM Na₂CO₃, 100 mM NaHCO₃, pH 9,9 a Inmobilon-P y se tiñó con Rojo Ponceau. Las bandas elegidas se recortaron y se realizó la degradación de Edman en un secuenciador automático Applied Biosystem Procise 494.

Para la espectrometría de masas de péptidos trípticos se realizó un SDS-PAGE de la proteína F_{TM}- purificada y se tiñó el gel con Azul de Coomassie coloidal (Pierce). Las bandas se recortaron y transfirieron a placas de 96 pocillos de un digestor automático Investigator ProGest Protein Digestion Station (Genomic Solutions, Cambridgeshire, Reino Unido). Después de reducir y alquilar, las bandas elegidas de la proteína se digirieron con tripsina porcina modificada de calidad de secuenciación a una concentración final de 16 ng/ml, durante 12 h, a 37°C, según el protocolo de Schevchenko y col. (1996). Los péptidos se eluyeron con 25 mM NH₄HCO₃, 10% ácido fórmico (vol/vol) acetonitrilo en un volumen final de 100 µl.

Materiales y Métodos

Una alícuota de 0,5 μ l se mezcló con una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxi-trans-cinámico y se procesó para espectroscopía de masas. Los espectros se tomaron usando un espectrómetro de masas Bruker Reflex III desorción/ionización por láser asistido por matriz de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (Bruker-Franzer Analytik GmbH, Bremen, Alemania), equipado con una extracción retardada y operando en el modo reflector. El equipo fue previamente calibrado externamente empleando señales de masa protodas de una mezcla de péptidos que cubrían el rango 1000-4000 m/z y cada espectro se calibró internamente usando señales seleccionadas de la autoproteólisis de la tripsina.

Las masas de los péptidos fueron transferidas del programa MS BioTools al Mascot Peptide Mass Fingerprinting search engine (Matrix Science, Londres, Reino Unido) para buscar automáticamente en la base de datos CNBIr. No se introdujeron restricciones en las especies de origen de las proteínas y la masa molecular admitida estuvo en el rango 1-200 kDa.

III.2.4.9 Digestión con N-glicosidasa F

Se añadió SDS hasta una concentración del 0,1% sobre la preparación de proteína que se iba a digerir con N-glicosidasa F. La muestra se hirvió durante 2 min. Tras atemperar, se añadió octilglucósido hasta una concentración final del 0,5% y se volvió a hervir la preparación durante 2 min. Por último, se añadió la N-glicosidasa F y se incubó a 37°C, durante 20 h.

III.2.5 OBTENCIÓN DE SUEROS ANTI-PÉPTIDO Y ANTI-F

El suero α F₂₅₅₋₂₇₅ se preparó previamente en el laboratorio por López y col. (1993), tras la inoculación de un conejo con el péptido 255-275 de la proteína F (cepa Long) unido a keyhol limpet haemocianina (KLH).

El suero α F también fue preparado previamente en el laboratorio mediante la inoculación de proteína F purificada (cepa Long) a un conejo.

El péptido 104-117 de la proteína F (cepa Long), con una Cys adicional en su extremo C-terminal (104-117C), se sintetizó utilizando la química Fmoc en un sintetizador Applied Biosystems 430A. El péptido desprotegido y liberado de la resina con ácido trifluoroacético se purificó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Carreño y col., 1992). Por último, se acopló a KLH por su Cys extra.

El complejo 104-117C/KLH se emulsionó en adyuvante completo de Freund (Difco) y se inoculó a un conejo New Zealand intradérmicamente en el lomo en múltiples sitios, del cual previamente se obtuvo suero preinmune. Al cabo de dos semanas se le dio una segunda dosis de antígeno emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (Difco), esta vez intramuscularmente en las patas traseras. Se repitió esta inoculación dos veces más con intervalos de 10-15 días.

El conejo se sangró 10 días después de la última inoculación de la oreja y el antisuero se ensayó en ELISA, empleando como antígeno extractos de células HEp-2

infectadas con VRSH o proteína F_{TM}- purificada. También se ensayó su reactividad frente a proteína F_{TM}- purificada en *western blot*.

III.2.6 ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

El alineamiento múltiple de secuencias se realizó utilizando el programa PileUp del paquete informático GCG W²H (<http://www.es.embnet.org/cgi-bin/w2h/w2h.start>).

Las secuencias alineadas del VRSH fueron: Long (López y col., 1988), A2 (Collins y col., 1984a), RSS-2 (Baybutt y Pringle, 1987), Edimburgh (Scopes y col., 1990), 18537 (Johnson y Collins, 1988a) y B1 (Karron y col., 1997). En el resto de pneumovirus las secuencias alineadas fueron: VRSB, cepa RB94 (Walravens y col., 1990); virus de la neumonía de ratón, cepa 8 (Chambers y col., 1992); y neumovirus aviar, cepa UK/3B/85 (Ling y col., 1992).

IV. RESULTADOS

IV.1 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS F Y F_{TM-} A PARTIR DE VIRUS VACCINIA RECOMBINANTES QUE EXPRESAN AMBAS PROTEÍNAS

La proteína F silvestre se purificó a partir de extractos de células infectadas con el virus VRBF. Así mismo, una forma mutante de la proteína F (F_{TM-}), en la que se habían eliminado los últimos 50 residuos, que forman las regiones transmembrana y citoplásmica, se purificó a partir del sobrenadante de células infectadas con el virus VRBF_{TM-}, ya que se excreta al medio extracelular. La proteína F_{TM-} se purificó con la finalidad de obtener una proteína soluble en medio acuoso en ausencia de detergentes y que, por tanto, fuese más fácil de utilizar en estudios estructurales.

IV.1.1 PUESTA A PUNTO DE LA PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA F_{TM-}

Con el objeto de eliminar los contaminantes del suero de ternera fetal (STF) del material de partida, se probó a hacer la infección de células HEp-2 en ausencia del suero, que se utiliza como aditivo del medio de cultivo. Así, células HEp-2 se infectaron con VRBF_{TM-} en medio DMEM con distintas concentraciones de suero. La cantidad de proteína excretada en el medio de las células no varió sustancialmente con las distintas concentraciones de STF, como se observó por *western blot* del medio de cultivo (Figura IV.1.1). Puesto que la producción de proteína F_{TM-} no estaba afectada por la cantidad de STF añadido al medio de cultivo, las infecciones posteriores se realizaron en medio libre de suero.

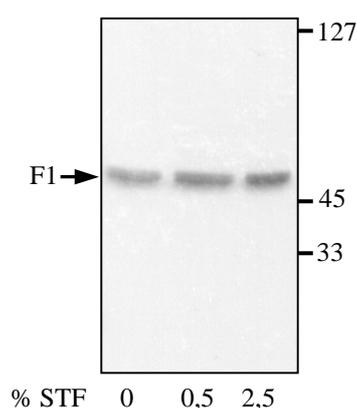


Figura IV.1.1: Expresión de la proteína F_{TM-} en células infectadas con VRBF_{TM-} en presencia de distintos porcentajes de STF. Células HEp-2 se infectaron con virus VRBF_{TM-} en medio DMEM con los porcentajes de STF que se indican en la parte inferior de la figura. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron a los 2 días post-infección, se precipitaron con (NH₄)₂SO₄ al 65% de saturación y se analizaron por *western blot* con suero policlonal αF, en un gel de poliacrilamida del 10%. Los marcadores de masa molecular se indican a la derecha de la figura en kDa. La flecha indica la posición de la cadena F1 de la proteína F_{TM-}.

En la primera etapa de purificación, el medio de cultivo de células infectadas con VRBF_{TM-} se precipitó con (NH₄)₂SO₄. Mediante precipitación secuencial con esta sal se determinó el porcentaje óptimo para la precipitación de proteína F_{TM-}. Como se muestra en la Figura IV.1.2, parte de la proteína precipitó al 20% de saturación, otra parte al 40% y aún otra al 65%. Por tanto, se adoptó como protocolo general la precipitación con (NH₄)₂SO₄ al 65% de saturación. En la figura, además de la banda de

Resultados

la cadena F1, aparecen otras bandas de menor movilidad electroforética que reaccionaron con los anticuerpos anti-F y que se caracterizarán más adelante.

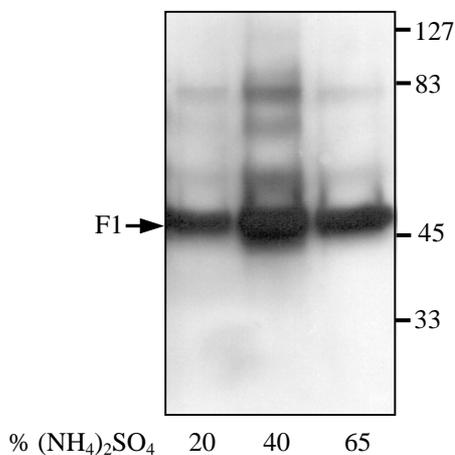


Figura IV.1.2: Precipitación de proteína F_{TM-} con (NH₄)₂SO₄. El medio de cultivo de células HEP-2 infectadas con VRBF_{TM-} se precipitó secuencialmente con sulfato amónico al 20, 40 y 65% de saturación. El precipitado se resuspendió en PBS y se analizó por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida del 10% y posterior *western blot* con un suero α F. Los marcadores de masa molecular se indican a la derecha de la figura en kDa. La flecha indica la posición de la cadena F1 de la proteína F_{TM-}.

El siguiente paso de purificación, tras la precipitación con (NH₄)₂SO₄ al 65% de saturación, fue una cromatografía de inmunoafinidad utilizando una columna de Sepharosa a la que previamente se unió el AcM 2F, como se describe en el apartado III.2.3.2 de Materiales y Métodos. Tras el paso de la muestra, la columna se lavó exhaustivamente con PBS, hasta que la absorbancia a 280 nm llegó a la línea base. La elución se realizó secuencialmente a pH 4,5, 3,5 y 2,5. Como se puede apreciar en el cromatograma de la Figura IV.1.3 A, sólo a pH 2,5 se consiguió eluir la proteína F_{TM-}.

La integridad de la proteína F_{TM-} eluida de la columna de inmunoafinidad y su estado de pureza se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de *western blot* o tinción con Azul de Coomassie. Como se muestra en el *western blot* de la Figura IV.1.3 B, la proteína no se degradó significativamente durante el proceso de purificación (no se detectaron bandas de menor tamaño que la cadena F1). Lo que sí se aprecia es la presencia de dos bandas de menor movilidad electroforética que la cadena F1 (marcadas con un asterisco) que reaccionaron con el suero anti-F y que se caracterizarán más adelante. Aunque se consiguió un grado de purificación sustancial (comparar el canal 1 con los canales 43, 44 y 45 del gel teñido con Azul de Coomassie) todavía aparecieron algunos contaminantes; en todo caso, el grado de pureza conseguido para la proteína F_{TM-} tras la elución de la columna de inmunoafinidad fue suficiente para la mayoría de los ensayos que se realizaron con posterioridad.

No toda la proteína F_{TM-} se unió a la columna de inmunoafinidad y una parte sustancial de la misma se perdió en los lavados de la matriz. Como se aprecia en la Figura IV.1.3, las primeras fracciones del lavado dieron señal positiva en ELISA (parte A) y se observó la presencia de proteína F_{TM-} por *western blot* en la primera fracción del lavado (parte B). Una posible explicación de la incapacidad de la proteína F_{TM-} para unirse totalmente a la columna es que estuviese formando microagregados que no se uniesen al anticuerpo de la columna. Para intentar eliminar los posibles agregados de proteína F_{TM-} se realizó la cromatografía en presencia de 1% de octilglucósido. Como se observa en la Figura IV.1.4 A, una parte sustancial de la proteína cargada en la columna siguió sin unirse al AcM (calle NR) aún en presencia del detergente, aunque la mayoría de la proteína continuó uniéndose a la columna (calle E).

Resultados

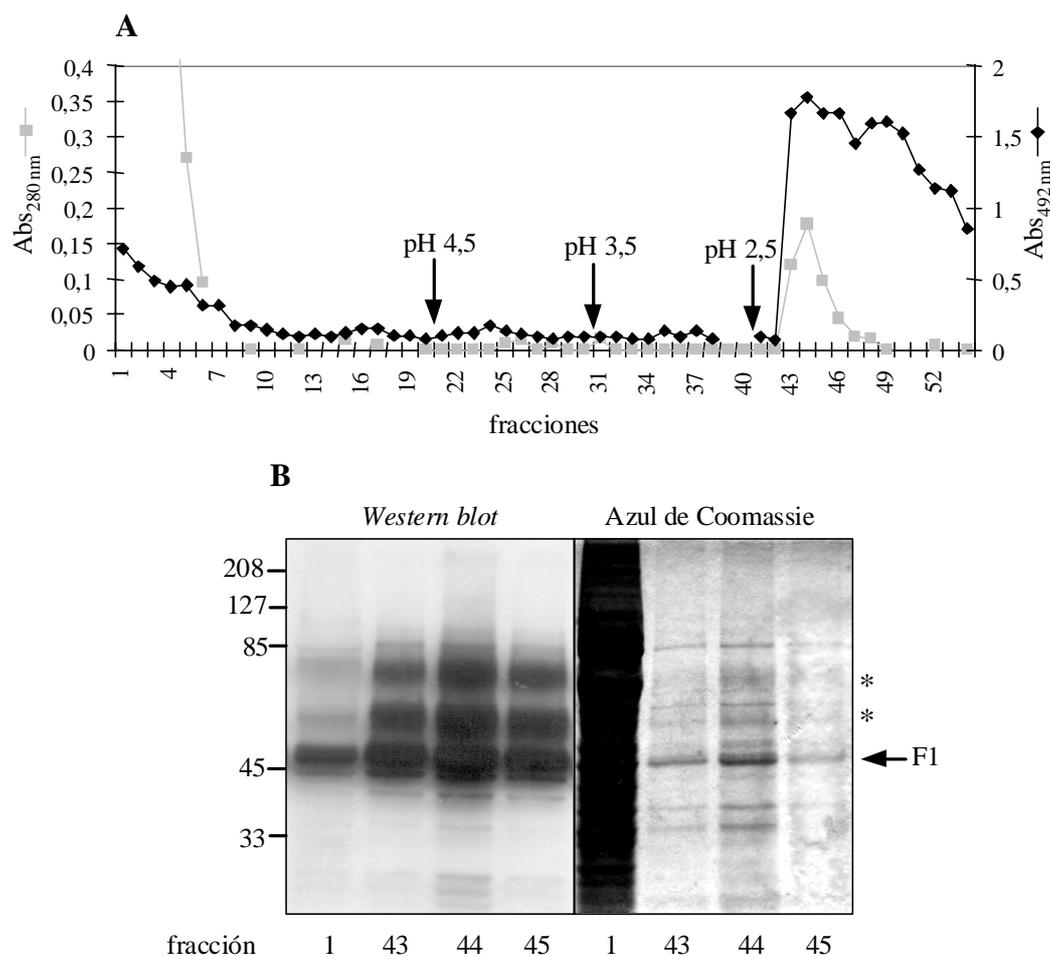


Figura IV.1.3: Purificación de la proteína F_{TM}- por cromatografía de inmunoafinidad. A: Cromatograma de la purificación. El medio de cultivo de células HEP-2 infectadas con VRBF_{TM}-, precipitado con (NH₄)₂SO₄, se pasó por una columna de Sepharosa-AcM 2F. La columna se lavó exhaustivamente con PBS y la proteína se eluyó con tampón 0,1 M Glicina-HCl a los distintos pHs indicados en la figura. Se recogieron fracciones de 1 ml en las que se determinó la absorbancia a 280 nm y la presencia de F_{TM}- mediante ELISA con el AcM 47F (Abs a 492 nm). **B: Análisis electroforético de la proteína F_{TM}- purificada por cromatografía de inmunoafinidad.** En la parte izquierda se representa un western blot (con suero policlonal αF) y en la derecha el gel de las mismas fracciones teñido con Azul de Coomassie. Los números de cada canal corresponden a la fracción del cromatograma de la parte A. El porcentaje de acrilamida del gel fue del 10%. Los asteriscos indican otras bandas de proteína F_{TM}-, además de la banda de la cadena F1.

Para comprobar si la proteína F_{TM}- no unida a la resina de Sepharosa-AcM 2F era incapaz de unirse al anticuerpo de la columna, el material no retenido de una cromatografía se pasó de nuevo por la columna de inmunoafinidad. Como se observa en la Figura IV.1.4 B, de nuevo una parte de la proteína se perdió en los lavados, aunque otra fracción de la misma se unió a la columna de inmunoafinidad y se eluyó a pH 2,5. Este resultado indica que la proteína no unida a la columna no había perdido su capacidad de reconocer al AcM. Además, la columna no se encontraba saturada, ya que añadiendo cantidades pequeñas de material a la matriz, una parte de la proteína F_{TM}- siguió sin unirse a la columna (no mostrado). Probablemente, la ineficiente unión se

Resultados

deba a una baja constante de asociación entre la proteína y el AcM en las condiciones en las que se realiza la unión en la cromatografía.

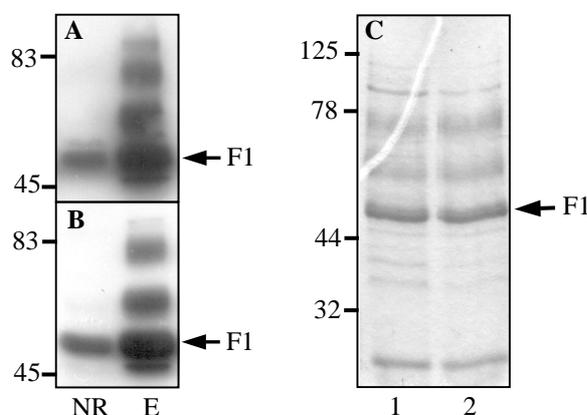


Figura IV.1.4: Optimización de la purificación de proteína F_{TM^-} . *A: Purificación de proteína F_{TM^-} por cromatografía de inmunoafinidad en presencia de 1% octilglucósido.* La proteína F_{TM^-} se purificó como en la Figura IV.1.3, excepto que el material precipitado con $(NH_4)_2SO_4$ se resuspendió en PBS con 1% de octilglucósido y la columna se lavó con PBS conteniendo 1% de octilglucósido. Se muestra el *western blot* del material no retenido en la columna (NR) y de la fracción máxima del pico de elución (E) con el suero $\alpha F1_{255-275}$. *B: Purificación de la proteína no retenida en la columna mediante cromatografía de inmunoafinidad.* El material no retenido de la columna de afinidad de la Figura IV.1.3 se volvió a pasar de nuevo por la columna. Se muestra el *western blot* con el AcM 47F del material no retenido (NR) y del eluido (E) de la segunda cromatografía. *C: Purificación de la proteína F_{TM^-} por una segunda cromatografía de inmunoafinidad.* La proteína purificada a través de la columna de inmunoafinidad se volvió a pasar nuevamente por la misma columna. Los picos de elución de la primera (1) y segunda (2) columnas se analizaron por SDS-PAGE (10% de acrilamida) y posterior tinción con Azul de Coomassie.

Para intentar obtener la proteína más pura, después de la columna de inmunoafinidad se realizó una segunda cromatografía por la misma columna. Este proceso no aumentó el grado de pureza de la proteína F_{TM^-} de manera sustancial (Figura IV.1.4 C) y además supuso la pérdida de parte de ella que no se retuvo en la columna, por lo cual, en el protocolo general de purificación, se eliminó este último paso. En consecuencia, el protocolo general de purificación de la proteína F_{TM^-} consistió de los siguientes pasos (apartado III.2.3 del Materiales y Métodos): i) recogida del sobrenadante de células HEp-2 infectadas con VRBF $_{TM^-}$; ii) precipitación con sulfato amónico al 65% de saturación; iii) resuspensión y diálisis frente a PBS; iv) unión a una columna de Sepharosa-2F, elución a pH 2,5 y neutralización; v) concentración; y vi) equilibrado en PBS.

IV.1.2 PUESTA A PUNTO DE LA PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA F

El protocolo de purificación de la proteína F fue básicamente el mismo que el de la proteína F_{TM^-} (apartado III.2.3.4 de Materiales y Métodos), aunque presentó algunas diferencias que se detallan a continuación.

Resultados

Células HEp-2 se infectaron con VRBF en ausencia de STF y, al cabo de 2 ó 3 días, en lugar de procesar el sobrenadante, se preparó un extracto de las células en presencia de 1% de octilglucósido. La proteína se purificó por cromatografía de inmunoafinidad. La columna utilizada y el desarrollo de la misma fue similar al descrito para la proteína F_{TM}. La proteína F purificada se analizó en un gel del 10% de acrilamida que se analizó por *western blot* o se tiñó con Azul de Coomassie (Figura IV.1.5 A). Se puede apreciar como, a diferencia de la proteína F_{TM}, la proteína F no retenida en la matriz (calle NR) fue indetectable. En contrapartida, la proteína eluida de la columna (calle E) presentó un grado de pureza menor que hizo necesarios pasos de purificación posteriores.

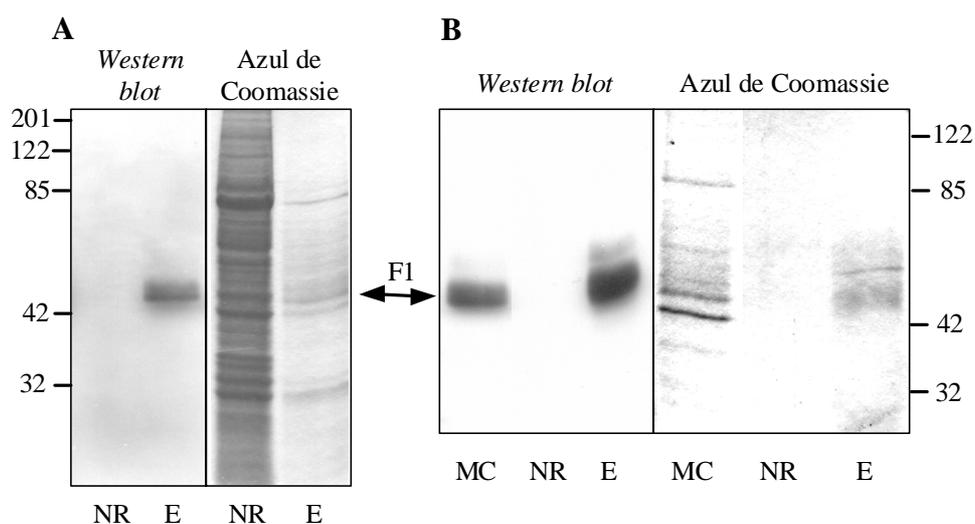


Figura IV.1.5: Purificación de proteína F. A: Cromatografía de inmunoafinidad. La proteína F se purificó a partir de extractos de células HEp-2 infectadas con VRBF, como se indica en el texto. Se muestra un gel (10% de acrilamida) revelado por *western blot* con el AcM 47F o teñido con Azul de Coomassie. NR es la proteína no retenida y E es el pico máximo de elución. **B: Purificación de la proteína F por una segunda cromatografía de inmunoafinidad.** La proteína purificada por columna de inmunoafinidad se volvió a purificar de nuevo por la misma columna y se analizó por SDS-PAGE y posterior *western blot* con el suero α F1₂₅₅₋₂₇₅ o tinción del gel con Azul de Coomassie. El contenido de las calles es como en la parte A de la figura y MC es el material cargado en la columna de inmunoafinidad.

Se intentó mejorar la pureza de la proteína eluida pasándola una segunda vez por la misma columna. En la Figura IV.1.5 B se puede apreciar, en el gel teñido con Azul de Coomassie, como el material eluido de la primera columna (calle MC) se purificó apreciablemente tras una segunda cromatografía (calle E). Además, como se puede observar en el *western blot*, la cantidad de proteína que no se unió a la columna fue de nuevo indetectable (calle NR). Así, en el protocolo general de purificación de la proteína F se incluyeron dos cromatografías de inmunoafinidad consecutivas.

IV.2 COMPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS F Y F_{TM-}

Con el fin de comprobar si las proteínas F y F_{TM-} tienen estructuras similares y, por lo tanto, las regiones transmembrana y citoplasmática son dispensables para el correcto plegamiento del ectodominio de la proteína F, ambas proteínas se sometieron en paralelo a los ensayos que se presentan en los siguientes apartados.

IV.2.1 MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN DISTINTAS CONDICIONES DE CALENTAMIENTO Y REDUCCIÓN

Puesto que la movilidad electroforética de una proteína en presencia de SDS depende, en cierta medida, de su grado de desnaturalización que, a su vez, viene determinado por su estructura, las proteínas F y F_{TM-} purificadas se trataron en distintas condiciones de reducción y calentamiento y se analizaron por *western blot* con un AcM específico de la cadena F1.

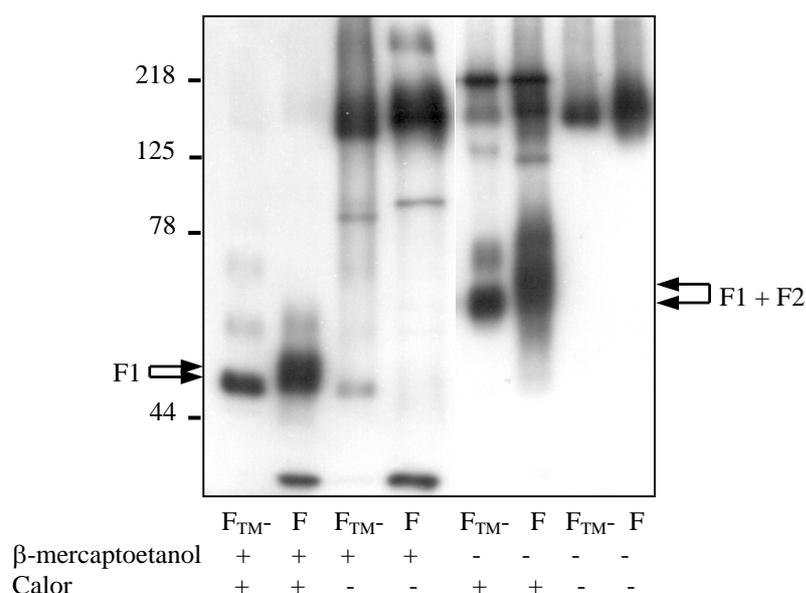


Figura IV.2.1: *Western blot* de las proteínas F_{TM-} y F en distintas condiciones de reducción y calentamiento. A cantidades iguales de proteína F_{TM-} o F ($\approx 1 \mu\text{g}/\text{canal}$) se añadió tampón de muestra de electroforesis. Según se indica en la parte inferior de la figura, las proteínas se calentaron (o no) a 100°C durante 3 min y se les añadió (o no) 5% de β-mercaptoetanol. Las proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE (gel del 7,5% de acrilamida) y posterior *western blot* con el AcM 47F.

Como se observa en la Figura IV.2.1, la banda mayoritaria en ambas proteínas reducidas y calentadas fue la correspondiente a la cadena F1. Por el contrario, cuando las proteínas reducidas no se calentaron, las formas mayoritarias de las proteínas F_{TM-} y F fueron bandas de alta masa molecular, probablemente oligómeros (trímeros o

Resultados

agregados de mayor grado). La forma mayoritaria de ambas proteínas calentadas pero sin reducir fue una banda que, por su tamaño, corresponde a las cadenas F1 y F2 unidas por puentes disulfuro, aunque también se observaron agregados mayores. Por último, cuando las proteínas no se redujeron ni se calentaron, las formas mayoritarias de las proteínas F_{TM^-} y F fueron agregados de alta masa molecular.

Según estos resultados, las dos proteínas se comportaron de manera análoga en SDS-PAGE, tanto en presencia como en ausencia de calentamiento y reducción, lo cual sugiere que tengan estructuras similares o quizá idénticas.

IV.2.2 SUSCEPTIBILIDAD A LA DIGESTIÓN CON TRIPSINA

Otra prueba de que dos proteínas tienen estructuras similares es la susceptibilidad de ambas a proteasas y ver si comparten productos de digestión. Por ello, las proteínas F_{TM^-} y F se digirieron con distintas cantidades de tripsina y los productos de digestión se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y *western blot* posterior con el AcM 47F (Figura IV.2.2).

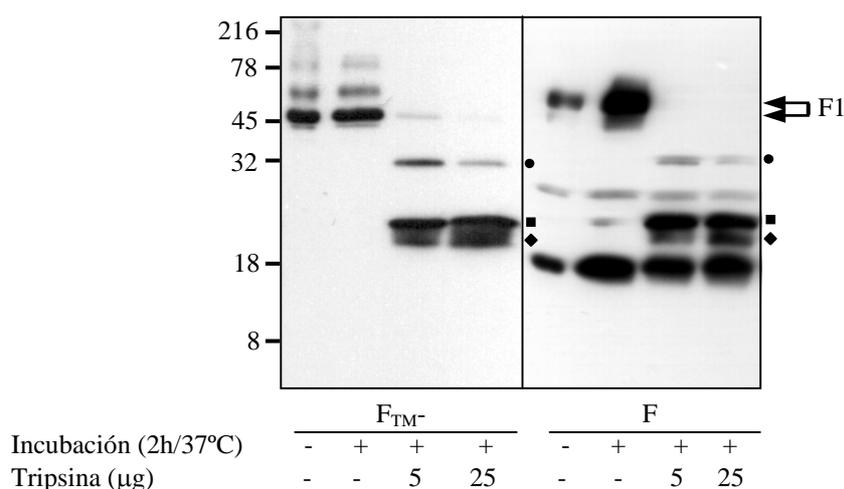


Figura IV.2.2: Susceptibilidad a la digestión con tripsina de las proteínas F_{TM^-} y F. Las proteínas F_{TM^-} y F ($\approx 1 \mu\text{g}$) se digirieron en $20 \mu\text{l}$ de PBS con 5 y $25 \mu\text{g}$ de tripsina-TPCK durante 2 h a 37°C . Los productos de las digestiones se analizaron por SDS-PAGE (15% de acrilamida) en condiciones reductoras y posterior *western blot* con el AcM 47F. Como control se cargó en el gel la proteína correspondiente sin incubar o incubada 2 h a 37°C en ausencia de tripsina. Las bandas producto de la digestión con tripsina se indican con los símbolos: ● (30 kDa), ■ (20,5 kDa) y ◆ (19 kDa).

Los productos de digestión obtenidos con $5 \mu\text{g}$ de tripsina fueron los mismos que con $25 \mu\text{g}$ de enzima, indicando que se trataba de fragmentos resistentes a la digestión con esta proteasa. En el caso de la proteína F_{TM^-} aparecieron tres bandas producto de la digestión con tripsina de 30 kDa (●), 20,5 kDa (■) y 19 kDa (◆). Las bandas de 20,5 y 19 kDa han sido previamente caracterizadas por secuenciación N-

Resultados

terminal y reactividad con AcMs. Ambas comparten su extremo N-terminal con el del péptido de fusión de la cadena F1 y, por tanto, se deben diferenciar en su extremo C-terminal (López y col., 1990; Arbiza y col., 1992). En la proteína F se pudieron detectar también las bandas de 30, 20,5 y 19 kDa como consecuencia de la digestión con tripsina. En la proteína completa, además, se detectó la presencia de otras dos bandas de mayor movilidad electroforética que la cadena F1, pero éstas no fueron producto de la digestión con tripsina, ya que estaban presentes en la proteína no tratada. Los mismos resultados se obtuvieron realizando el *western blot* con suero policlonal αF , no detectándose otras bandas resistentes a la digestión por tripsina que las reconocidas por el AcM 47F (no mostrado).

Por tanto, la susceptibilidad de las proteínas F y F_{TM-} a la digestión con tripsina es muy similar y los productos de digestión son idénticos, lo que apoya la idea de que ambas proteínas adoptan estructuras muy parecidas, sino idénticas.

IV.2.3 REACTIVIDAD EN ELISA CON AcMs ESPECÍFICOS DE LA PROTEÍNA F

Para comprobar si distintos epítomos de la proteína F, reconocidos por una amplia batería de AcMs, se expresaban de manera similar en la proteína F_{TM-} , se ensayó la reactividad de ambas proteínas en ELISA.

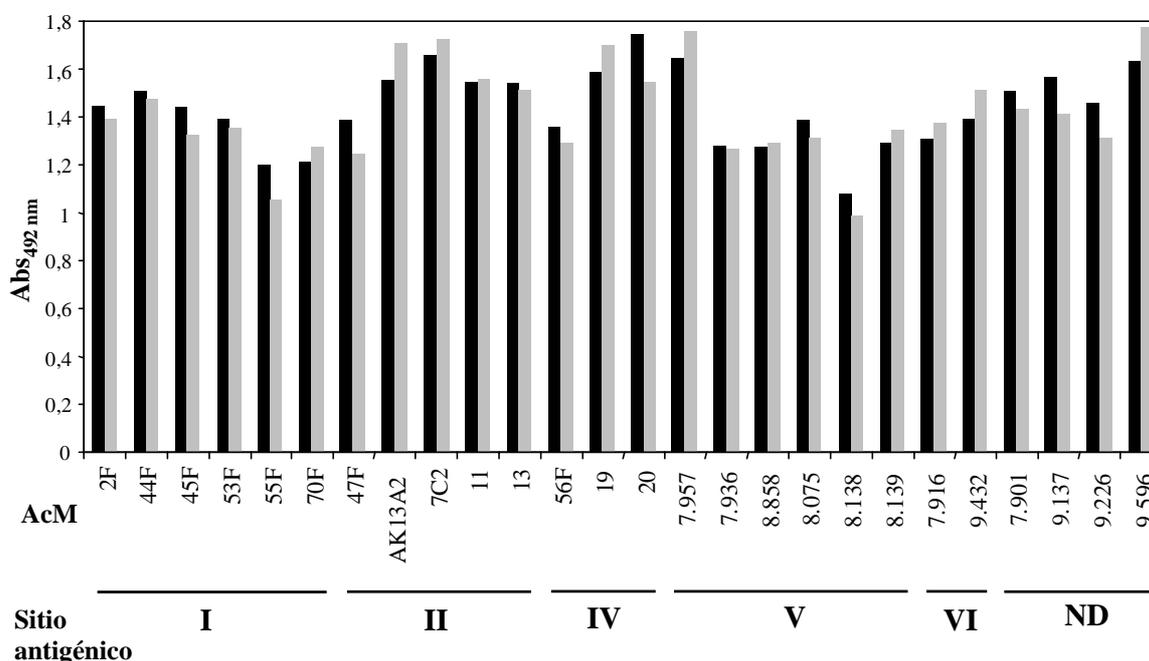


Figura IV.2.3: Reactividad en ELISA de las proteínas F y F_{TM-} purificadas. Cantidades iguales de proteína F y F_{TM-} se ensayaron por ELISA con cantidades no saturantes de cada uno de los AcMs específicos de la proteína F que se indican en el eje de abscisas. Se representan los valores de absorbancia obtenidos para cada anticuerpo con la proteína F (barras negras) y la proteína F_{TM-} (barras grises). Los AcMs se han agrupado según la localización de los epítomos que reconocen (sitios antigénicos I-VI) o cuya localización no se ha determinado (ND).

Resultados

Todos los anticuerpos mostraron una reactividad muy parecida con las proteínas F y F_{TM-} (Figura IV.2.3). Es de resaltar que muchos de los anticuerpos utilizados en este ensayo reconocen epítomos que dependen de la conformación nativa de la proteína, puesto que no reconocen a la proteína reducida en un *western blot* (anticuerpos de las áreas antigénicas I, V y VI y algunos del área IV).

El resultado obtenido indicó que las proteínas F y F_{TM-} son antigénicamente equivalentes.

IV.2.4 ULTRACENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTES DE SACAROSA

Las proteínas F y F_{TM-} se ultracentrifugaron en gradientes del 10 al 30% de sacarosa en PBS, en presencia o ausencia de 1% de octilglucósido.

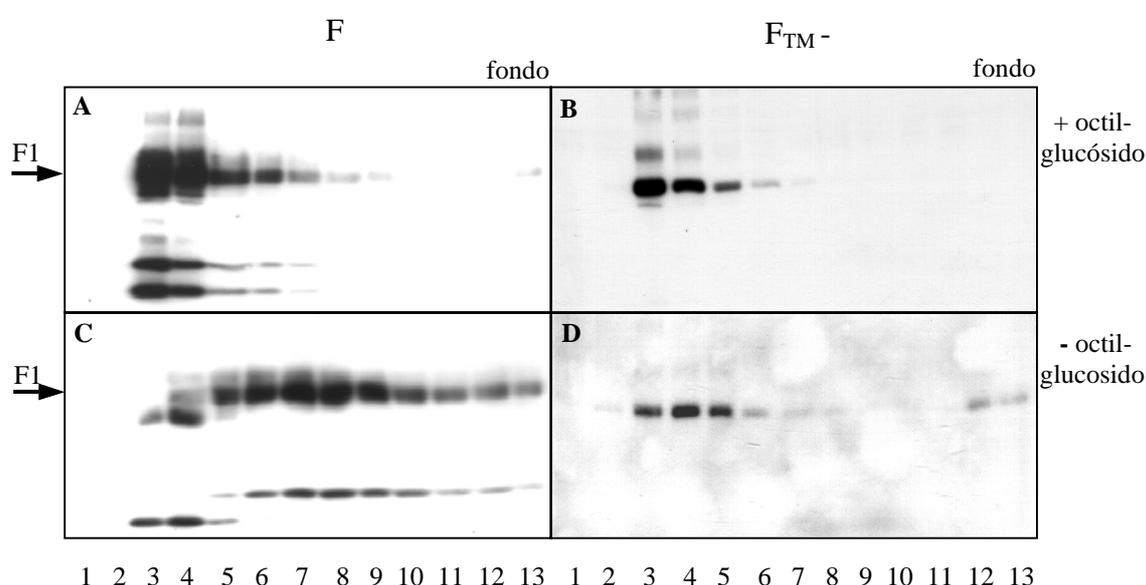


Figura IV.2.4: Ultracentrifugación de las proteínas F y F_{TM-} en gradientes de sacarosa. ≈ 100 µg de ambas proteínas se centrifugaron en gradientes del 10 al 30% de sacarosa a 34000 rpm, durante 15 h, en un rotor SW40, a 4°C. Se recogieron fracciones de 1 ml, de las cuales se cargaron 25 µl en un gel del 10% y se realizó un *western blot* con el AcM 47F. Las partes A y C corresponden a gradientes de la proteína F con y sin octilglucósido respectivamente. Las partes B y D corresponden a gradientes de la proteína F_{TM-} con y sin detergente, respectivamente.

La proteína F, en presencia de detergente, sedimentó como una banda cerca de la parte superior del gradiente (Figura IV.2.4 A). Sin embargo, en ausencia de detergente (Figura IV.2.4 C) migró como una banda ancha centrada en la parte media del tubo, con agregados que sedimentaron hacia el fondo del gradiente. El comportamiento de la proteína F en este ensayo es análogo al de otras proteínas de membrana que, en ausencia de detergente, tienden a agregar por la interacción de sus regiones transmembrana. En cambio, la proteína F_{TM-}, tanto en presencia (Figura IV.2.4 B) como en ausencia (Figura IV.2.4 D) de octilglucósido, migró mayoritariamente en

Resultados

las mismas fracciones que lo hizo la proteína F con detergente. En ausencia de detergente parte de la proteína también sedimentó en el fondo del tubo, sugiriendo la existencia de cierta agregación.

Se puede concluir que, en su forma no agregada, las proteínas F y F_{TM^-} sedimentan de manera similar en un gradiente de sacarosa.

IV.2.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La fracción 6 del gradiente de la proteína F (Figura IV.2.4 C) y la fracción 4 del de la proteína F_{TM^-} (Figura IV.2.4 D), ambos en ausencia de detergente, se observaron al microscopio electrónico por tinción negativa.

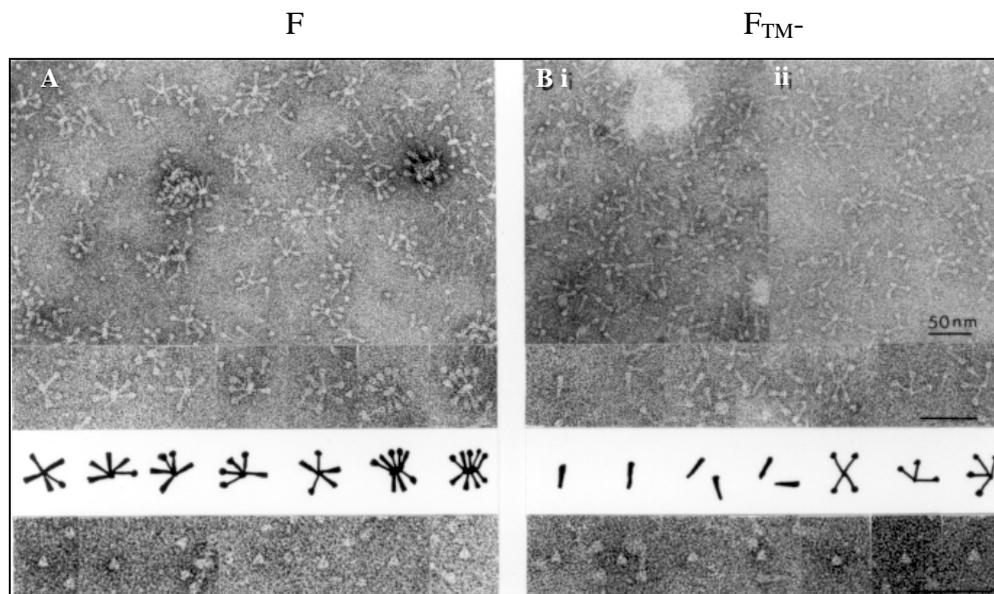


Figura IV.2.5: Microscopía electrónica de las proteínas F y F_{TM^-} . Las micrografías (tinción negativa) corresponden a las fracciones 6 (F) y 4 (F_{TM^-}) de los gradientes de sacarosa en ausencia de octilglucósido (Figura IV.2.4). A es la proteína F y B la proteína F_{TM^-} . Dentro de B, i) son proteínas mayoritariamente individuales y ii) proteínas individuales y rosetas. También se muestran imágenes de detalles de las micrografías, junto a diagramas con las estructuras de las proteínas presentes en dichos detalles. Por último, en la galería inferior, se muestran vistas superiores de las proteínas.

La proteína F formó rosetas (Figura IV.2.5 A) similares a las observadas con glicoproteínas de membrana de otros virus (Wrigley y col., 1986) y a las descritas para la proteína F de otros paramixovirus (Sheid y col., 1972; Hosaka y Shimizu, 1972). En las rosetas, las moléculas aparecieron como espículas con forma de cono o de varilla con cabeza globular. En ambas conformaciones la parte más ancha se proyectó hacia fuera desde el centro de la roseta. Alrededor del 70% de las moléculas presentaron forma de cono, mientras que el 30% restante adoptaron la conformación de varillas con cabeza globular. La longitud de los dos tipos de moléculas fue de 19 nm, desde el centro de las rosetas al extremo superior (considerando que el diámetro de una roseta fue de,

Resultados

aproximadamente, 38 nm). Si se descuenta la parte central de la roseta, la longitud de las espículas fue de $16,3 \pm 1,0$ nm. El diámetro de la cabeza fue de $6,6 \pm 0,7$ nm en ambas formas. Así, el tallo de la estructura sería de unos 10 nm. En la Figura IV.2.6 se muestra un esquema de las dos conformaciones.

La proteína F_{TM^-} presentó mayoritariamente una forma no agregada (90% de las moléculas), aunque también se pudo apreciar la presencia de alguna roseta de pequeño tamaño (Figura IV.2.5 B). Las moléculas individuales de F_{TM^-} presentaron una morfología similar a los conos de la proteína F, mientras que las moléculas que se encontraban formando rosetas adoptaron la forma de varillas con cabeza globular. Las dimensiones de las moléculas de la proteína F_{TM^-} fueron similares a las de la proteína F, incluida su longitud si se descuenta la región central de la roseta ($16,2 \pm 1,3$ nm).

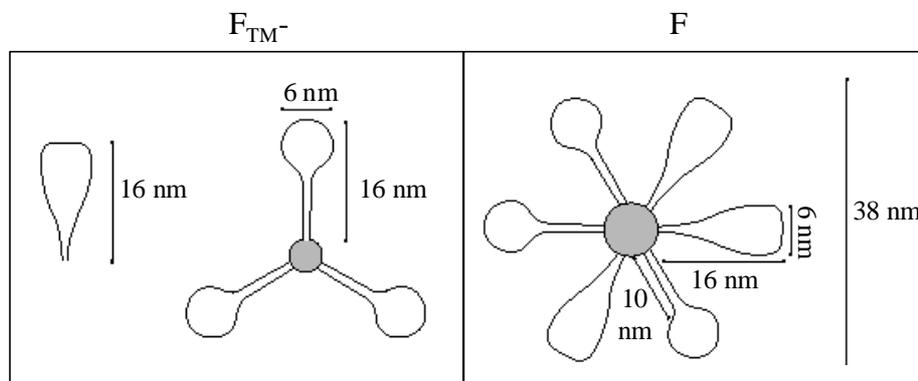


Figura IV.2.6: Esquema de las proteínas F_{TM^-} y F observadas al microscopio electrónico. Se indican las dimensiones calculadas a partir de las imágenes de microscopía electrónica de ambas proteínas en sus dos conformaciones.

Ambas proteínas parecieron formar trímeros, como se apreció por la estructura triangular de la vista superior de las proteínas (galería de imágenes inferior de la Figura IV.2.5).

Por tanto, las proteínas F y F_{TM^-} presentan una similitud morfológica importante cuando se observan al microscopio electrónico y parecen ser trímeros. De los resultados obtenidos en los experimentos de todo este apartado se puede concluir que ambas proteínas son estructuralmente similares y que, por tanto, las regiones transmembrana y citoplasmática no son necesarias para que la proteína F_{TM^-} adopte una conformación similar a la de la proteína F.

IV.3 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS PROTEÍNAS F Y F_{TM-} POR INMUNOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Con el fin de localizar en las estructuras de las proteínas F y F_{TM-} vistas al microscopio electrónico los epítomos reconocidos por un panel de AcMs anti-F, ambas proteínas se incubaron con AcMs correspondientes a diferentes regiones antigénicas. Este análisis fue además otra prueba de la similitud estructural de ambas proteínas, así como una comparación de la estructura antigénica de las dos formas de proteína F observadas al microscopio electrónico (conos y varillas con cabeza globular).

Se seleccionaron los AcMs 2F, 44F y 45F del área antigénica I; 47F y 13 de la II; 56F y 19 de la IV; 7957 de la V y 7916 de la VI. Todos ellos se han descrito previamente (García-Barreno y col., 1989; Örvell y col., 1987; Taylor y col., 1992; López y col., 1998). Los AcMs se purificaron en *batch* mediante unión a proteína A-Sepharosa, según se describe en Materiales y Métodos (apartado III.2.3.1).

El AcM 2F, que no reacciona con proteínas F con cambios en el residuo 389 de la cadena F1 (región antigénica I), se unió a la parte superior de la cabeza de las moléculas de proteína F (Figura IV.3.1). En algunos casos se pudieron apreciar moléculas de AcM 2F unidas a la cabeza de dos espículas distintas dentro de la misma roseta o de rosetas adyacentes. También se pudo observar la presencia de dos moléculas de AcM que se unen cada una a una sola espícula de dos rosetas adyacentes, dando lugar a complejos 2+2. El ángulo de unión entre la región Fab y el tallo de las espículas de proteína F fue siempre de 150°, independientemente de la orientación relativa entre las moléculas de antígeno y anticuerpo, como se ha observado en otros casos (Wrigley y col., 1983). En la proteína F_{TM-}, el AcM 2F también se unió en la cabeza de la espícula y su ángulo de unión fue de 145° (Figura IV.3.1). Este valor fue estadísticamente indistinguible del obtenido con la proteína completa, ya que el error absoluto de la medida fue de 5°. También se pudo apreciar la presencia de complejos 2+2, 3+3 e incluso mayores. Tanto en la proteína silvestre como en la mutante, el AcM se unió en igual forma a las moléculas con morfología de cono o de varilla con cabeza globular.

El AcM 47F, que no reacciona con proteínas mutantes con cambios en los residuos 262, 268, 272 y 275 (sitio antigénico II), se unió a las proteínas F y F_{TM-} en la base de la cabeza del trímero. Con la proteína completa el ángulo de unión fue de 85-90° y el AcM 47F apareció normalmente unido a dos espículas de la misma roseta y, cada una de las espículas, fue capaz de unir, al menos, dos fragmentos Fab (Figura IV.3.1). Cuando el AcM 47F se unió a la proteína F_{TM-} formó un ángulo de 85° y apareció una gran variedad de complejos, aunque no se pudieron apreciar los de tipo 2+2. Nuevamente no aparecieron diferencias apreciables en la unión del anticuerpo a las moléculas en forma de cono o de varilla con cabeza globular.

El AcM 56F, que no reacciona con mutantes en la posición 429 (sitio antigénico IV), se unió con un ángulo de 100° a la zona lateral de la cabeza de la espícula de la proteína F (Figura IV.3.1). Se pudieron apreciar anticuerpos uniendo espículas en una misma roseta o en rosetas adyacentes. El sitio y el ángulo de unión fueron, de nuevo, indistinguibles entre la proteína F_{TM-} (95°) y la proteína completa, así como entre las moléculas con forma de cono y de varilla con cabeza globular.

Resultados

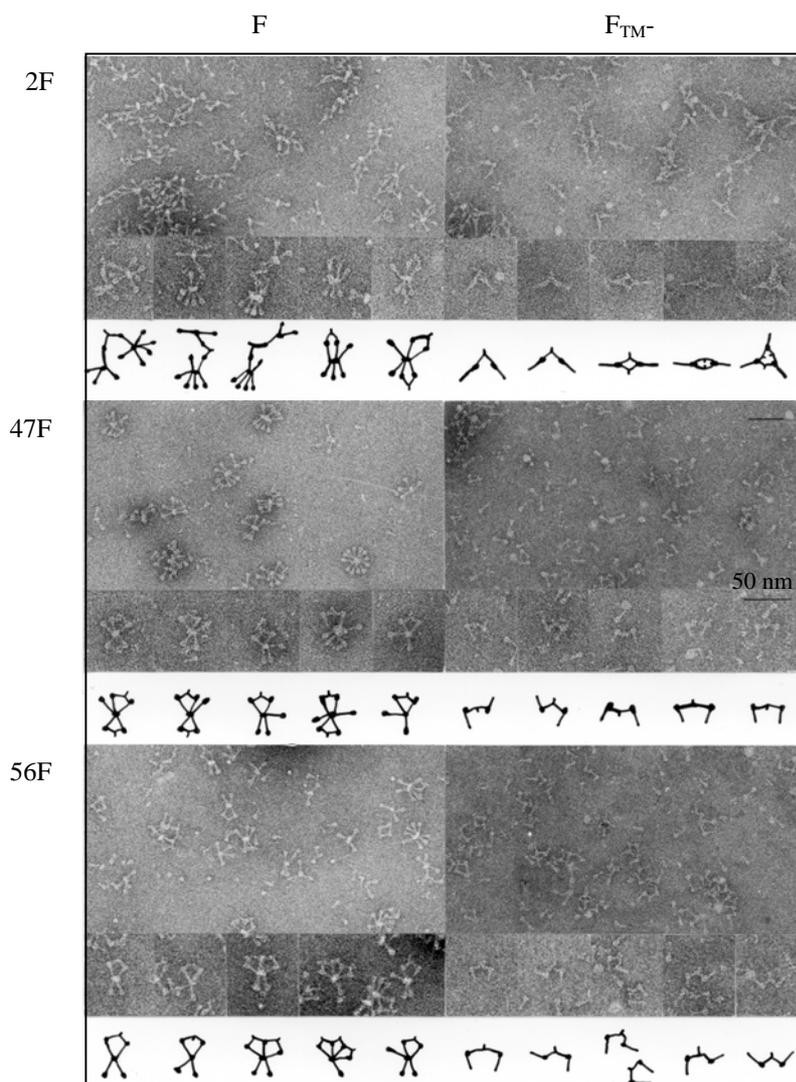


Figura IV.3.1: Inmunomicroscopía electrónica de las proteínas F y F_{TM-} con los AcMs 2F, 47F y 56F. De las micrografías se han seleccionado algunos detalles que se muestran en las galerías inferiores y se esquematizan debajo de cada grupo de imágenes.

También se analizaron otros AcMs pertenecientes a las regiones antigénicas I, II y IV en su interacción con la proteína F (Figura IV.3.2). Los AcMs 44F y 45F (sitio antigénico I) formaron estructuras como las del 2F, con un ángulo de unión de 150°. Su unión fue igual a las dos conformaciones de la proteína. El AcM 13 (sitio antigénico II) se unió con un ángulo de 90° a la base de la cabeza de las espículas, como el AcM 47F. Por último, el AcM 19 (sitio antigénico IV) se unió al lateral de la cabeza en la misma posición que lo hacía el AcM 56F y con un ángulo de 95° (indistinguible estadísticamente de los 100° medidos en el AcM 56F), en ambas conformaciones de la proteína.

Finalmente se estudió la unión a las proteínas F (Figura IV.3.2) y F_{TM-} (no mostrado) de dos AcMs cuyos epítomos se localizan muy cerca de la región IV en la estructura primaria de la proteína F. El AcM 7957 (región antigénica V), que no

Resultados

reconoce a mutantes de la proteína F con cambios en los residuos 432, 433 y 447, se unió al lateral de la cabeza globular de las moléculas con un ángulo de 110° (proteína F) y 115° (proteína F_{TM-}). El AcM 7916 (sitio antigénico VI), que no reacciona con los mutantes que tienen cambios en el aminoácido 436, se unió a las proteínas F y F_{TM-} también en el lateral de la cabeza, pero con un ángulo de 120° . Ambos AcMs se unieron de igual modo a las moléculas con forma de cono o de varilla con cabeza globular.

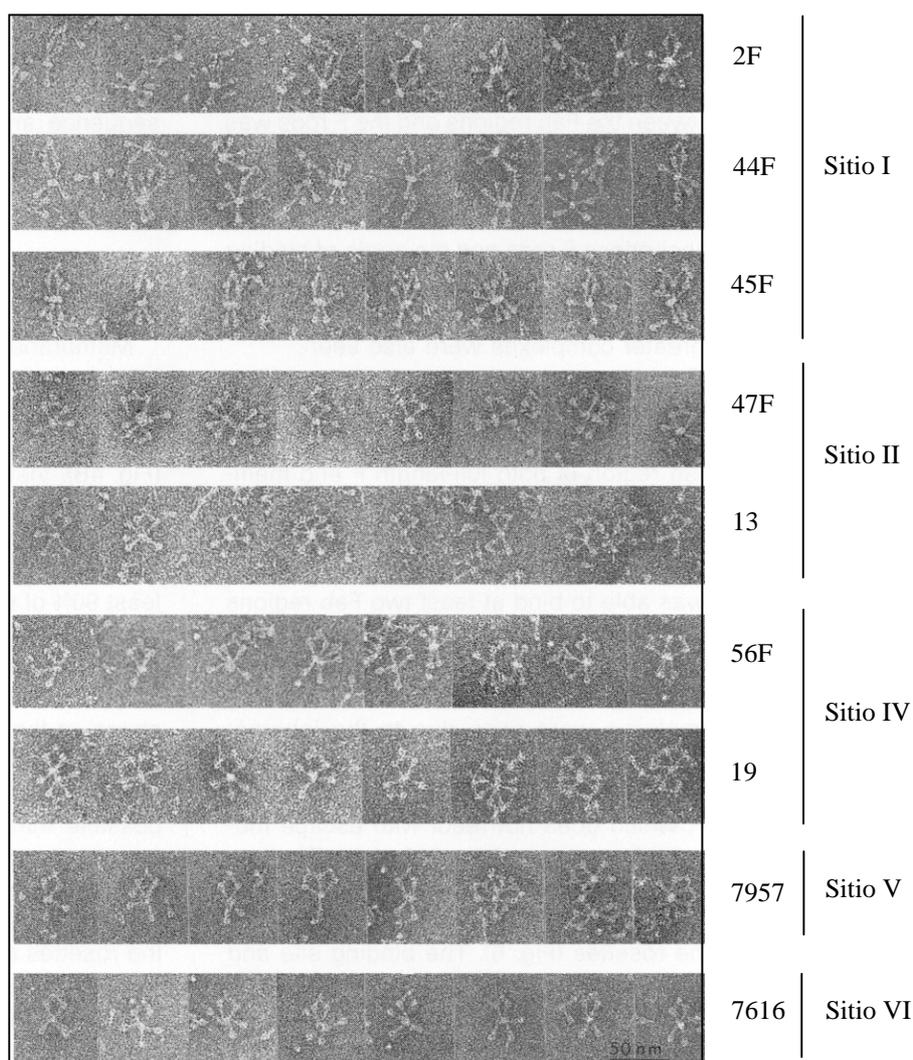


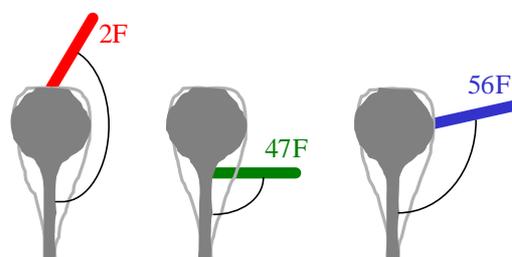
Figura IV.3.2: Inmunomicroscopía electrónica de los complejos AcM-proteína F. Se muestran detalles de imágenes de microscopía electrónica de todos los complejos AcM-F analizados.

Estos resultados, resumidos en la Figura IV.3.3, están de acuerdo con la clasificación de anticuerpos basada en su reactividad con distintas proteínas mutantes (Arbiza y col., 1992; López y col., 1998), ya que los AcMs de una misma región antigénica se unen de igual forma a las proteínas F y F_{TM-} y son distinguibles de los AcMs de otras regiones antigénicas. Además, concuerdan con los resultados del análisis

Resultados

de secuencia, según los cuales los sitios antigénicos IV, V y VI están localizados muy próximos en la proteína pero presentan propiedades distintas.

Estos datos también refuerzan las conclusiones del apartado IV.2 sobre la similitud estructural entre las proteínas F y F_{TM^-} .



Sitio antigénico	AcM	Ángulo en la F	Ángulo en la F_{TM^-}
I	2F	150°	145°
	44F	150°	
	45F	150°	
II	47F	90°	85°
	13	85-90°	
IV	56F	100°	95°
	19	95°	
V	7957	110°	115°
VI	7916	120°	120°

Figura IV.3.3: Unión de AcMs a las proteínas F y F_{TM^-} . En la parte superior de la figura se esquematizan los sitios de unión de los distintos AcMs. En negro se señala el ángulo que forma la región Fab del AcM con el tallo de la espícula. En la tabla inferior se indican los ángulos que formaron los fragmentos Fab de los anticuerpos con el tallo de las espículas de las proteínas F y F_{TM^-} . El error absoluto en la medición de estos ángulos fue de 5°.

IV.4 PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO DE LAS PROTEÍNAS F Y F_{TM^-} . DESCRIPCIÓN DE UN NUEVO SITIO DE PROCESAMIENTO

La proteína F durante su maduración se procesa proteolíticamente dando lugar a dos cadenas (F1 y F2) que se mantienen unidas covalentemente mediante, al menos, un puente disulfuro. Hasta el momento estaba descrito que el procesamiento tenía lugar en la región polibásica anterior al extremo amino terminal de la cadena F1 (ver Figura

Resultados

IV.4.1 A). Los experimentos que se detallan a continuación indican un procesamiento más complejo, incluyendo un segundo sitio de corte.

IV.4.1 CARACTERIZACIÓN DE ESTADIOS INTERMEDIOS DE PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA F_{TM}⁻

Cuando la proteína F_{TM}⁻ purificada se analizó por SDS-PAGE en condiciones reductoras y posterior *western blot* con un suero contra un péptido sintético de la cadena F1 (α F1₂₅₅₋₂₇₅) se detectaron tres bandas: α , β y γ (Figura IV.4.1 B). El suero α F2₁₀₄₋₁₁₇, dirigido contra un péptido de la secuencia de la cadena F2 (ver Figura IV.4.1 A) sólo reconoció las bandas α y β , por lo que dichas bandas deberían contener, además de la cadena F1, o al menos parte de ella, regiones de la cadena F2. Cuando se realizó el *western blot* en condiciones no reductoras aparecieron dos bandas reconocidas por el suero anti-F1, de las cuales sólo la de menor movilidad electroforética fue reconocida por el suero anti-F2 (Figura IV.4.1 B).

Para caracterizar los polipéptidos presentes en las preparaciones de proteína F_{TM}⁻ se abordó la secuenciación del extremo N-terminal de cada una de las bandas y se analizaron sus péptidos trípticos mediante espectrometría de masas. De la banda α no se obtuvo ninguna secuencia reconocible, probablemente porque el extremo N-terminal esté bloqueado. El análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF de sus péptidos trípticos indicó que la banda α contenía secuencias de las cadenas F1 y F2 (Figura IV.4.2 A), de acuerdo con su reactividad con los sueros α F1₂₅₅₋₂₇₅ y α F2₁₀₄₋₁₁₇. El péptido señal de la cadena F2 no se detectó en el análisis. Así, la banda α se identificó como el precursor F0 no procesado de la proteína F_{TM}⁻ (ver Figura IV.4.1 A).

Los primeros ocho ciclos de la degradación de Edman de la banda β proporcionaron la secuencia: ELPRFMNY (Figura IV.4.3 A). Esta secuencia es la correspondiente a los residuos 110-117 de la proteína F. La espectrometría de masas de los péptidos trípticos de la banda β (Figura IV.4.2 B) indicó que contenía la cadena F1 y la región C-terminal de la cadena F2, lo que estaba de acuerdo con su reactividad con los sueros α F1₂₅₅₋₂₇₅ y α F2₁₀₄₋₁₁₇ (Figura IV.4.1 B). De este modo la banda β se identificó como un polipéptido que comienza en el residuo 110 y termina en el extremo C-terminal de la cadena F1 de la proteína F_{TM}⁻ y se denominó F _{Δ 1-109} (ver Figura IV.4.1 A).

Por último, los primeros seis ciclos de la degradación de Edman del extremo N-terminal de la banda γ (Figura IV.4.3 B) generaron la secuencia FLGFL, que corresponde a los primeros residuos del péptido de fusión con el que empieza la cadena F1, tras el corte en el residuo 136. Su identidad también se confirmó mediante espectrometría de masas de sus péptidos trípticos (Figura IV.4.2 C).

Por tanto, estos resultados indican que el precursor de la proteína F_{TM}⁻ se corta en dos sitios: el sitio I, después del residuo 109, y el sitio II, después del residuo 136. Ambos sitios están precedidos por regiones polibásicas reconocidas por proteasas del tipo furina como se indica en la Figura IV.4.1 A, es decir: R-X-K/R-R (Hosaka y col., 1991; Watanabe y col., 1993).

Resultados

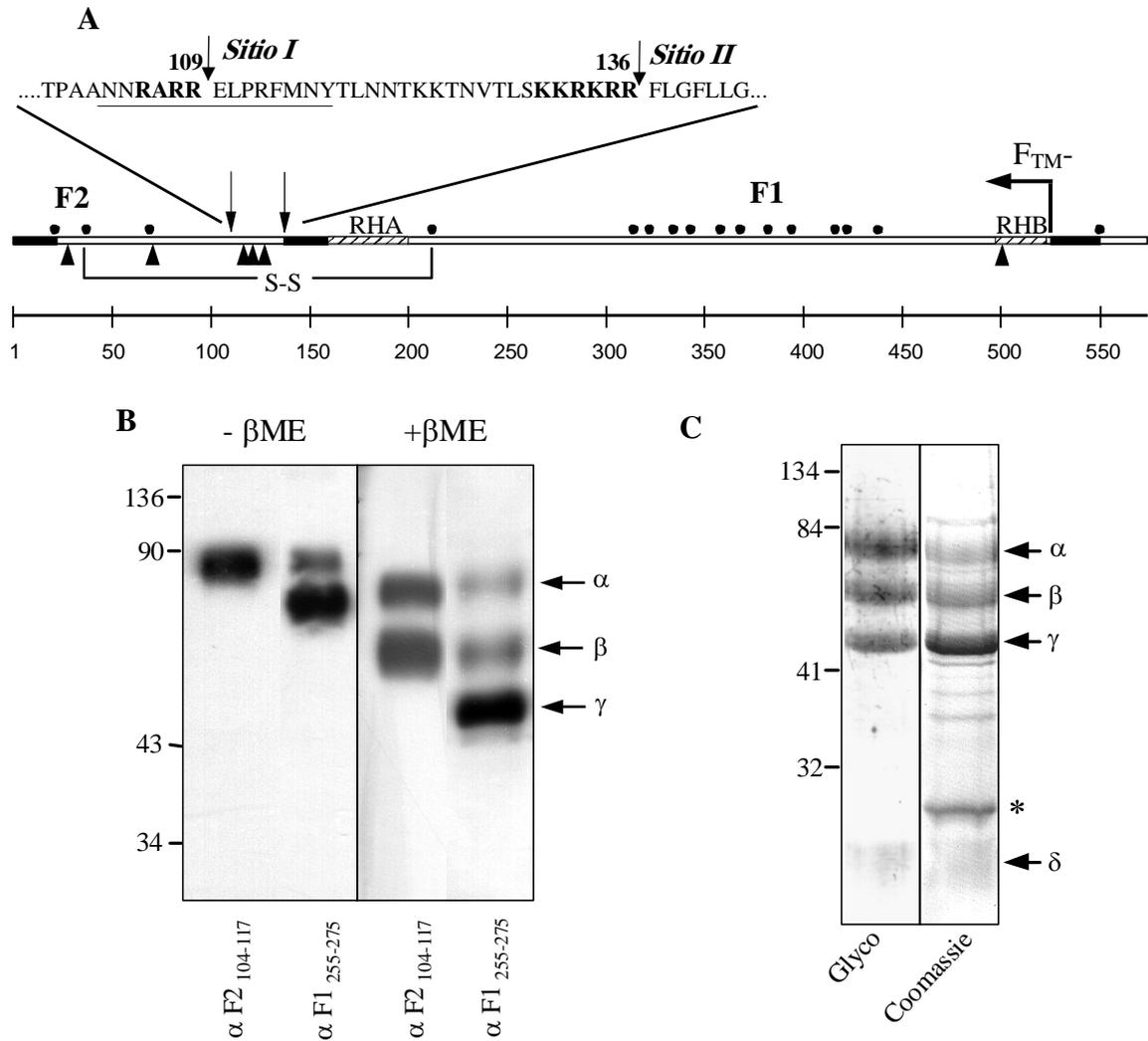
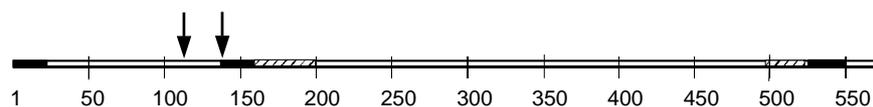
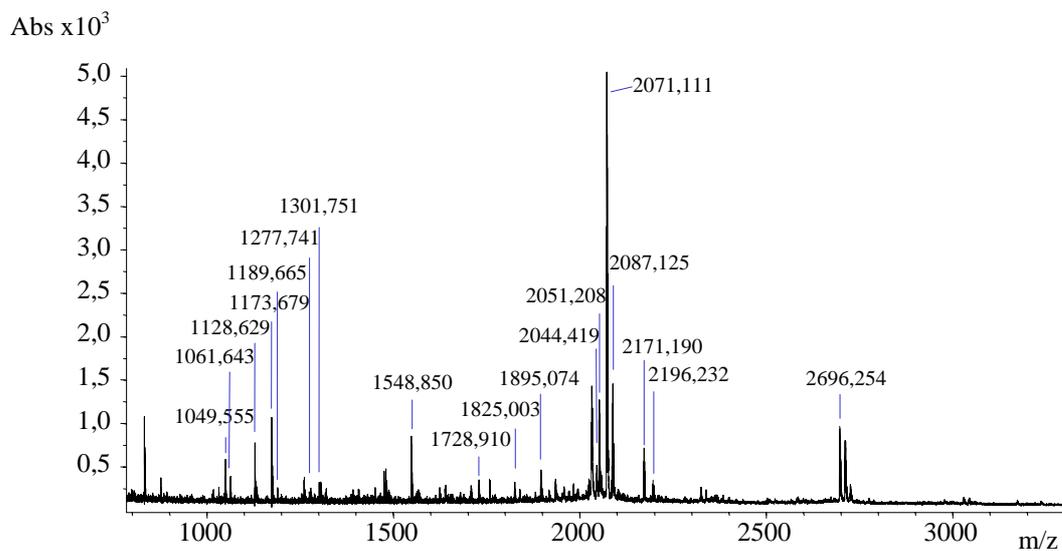


Figura IV.4.1: Análisis de la proteína F_{TM}⁻ purificada. A: Estructura primaria de la proteína F. Se representan los sitios de procesamiento proteolítico I y II entre las cadenas F2 y F1, así como otras regiones relevantes de la proteína. Los círculos negros representan residuos de Cys, los triángulos negros son sitios potenciales de N-glicosilación, las zonas rayadas son las dos regiones heptádicas (RHA y RHB) de la cadena F1 y los rectángulos negros son las regiones hidrofóbicas de la proteína. La secuencia del péptido 104-117 se muestra subrayada. También se indica el extremo C-terminal de la proteína F_{TM}⁻. **B: Western blot con los sueros αF2₁₀₄₋₁₁₇ y αF1₂₅₅₋₂₇₅ en condiciones no reductoras y reductoras de la proteína F_{TM}⁻.** El gel fue del 10% de acrilamida. **C: SDS-PAGE de la proteína F_{TM}⁻.** El gel del 12% de acrilamida se tiñó con un colorante específico de glicoproteínas (Gel Code Glycoprotein Stain) o con Azul de Coomassie. En la figura se señalan varias bandas cuya identidad se explica en el texto. La banda marcada con un asterisco fue un contaminante de la preparación de proteína F_{TM}⁻, la Apolipoproteína I bovina, identificado por secuenciación de su extremo N-terminal.

Resultados

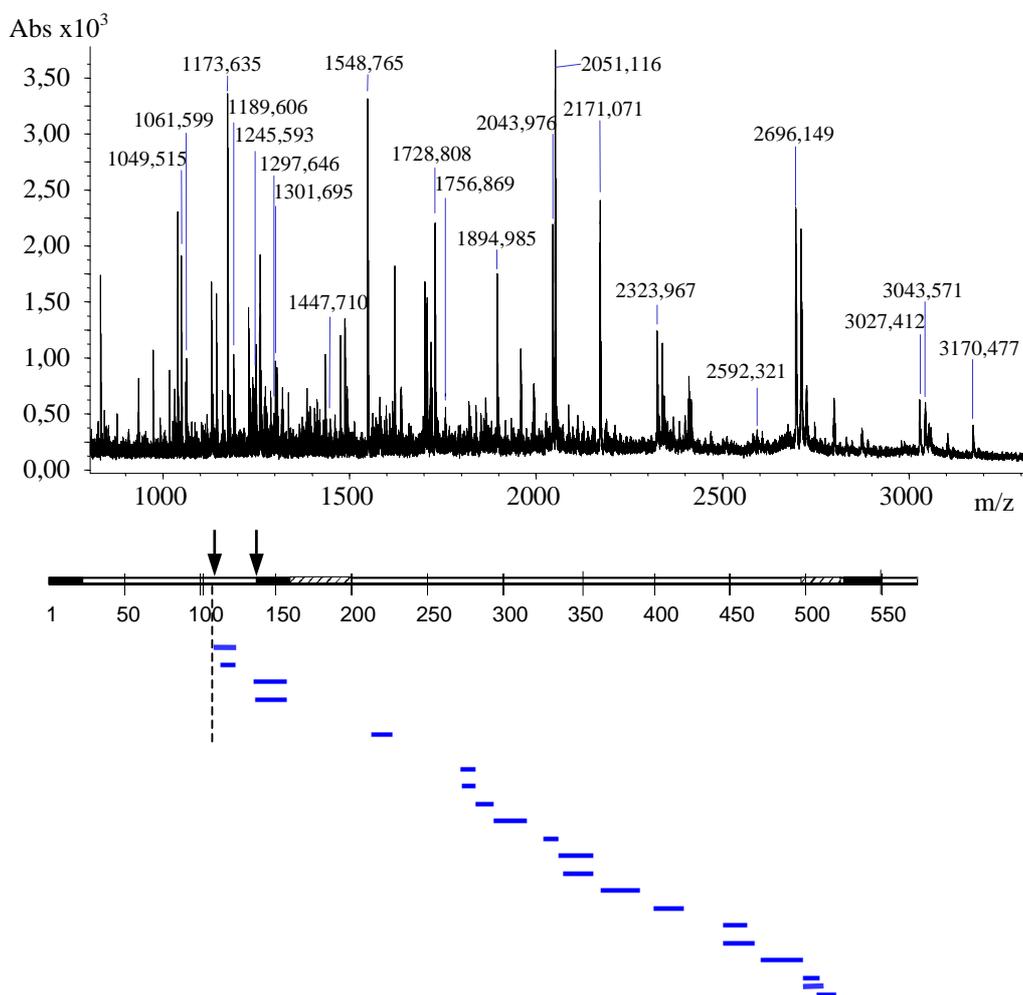
A



Pico	Péptido	Error	Pico	Péptido	Error
1825,003	T(50-65)K	-0,04	1173,679	K(273-282)R	-0,04
2196,232	T(50-68)K	-0,08	1049,555	E(328-336)R	-0,06
1277,741	L(78-87)K	-0,00	2696,254	T(337-359)K	-0,11
2071,111	N(88-106)R	-0,06	2044,097	T(400-419)K	-0,08
2051,208	R(136-156)K	-0,05	1728,910	G(446-465)K	-0,04
1895,074	F(137-156)K	-0,03	2171,190	G(446-465)K	-0,10
1548,850	I(214-226)K	-0,03	1061,643	I(499-507)R	-0,04
1128,625	N(227-235)R	+0,01	1189,663	I(499-508)K	+0,04
1301,751	K(272-282)R	-0,02			

Resultados

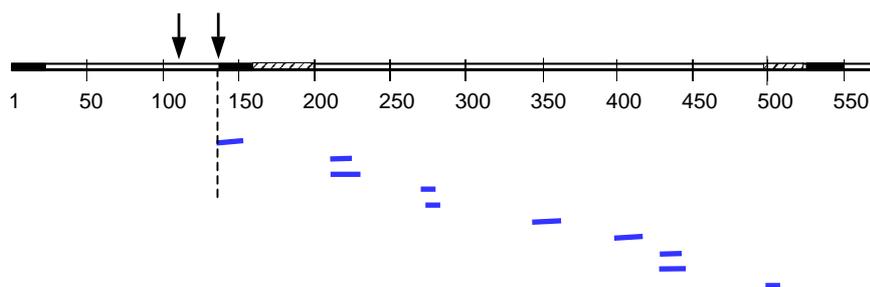
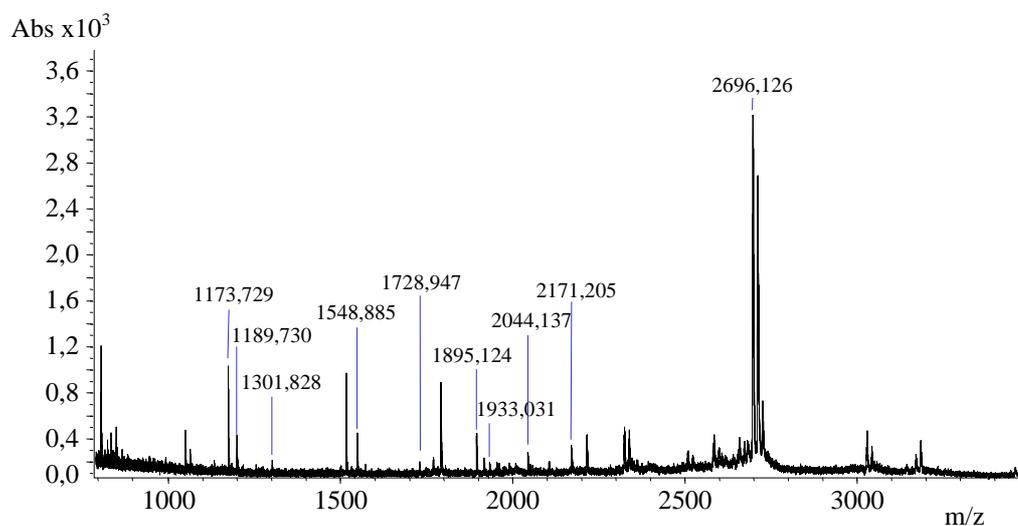
B



Pico	Péptido	Error	Pico	Péptido	Error
1756,869	E(110-123)K	-0,07	2323,967	G(340-359)K	+0,00
1245,593	F(114-123)K	-0,01	3027,412	V(365-390)K	+0,01
2051,116	R(136-156)K	+0,04	3043,571	V(365-390)K	-0,08
1894,985	F(137-156)K	+0,07	2043,976	T(400-419)K	+0,04
1548,765	I(214-226)K	+0,06	1728,808	G(446-461)K	+0,07
1301,695	K(272-282)R	-0,03	2171,071	G(446-461)K	+0,02
1173,635	L(273-282)R	-0,00	3170,477	G(471-498)K	+0,04
1297,647	Q(283-293)K	+0,03	1061,599	I(499-507)R	-0,06
2592,321	E(294-315)K	+0,01	1189,606	I(499-508)K	+0,09
1049,515	E(328-336)K	-0,02	1447,710	K(508-520)K	+0,05
2696,149	T(337-359)K	-0,01			

Resultados

C



Pico	Péptido	Error	Pico	Péptido	Error
1895,124	F(137-156)K	-0,07	2696,126	T(337-359)K	+0,02
1548,885	I(214-226)K	-0,07	2044,137	T(400-419)K	-0,12
1933,031	I(214-229)R	-0,02	1728,947	G(446-461)K	-0,07
1301,828	K(272-282)R	-0,10	2171,205	G(446-465)K	-0,11
1173,743	L(273-282)R	-0,11	1189,730	I(499-508)K	-0,03

Resultados

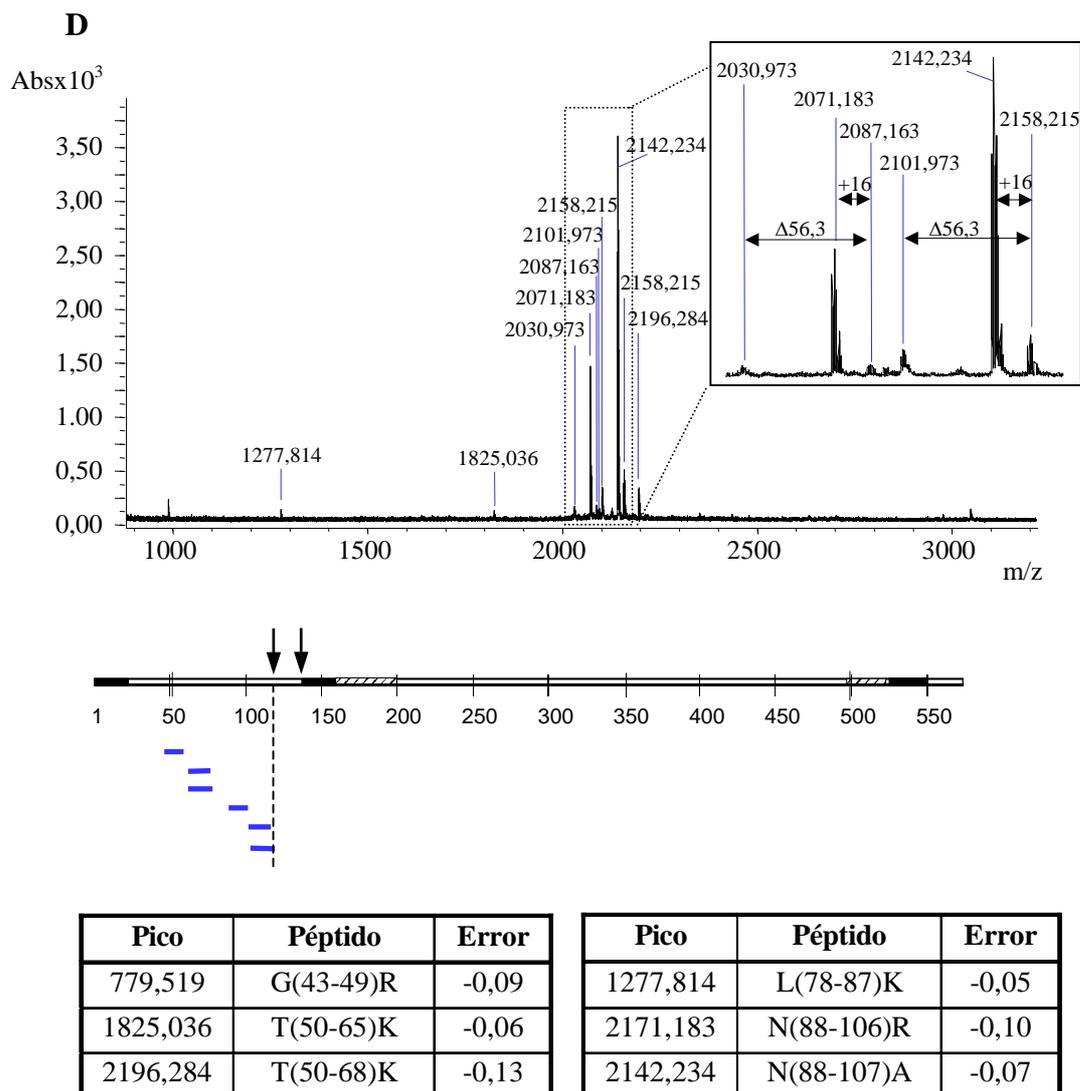


Figura IV.4.2: Espectrometría de masas de los péptidos trípticos de las bandas α , β , γ y δ . Se muestran los espectros de masas de los péptidos trípticos de las bandas α (parte A), β (parte B), γ (parte C) y δ (parte D) señaladas en la Figura IV.4.1 C. En la parte inferior de los espectros se representa la estructura primaria de la proteína F, indicándose los péptidos que se han podido detectar. Por último se muestran los picos del espectro a los que se ha asignado un péptido de la proteína F_{TM}⁻, el péptido al que se asignan y el error en la asignación. En la parte D se muestra ampliada la parte del espectro de los picos 2071,183 y 2142,234, que comprenden a los péptidos con las Met oxidadas (+16 m/z) y los productos metaestables de degradación ($\Delta 56,3$ m/z).

Resultados

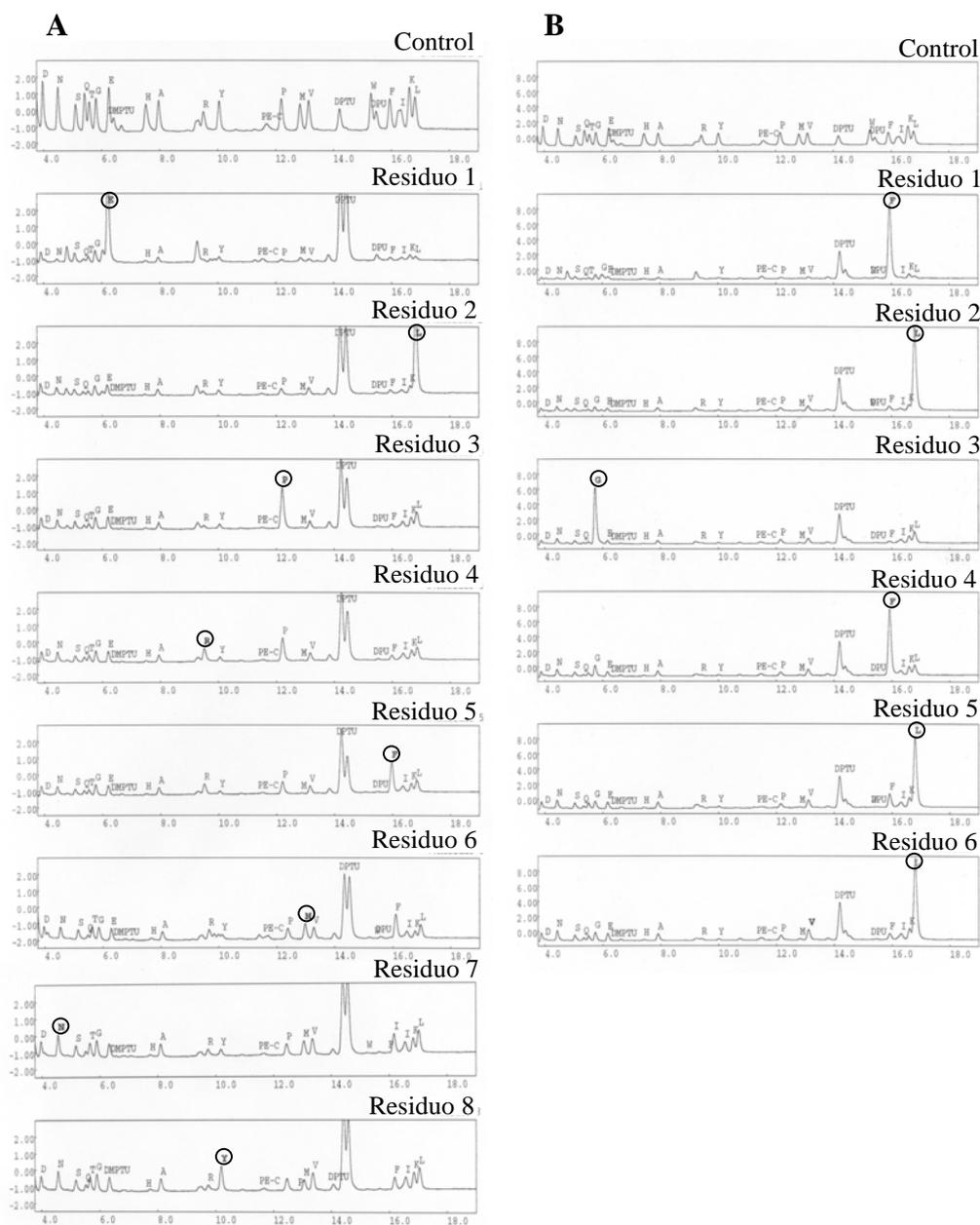


Figura IV.4.3: Secuencia N-terminal de las bandas β y γ . Se representan los cromatogramas de los productos obtenidos en cada ciclo de degradación de Edman de las bandas β (parte A) y γ (parte B) indicadas en la Figura IV.4.1 C. En el eje de ordenadas aparece la absorbancia medida a 269 nm y en el de abscisas el tiempo de retención en la columna en min. El residuo relevante de cada ciclo se muestra enmarcado en un círculo.

En la Figura IV.4.1 C se detectó una cuarta banda, δ , que se tiñó como una banda difusa con Azul de Coomassie y con colorante específico de glicoproteínas (Gel Code Glycoprotein Stain). No fue posible determinar su secuencia N-terminal, probablemente, como en el caso del fragmento F0, por encontrarse bloqueado. La espectrometría de masas de los péptidos trípticos de este polipéptido indicó que correspondía a la cadena F2 (Figura IV.4.2 D). No se detectaron los péptidos correspondientes a la región localizada entre los sitios de procesamiento I y II descritos

Resultados

anteriormente, mientras que los péptidos anteriores al residuo 109 se detectaron claramente. Entre los péptidos encontrados, el N88-A107 probablemente no se generó por el tratamiento *in vitro* de la banda F2 con tripsina, ya que no presentó un aminoácido básico en su extremo C-terminal, lo cual implicaría que se debió generar durante el procesamiento *in vivo* de la proteína F_{TM-}. La ausencia de otras bandas de menor movilidad electroforética asignables a la cadena F2 sugiere que la cantidad de proteína procesada sólo en el sitio II es pequeña o inexistente. Además, cabe señalar que el suero α F2₁₀₄₋₁₁₇ parece reconocer sólo los residuos del 110 al 117 y no del 104 al 109, ya que no reaccionó con la cadena F2 en *western blot*.

La Figura IV.4.1 B muestra el resultado de un *western blot* de la proteína F_{TM-} sin reducir. El suero α F1₂₅₅₋₂₇₅ reconoció dos bandas, de las cuales sólo la superior reaccionó con el suero α F2₁₀₄₋₁₁₇. La banda superior, probablemente, corresponde a la proteína F_{TM-} en la que no se ha producido ningún procesamiento proteolítico o se ha producido solamente un corte. La banda inferior es la correspondiente a moléculas de proteína F_{TM-} que han experimentado cortes en los sitios I y II y han perdido la región localizada entre ambos.

Todos estos resultados sugieren que la proteína F_{TM-}, en su estado maduro, contiene una cadena F2 cuyo extremo C-terminal precede al sitio de procesamiento I.

La proteína F_{TM-} totalmente procesada y los polipéptidos no totalmente procesados (F _{Δ 1-109}, F0) están, probablemente, glicosilados, ya que se tiñen con colorante específico de glicoproteínas, como se puede apreciar en la Figura IV.4.1 C. La proteína F_{TM-} se digirió con N-glicosidasa F para confirmar su glicosilación y obtener información acerca de las cadenas de azúcares unidas a la proteína. Para determinar la cantidad mínima de enzima necesaria para eliminar totalmente las cadenas de azúcares se realizó un ensayo de dosis. Según se aprecia en la Figura IV.4.4 A, las tres bandas que aparecieron en la proteína F_{TM-} sin digerir (F0, F _{Δ 1-109} y F1) cambiaron de movilidad electroforética tras su deglicosilación con 220 mU de N-glicosidasa F, apareciendo tres bandas nuevas (F0', F _{Δ 1-109'} y F1'). Cuando la digestión se realizó con 400 mU de enzima, las bandas producto de la deglicosilación fueron las mismas que con 220 mU, indicando que la digestión con 220 mU de N-glicosidasa F fue suficiente para obtener la digestión máxima de las cadenas de azúcares.

La proteína digerida y sin digerir con N-glicosidasa F (220 mU) se analizó por *western blot* con los sueros α F1₂₅₅₋₂₇₅ y α F2₁₀₄₋₁₁₇ (Figura IV.4.4 B). Después de la digestión aparecieron tres bandas que reaccionaron con el suero del péptido de la cadena F1 en condiciones reductoras (F0', F _{Δ 1-109'} y F1'). De las tres bandas, sólo las dos de menor movilidad electroforética (F0' y F _{Δ 1-109'}) reaccionaron con el suero α F2₁₀₄₋₁₁₇. De este modo, la banda F1' se identificó como la cadena F1 deglicosilada, la banda F _{Δ 1-109'} como el polipéptido F _{Δ 1-109} sin cadenas de azúcares y la banda F0' como la proteína F0 deglicosilada.

El aumento de movilidad de la banda F1 tras la deglicosilación corresponde con un cambio de 5-6 kDa en la masa molecular de la proteína, lo que sugiere que el único sitio de N-glicosilación que existe en la cadena F1 está siendo usado. En cambio, la banda del polipéptido F _{Δ 1-109} experimentó un cambio de movilidad bastante más acusado tras su deglicosilación (correspondiente a 15-16 kDa de masa molecular), lo que sugiere que se estén usando más sitios de N-glicosilación, además del que existe en la cadena F1 (en la región 110-136 existen tres sitios potenciales de N-glicosilación,

Resultados

como se aprecia en la Figura IV.4.1 A). El aumento de la movilidad electroforética de la forma F0 tras el tratamiento enzimático correspondería a un cambio de masa molecular de 19-20 kDa, lo que sugiere la utilización añadida de otro(s) sitio(s) potencial(es) de N-glicosilación, además de los existentes en la forma $F_{\Delta 1-109}$ (en la región 1-109 existen dos sitios potenciales de glicosilación según se indica en la Figura IV.4.1 A).

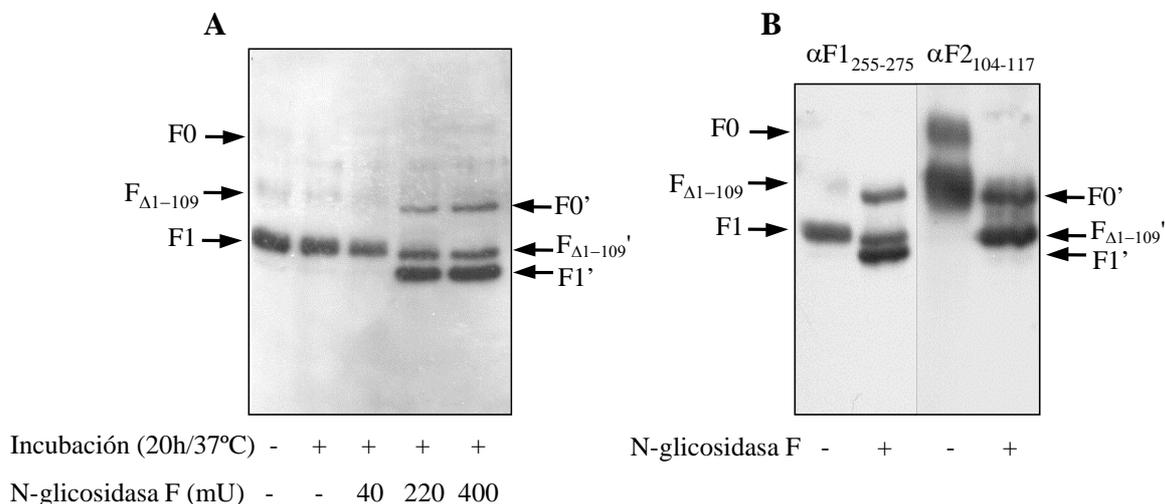


Figura IV.4.4: Digestión de la proteína F_{TM-} con N-glicosidasa F. A: Ensayo de dosis. La proteína F_{TM-} purificada ($\approx 1 \mu\text{g}$) se trató con dosis crecientes de enzima (de 40 a 400 mU) en 20 μl de PBS, 0,1% SDS, 0,5% octilglucósido; durante 20 h a 37°C, como se describe en Materiales y Métodos (apartado III.2.4.9). Los productos de digestión se analizaron por SDS-PAGE (gel del 10% de acrilamida) y *western blot* posterior con el AcM 47F. **B: Western blot de la proteína F_{TM-} digerida con N-glicosidasa F.** La proteína se digirió (o no) con 220 mU de N-glicosidasa F según A. El resultado de la digestión se analizó mediante SDS-PAGE en un gel del 10% de acrilamida y posterior *western blot* con los sueros $\alpha F1_{255-275}$ ó $\alpha F2_{104-117}$.

La cadena F2 deglicosilada tampoco fue reconocida por el suero $\alpha F2_{104-117}$ en *western blot*, lo que sugiere que la ausencia de reconocimiento de esta cadena por los anticuerpos no se debe a un impedimento estérico de las cadenas de azúcares.

Estos resultados sugieren que las tres bandas de la proteína descritas en *western blot* con el suero $\alpha F1_{255-275}$ (la cadena F1, la forma procesada en el sitio I que da lugar a la banda $F_{\Delta 1-109}$ y la forma no procesada F0) se encuentran N-glicosiladas y que las formas parcialmente procesadas están N-glicosiladas en la región correspondiente a la cadena F2.

IV.4.2 PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO DE LA PROTEÍNA F

Para comprobar si, al igual que en el caso de la proteína F_{TM-} , el polipéptido $F_{\Delta 1-109}$ estaba presente también en las preparaciones de proteína F, proteína F purificada a partir de extractos de células HEP-2 infectadas con VRBF o VRSH (cepa Long) o viriones purificados del VRSH, se analizaron por *western blot* con los sueros $\alpha F1_{255-275}$

Resultados

ó $\alpha F_{2104-117}$ (Figura IV.4.5). El suero $\alpha F_{1255-275}$ (parte A) reconoció la banda correspondiente a la cadena F1. En las preparaciones que contenían la proteína completa la banda F1 migró menos que la de la proteína F_{TM^-} (que carece de los 50 últimos aminoácidos). El suero $\alpha F_{2104-117}$ reaccionó con una banda que corresponde al polipéptido $F_{\Delta 1-109}$ en todas las preparaciones que contenían la proteína F (Figura IV.4.5 B). En la parte B de la figura las cantidades de proteína se ajustaron para que la banda $F_{\Delta 1-109}$ tuviese la misma intensidad en todas las calles del gel. Las cantidades de proteína en la parte B respecto a las de la parte A fueron: virus purificado 10:1, F(VRSH) 2:1, F(VRBF) 1:1 y F_{TM^-} (VRBF $_{TM^-}$) 1:1,5. Así, las formas F0 y $F_{\Delta 1-109}$ fueron menos abundantes en las preparaciones de virus purificado o de la proteína F purificada a partir de células infectadas con el VRSH, que en las que provenían de células HEp-2 infectadas con VRBF.

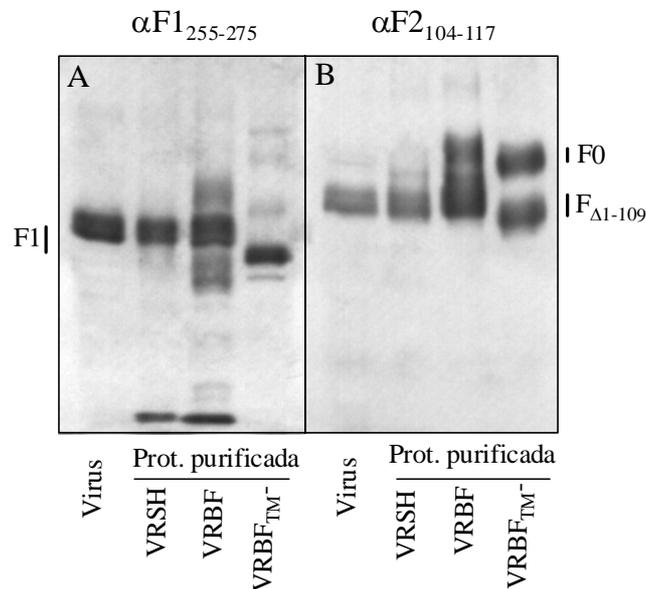


Figura IV.4.5: Western blot de preparaciones de proteína F y F_{TM^-} . VRSH purificado, proteína F purificada a partir de extractos de células HEp-2 infectadas con VRSH o VRBF y proteína F_{TM^-} purificada a partir de sobrenadante de células HEp-2 infectadas con VRBF $_{TM^-}$, se ensayaron por western blot con los sueros $\alpha F_{1255-275}$ (A) o $\alpha F_{2104-117}$ (B). La cantidad de proteína de la parte A se ajustó en cada calle para dar intensidades similares de la banda F1. En la parte B las cantidades de proteína cargadas respecto a la parte A fueron: virus purificado 10:1, F(VRSH) 2:1, F(VRBF) 1:1 y F_{TM^-} (VRBF $_{TM^-}$) 1:1,5.

Está descrito que el procesamiento de la proteína F es menos eficiente en células infectadas con VRBF que con VRSH (Wertz y col., 1987), lo que podría favorecer la acumulación del polipéptido $F_{\Delta 1-109}$ en las preparaciones de proteína obtenidas a partir de extractos de células infectadas con recombinantes del virus vaccinia. En las preparaciones de proteína F_{TM^-} se encontró mayor abundancia de formas parcialmente procesadas que en las preparaciones de proteína F debido, probablemente, al diferente camino exocítico de la proteína F_{TM^-} . En ensayos realizados con un mutante de la proteína de fusión del virus de la parainfluenza humana de tipo 2 (VPIH-2), en el que se han eliminado las regiones transmembrana y citoplasmática

Resultados

(equivalente a la proteína F_{TM^-}), el porcentaje de la forma no procesada del mutante de la proteína de fusión también es mayor que el que aparece en la proteína completa (Tong y Compans, 2000).

Estos experimentos demuestran que el procesamiento en el sitio I no es exclusivo de la proteína F_{TM^-} , sino que también se produce en la proteína F.

Para comprobar que la cadena F2 de la proteína F, al igual que la de la proteína F_{TM^-} , tenía su extremo C-terminal precediendo al sitio de corte I, se comparó el tamaño de las cadenas F2 de las dos proteínas. Para ello se analizaron las proteínas mediante SDS-PAGE y tinción posterior con colorante específico de azúcares (Gel Code Glycoprotein Stain). Como se aprecia en la Figura IV.4.6 ambas cadenas F2 migraron como una banda ancha de la misma movilidad electroforética.

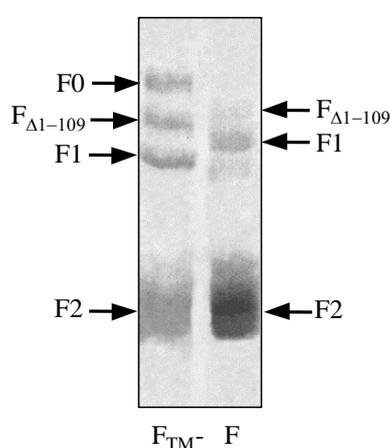


Figura IV.4.6: Comparación del tamaño de las cadenas F2 de las proteínas F_{TM^-} y F. Las dos proteínas, purificadas a partir de células HEp-2 infectadas con virus vaccinia recombinantes, se analizaron por SDS-PAGE (gel del 12% de acrilamida). El gel se tiñó con colorante específico de glicoproteínas (Gel Code Glycoprotein Stain).

IV.4.3 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS F Y F_{TM^-} CON CAMBIOS EN LOS SITIOS DE PROCESAMIENTO I Y II

Para determinar si el procesamiento proteolítico del polipéptido F0 en el sitio I se requiere para el corte en el sitio II y viceversa, se prepararon mutantes en los dos sitios. Las alteraciones en las proteínas F y F_{TM^-} en el sitio I fueron: R108N, R109N y R108N/R109N (Figura IV.4.1 A). A la proteína F_{TM^-} se le introdujo la mutación $\Delta 131-134$ (ver Figura IV.4.1 A) para obtener una proteína que no se cortase en el sitio II. De todos estos mutantes se construyeron virus vaccinia recombinantes como se describe en el apartado III.2.1.5 de Materiales y Métodos.

IV.4.3.1 Caracterización de mutantes de la proteína F_{TM^-} en el sitio de procesamiento I

Células HEp-2 se infectaron con los virus vaccinia recombinantes $VRBF_{TM^-}$, $VRBF_{TM^-}$ -R108N, $VRBF_{TM^-}$ -R109N y $VRBF_{TM^-}$ -R108N/R109N, y se marcaron metabólicamente con ^{35}S -Met. Las proteínas se inmunoprecipitaron del sobrenadante de las células con una mezcla de AcMs que reconocen epítomos localizados en la cadena F1. Como se puede ver en la Figura IV.4.7 A, mientras las formas F0, $F_{\Delta 1-109}$ y F1

Resultados

estaban presentes en la proteína F_{TM^-} , la forma $F_{\Delta 1-109}$ estuvo ausente en los tres mutantes. Además, en la proteína F_{TM^-} apareció una banda difusa correspondiente a la cadena F2. Esta misma banda estaba muy disminuida en los mutantes simples (R108N y R109N) y fue indetectable en el doble mutante. Además, en los mutantes apareció una banda difusa de menor movilidad electroforética que la cadena F2 y que probablemente corresponde a una cadena F2 que tenga el segmento entre los sitios de corte I y II, denominada F2*. Cuando el marcaje de las células infectadas con los distintos virus recombinantes se realizó con 3H -Glucosamina y se inmunoprecipitó el sobrenadante de las mismas (Figura IV.4.7 B), tampoco se pudo detectar la banda $F_{\Delta 1-109}$ en ninguno de los tres mutantes. La banda F2 también estuvo disminuida en los mutantes simples respecto a la proteína F_{TM^-} y fue indetectable en el mutante doble (R108N/R109N). Con el marcaje de azúcares la banda F2* fue más evidente en los tres mutantes, especialmente en el doble.

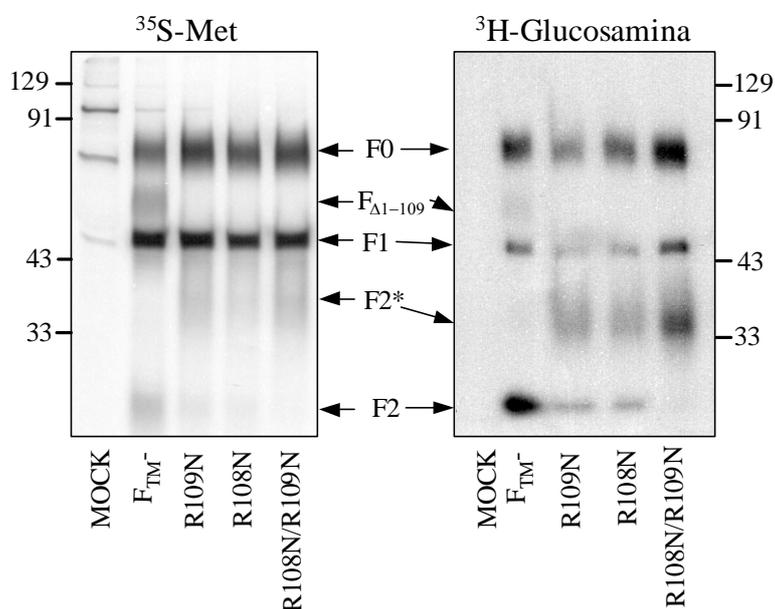


Figura IV.4.7: Análisis de las proteínas F_{TM^-} mutantes en el sitio de procesamiento I. Células HEp-2 se infectaron con los virus vaccinia recombinantes (5 upf/célula) que expresan la proteína F_{TM^-} o la proteína F_{TM^-} con las mutaciones R108N, R109N ó R108N/R109N. Las células se marcaron metabólicamente con ^{35}S -Met (100 μ Ci/ml) (parte A) ó 3H -Glucosamina (100 μ Ci/ml) (parte B) durante 24 h, empezando 4 h después de la infección. Los sobrenadantes se inmunoprecipitaron con una mezcla de AcMs contra la cadena F1. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE (gel del 12% de acrilamida) y se visualizaron por autorradiografía.

Por tanto, los resultados anteriores demuestran que mutaciones en el sitio I que alteraron la secuencia de reconocimiento por furina inhibieron el procesamiento proteolítico después del residuo 109 en la proteína F_{TM^-} . Sin embargo, la inhibición del procesamiento en el sitio I no impidió el procesamiento en el sitio II, tras el residuo 136, para generar la cadena F1.

Resultados

IV.4.3.2 Caracterización de los mutantes de la proteína F en el sitio I

Los mutantes de la proteína F R108N, R109N y R108N/R109N se ensayaron de manera análoga a los de la F_{TM-}. Células HEp-2 se infectaron con los virus vaccinia recombinantes que expresan las proteínas mutantes y se marcaron metabólicamente con ³⁵S-Met. Las proteínas se inmunoprecipitaron del extracto de células con una mezcla de AcMs contra la cadena F1. Como se aprecia en la Figura IV.4.8, mientras las formas F0, F_{Δ1-109} y F1 se pudieron observar en la proteína F, la forma F_{Δ1-109} no se detectó en los mutantes. Al igual que en el caso de la proteína F_{TM-}, también apareció la banda correspondiente a la cadena F2* en los mutantes que tienen el sitio I alterado.

Estos resultados indican que en la proteína F las mutaciones en el sitio I inhiben también el corte tras el residuo 109 y que dicha inhibición no impide el procesamiento en el sitio II.

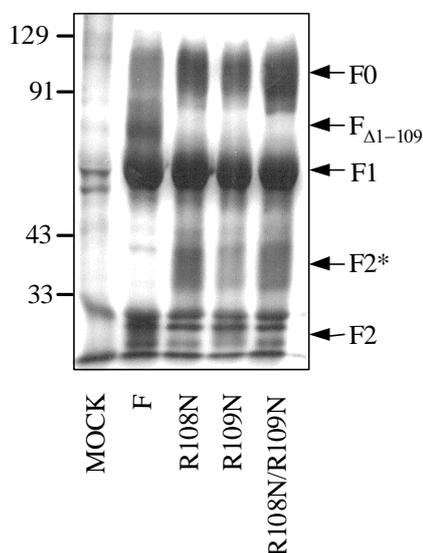


Figura IV.4.8: Análisis de las proteínas F mutantes en el sitio de procesamiento I. Células HEp-2 se infectaron con virus vaccinia recombinantes (5 ufp/célula), que expresaban las proteínas F, FR108N, FR109N o FR108N/R109N. Las células se marcaron metabólicamente con ³⁵S-Met (100 μCi/ml) durante 24 h, empezando 4 h después de la infección. Se prepararon extractos celulares como se indica en el apartado III.2.4.2 de Materiales y Métodos, y se inmunoprecipitaron con una mezcla de AcMs contra la cadena F1. Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron por SDS-PAGE (gel del 12% de acrilamida) y se visualizaron por autorradiografía.

IV.4.3.3 Caracterización de un mutante de la proteína F_{TM-} en el sitio de procesamiento II

La proteína mutante F_{TM-} en el sitio II, en la que se han eliminado los aminoácidos 131-134 (F_{TM-}Δ131-134), se purificó a partir del sobrenadante de células HEp-2 infectadas con el virus vaccinia recombinante que expresa dicha proteína. La purificación siguió el mismo protocolo descrito para la proteína F_{TM-} (apartado III.2.3.3 de Materiales y Métodos). La proteína purificada se analizó por *western blot*, junto a las proteínas F_{TM-} y F_{TM-}R108N/R109N purificadas del mismo modo, como se muestra en la Figura IV.4.9. En la proteína F_{TM-}Δ131-134 no se observó la banda de la cadena F1 y sí se apreció la banda F_{Δ1-109} respecto a la proteína F_{TM-}. La cadena F0 sólo fue detectable en la proteína F_{TM-}Δ131-134 añadiendo cantidades grandes de ésta proteína en el gel (no mostrado).

En conclusión, los resultados de este apartado indican que la proteína F se puede procesar proteolíticamente independientemente en los sitios I y II. La inhibición del procesamiento en el sitio I no impide el procesamiento en el sitio II, aunque se observa un cierto bloqueo con una acumulación mayor de la forma F0. Así mismo, la

Resultados

inhibición del procesamiento en el sitio II no bloquea el procesamiento en el sitio I, favoreciendo la acumulación de la forma $F_{\Delta 1-109}$.

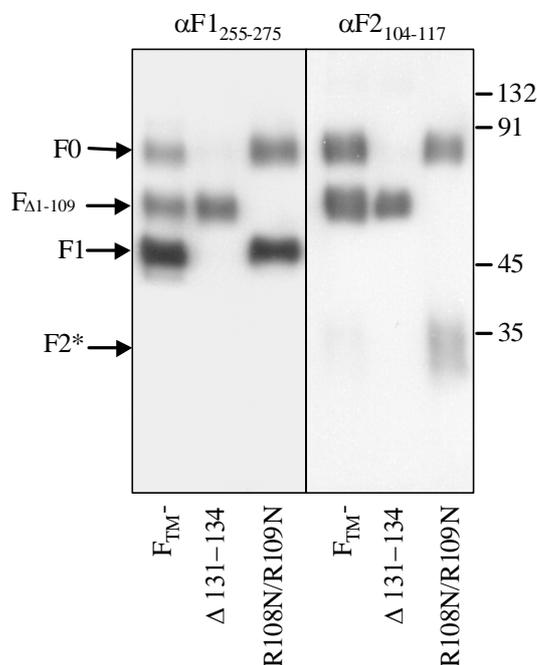


Figura IV.4.9: Western blot de las proteínas F_{TM^-} , $F_{TM^-}\Delta 131-134$ y $F_{TM^-}R108N/R109N$ purificadas. Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad a partir del sobrenadante de células HEP-2 infectadas con los correspondientes virus recombinantes según se describe en Materiales y Métodos (apartado III.2.3.3). En la parte izquierda de la figura el western blot fue revelado con el suero $\alpha F1_{255-275}$ y en la parte derecha con el $\alpha F2_{104-117}$. El gel de poliacrilamida fue del 10%.

IV.4.4 COOLIGOMERIZACIÓN DE MOLÉCULAS DE F_{TM^-} CON DIVERSOS GRADOS DE PROCESAMIENTO

Para averiguar si la forma sin procesar (F0) o la parcialmente procesada ($F_{\Delta 1-109}$), y la forma procesada de la proteína F_{TM^-} pueden estar formando parte del mismo trímero, el sobrenadante de células HEP-2 infectadas con $VRBF_{TM^-}$ y marcadas metabólicamente con ^{35}S -Met, se inmunoprecipitó con una mezcla de AcMs contra la cadena F1 ó con el suero $\alpha F2_{104-117}$.

Las moléculas que sólo sufran un corte proteolítico en el sitio II deben ser muy pocas, ya que no se pudo detectar la banda F2* en la proteína F_{TM^-} purificada en un gel teñido con Azul de Coomassie o con colorante específico de glicoproteínas (Figura IV.4.1 B), ni en la inmunoprecipitación del sobrenadante de células infectadas con $VRBF_{TM^-}$ y marcadas con ^{35}S -Met o 3H -Glucosamina con una mezcla de AcMs anti-F1 (Figura IV.4.7). Por otra parte, el suero $\alpha F2_{104-117}$ no reaccionó con la cadena F2. De esta forma, la aparición de la cadena F1 (que vendría fundamentalmente de la proteína totalmente procesada) en la inmunoprecipitación con el suero $\alpha F2_{104-117}$, indicaría que se produce la cooligomerización de las formas F0 y/o $F_{\Delta 1-109}$ y la forma procesada de la proteína F_{TM^-} .

En la Figura IV.4.10 se muestra como la mezcla de AcMs anti-F1 inmunoprecipitó las bandas F0, $F_{\Delta 1-109}$, F1 y F2 del sobrenadante de células infectadas con $VRBF_{TM^-}$, como ya se había visto previamente. Cuando la inmunoprecipitación se realizó con el suero $\alpha F2_{104-117}$ aparecieron las mismas bandas y, además, una banda

Resultados

difusa de mayor movilidad electroforética que la cadena F2. Esta banda de baja masa molecular probablemente sea la correspondiente al péptido situado entre los sitios de corte I y II (F_{I-II}). La aparición del fragmento F_{I-II} en la inmunoprecipitación podría deberse simplemente a que se hubiese excretado al medio junto con la proteína F_{TM^-} , pero sin formar parte de la proteína madura; o bien, a que se encontrase unido a la proteína mediante interacciones no covalentes. Si lo que ocurriese fuese la segunda posibilidad, la aparición de la banda de F1 en la inmunoprecipitación con el suero $\alpha F_{2_{104-117}}$ no demostraría la co-oligomerización de las formas no totalmente procesadas y la totalmente procesada de la proteína F_{TM^-} , ya que la forma totalmente procesada podría estar precipitando arrastrada por el péptido F_{I-II} .

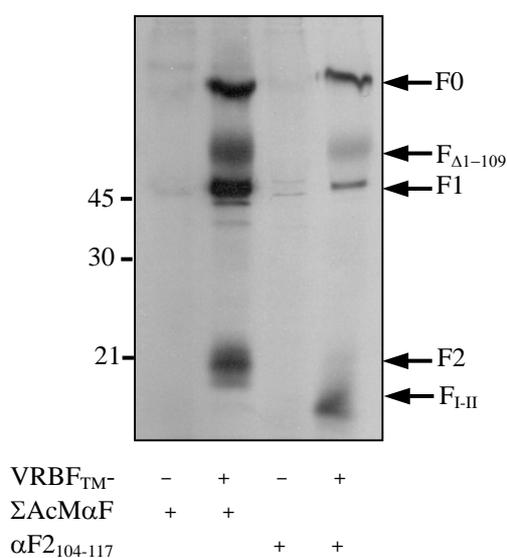


Figura IV.4.10: Inmunoprecipitación del sobrenadante de células infectadas con VRBF_{TM⁻} con una mezcla de AcMs anti-F1 y con el suero $\alpha F_{2_{104-117}}$. Células HEP-2 se infectaron con VRBF_{TM⁻} o VRB12 (control negativo) con 5 ufp/célula. Las células se marcaron metabólicamente con ³⁵S-Met (100 μCi/ml), a partir de 4 h después de la infección, durante 24 h. El sobrenadante de las células se inmunoprecipitó con una mezcla de AcMs anti-F1 (ΣAcMαF) o con el suero $\alpha F_{2_{104-117}}$. Finalmente se realizó un SDS-PAGE (gel del 12% de acrilamida) y se visualizaron los resultados por autorradiografía.

Para discernir entre las dos posibilidades, células HEP-2 se infectaron con VRBF_{TM⁻} en medio DMEM-0 y se marcaron metabólicamente con ³⁵S-Met. El sobrenadante se concentró (o no) con Centricon 3 (su membrana deja pasar las moléculas menores de 3 kDa) o Centricon 30 (el tamaño de poro retiene las proteínas de más de 30 kDa). El concentrado se diluyó con un volumen igual de DMEM-0 y se volvió a concentrar. Esta operación se repitió dos veces y, por último, el concentrado se llevó al volumen original con DMEM-0. Este sobrenadante se inmunoprecipitó con una mezcla de AcMs contra la cadena F1 ó con el suero $\alpha F_{2_{104-117}}$ (Figura IV.4.11). En la inmunoprecipitación con la mezcla de AcMs anti-F1, tanto si el sobrenadante se pasó por Centricon como si no, aparecieron las bandas de F0, F_{Δ1-109}, F1 y F2. Al inmunoprecipitar con el suero $\alpha F_{2_{104-117}}$, cuando el sobrenadante no se pasó por Centricon o se pasó por Centricon 3, además de las bandas de F0, F_{Δ1-109}, F1 y F2,

Resultados

apareció la banda del péptido F_{I-II} . Sin embargo, cuando el sobrenadante se pasó por Centricon 30 antes de realizar la inmunoprecipitación, la banda de F_{I-II} ya no apareció y sí continuó detectándose la banda de la cadena F1.

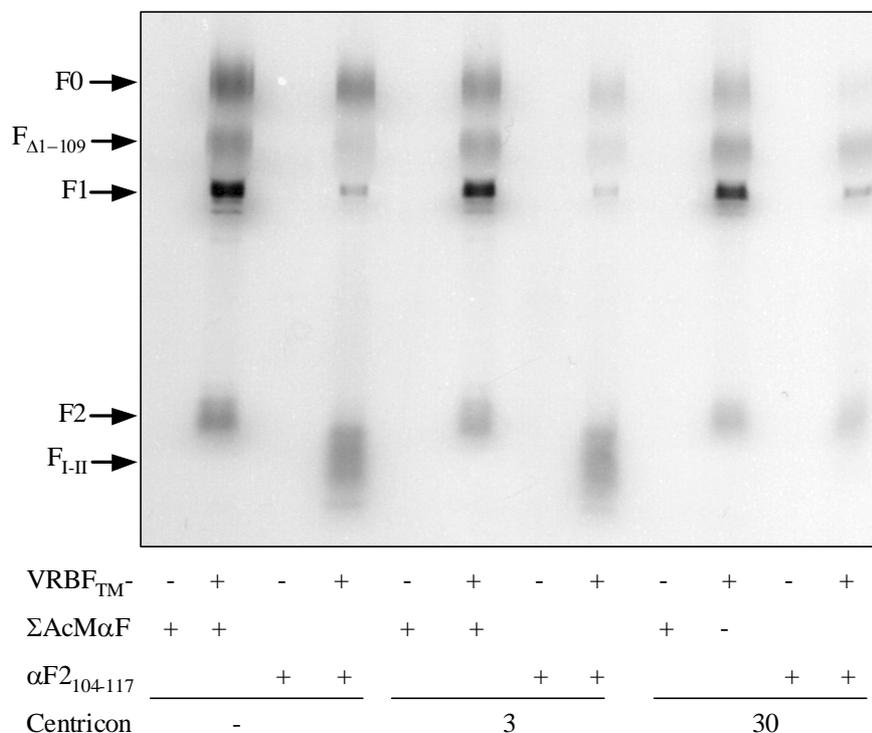


Figura IV.4.11: Cooligomerización de moléculas no totalmente y totalmente procesadas. Células HEp-2 se infectaron con VRBF_{TM-} o VRB12 (control negativo) con 5 ufp/célula. Las células se marcaron metabólicamente con ³⁵S-Met (100 μ Ci/ml), a partir de 4 h después de la infección y durante 24 h. Los sobrenadantes se concentraron (o no) con Centricon 3 o Centricon 30, volviéndose a llevar al volumen inicial con DMEM-0; esta operación se repitió dos veces más. Las proteínas se inmunoprecipitaron con una mezcla de AcM anti-F1 (Σ AcM α F) o con el suero α F2₁₀₄₋₁₁₇. Finalmente se realizó un SDS-PAGE (gel del 12% de acrilamida) y se visualizaron los resultados por autorradiografía.

Estos resultados indican que el péptido entre los sitios de procesamiento I y II (F_{I-II}) se libera de la proteína una vez realizados los dos cortes proteolíticos, ya que desaparece del inmunoprecipitado del sobrenadante concentrado con Centricon 30 al utilizar el suero α F2₁₀₄₋₁₁₇. Por tanto, la forma no procesada (F0) y/o la parcialmente procesada ($F_{\Delta 1-109}$) cooligomerizan con la proteína F_{TM-} procesada, ya la cadena F1 es inmunoprecipitada con el suero α F2₁₀₄₋₁₁₇, que no reconoce a la proteína madura.

IV.5 ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA F

Como se comenta en la Introducción (apartado I.5), hasta ahora se desconoce el mecanismo de activación de la proteína F de los paramixovirus. A continuación se van a exponer una serie de resultados que indican que hay una correlación entre el procesamiento proteolítico de la proteína F y el cambio conformacional de dicha proteína al pasar de moléculas en forma de cono a varillas con cabeza globular, como se describió en el apartado IV.2. Las dos conformaciones de la proteína, a su vez, podrían estar relacionadas con el cambio conformacional que experimenta la proteína F durante el proceso de fusión de membranas.

IV.5.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNA F_{TM} -TOTALMENTE PROCESADA PROTEOLÍTICAMENTE

Como se mencionó en el apartado IV.4.1, las preparaciones de proteína F_{TM} - contienen una fracción sustancial de polipéptidos en los que no ha tenido lugar el procesamiento proteolítico (F_0) o en los que solo ha tenido lugar el corte en el sitio I ($F_{\Delta 1-109}$). Se intentó preparar proteína F_{TM} - en la que todas las moléculas estuviesen totalmente procesadas. Para ello, considerando que los sitios de procesamiento I y II son secuencias reconocibles por tripsina, se incubó proteína F_{TM} - purificada con cantidades crecientes de tripsina y el producto de la digestión se analizó por *western blot* con los sueros $\alpha F_{1255-275}$ y $\alpha F_{2104-117}$ (Figura IV.5.1).

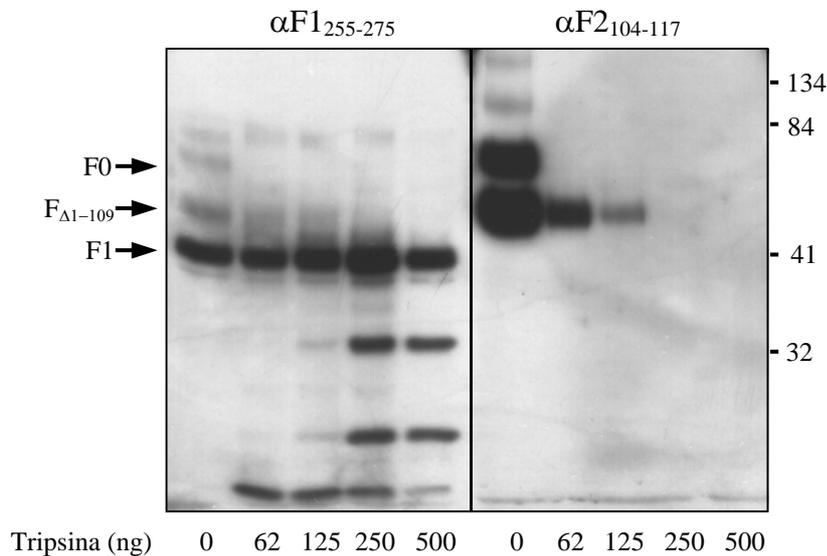


Figura IV.5.1: Western blot de la digestión con tripsina de proteína F_{TM} -. Se digirieron alícuotas de $\approx 1 \mu\text{g}$ de proteína F_{TM} - purificada con las cantidades de tripsina-TPCK indicadas en cada canal en un volumen final de $20 \mu\text{l}$ de PBS durante 1 h a 37°C . Posteriormente se añadió tampón de muestra y el resultado de la digestión se analizó mediante SDS-PAGE (10% de acrilamida) y posterior *western blot* con los sueros que se indican en la figura.

Resultados

Mientras las formas F0 y F Δ_{1-109} se digirieron con cantidades crecientes de tripsina, la banda F1 permaneció esencialmente inalterada, aunque con altas cantidades de tripsina aparecieron algunas bandas de mayor movilidad electroforética que la cadena F1 y que reaccionaron con el suero específico de la cadena F1.

Para comprobar que la cadena F2 de la proteína no se vio afectada por la digestión se realizó un ensayo similar al que se muestra en la Figura IV.5.1, pero en el que el gel se tiñó con Azul de Coomassie (Figura IV.5.2). La cadena F2 no se digirió con las cantidades de tripsina utilizadas, como se aprecia en el gel en condiciones reductoras (parte izquierda de la figura). La banda F1+F2 en condiciones no reductoras (parte derecha de la figura) tampoco disminuyó apreciablemente ni su intensidad, ni su tamaño.

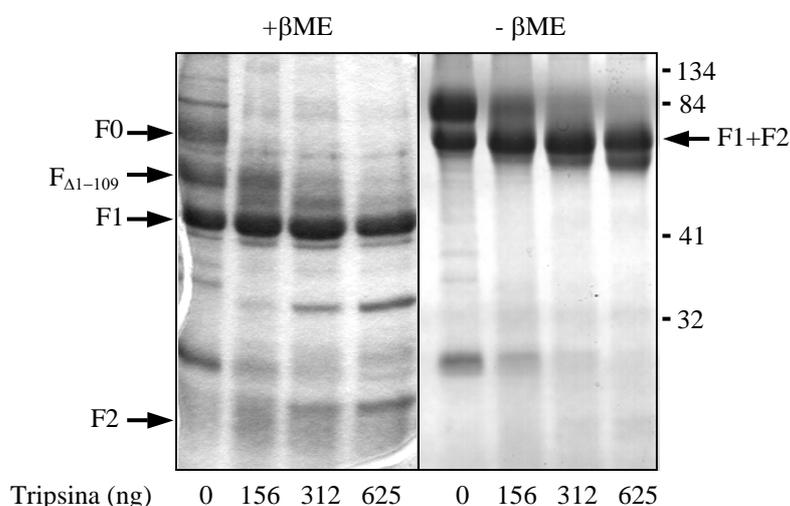


Figura IV.5.2: SDS-PAGE de la digestión con tripsina de estadios intermedios de procesamiento en la proteína F_{TM}⁻. Se digirieron alícuotas con $\approx 15 \mu\text{g}$ de proteína F_{TM}⁻ en 20 μl de PBS con las cantidades de tripsina-TPCK indicadas en la figura durante 1 h a 37°C. El resultado de la digestión se analizó mediante SDS-PAGE (12% de acrilamida) en condiciones reductoras (parte izquierda de la figura) y no reductoras (para derecha) y el gel se tiñó con Azul de Coomassie.

Para comprobar si la digestión con tripsina alteraba las propiedades de agregación de la proteína F_{TM}⁻, una cantidad de la misma se digirió con tripsina en condiciones equivalentes a las del canal de 250 ng de la Figura IV.5.1. La proteína procesada se cargó en un gradiente del 10 al 25% de sacarosa y se ultracentrifugó como se describe en Materiales y Métodos (apartado III.2.4.6). En la Figura IV.5.3 se muestra el *western blot* de las fracciones de los gradientes de proteína F_{TM}⁻ no tratada (parte A) y de proteína tratada con tripsina (parte B). La proteína no digerida, como ya se había observado (ver Figura IV.2.4), migró mayoritariamente hacia la parte superior del gradiente, con una proporción de moléculas sedimentando hacia zonas de mayor densidad e incluso hacia el fondo del tubo. En cambio, la mayoría de la proteína digerida sedimentó en una banda ancha con el máximo situado hacia la mitad del gradiente.

Resultados

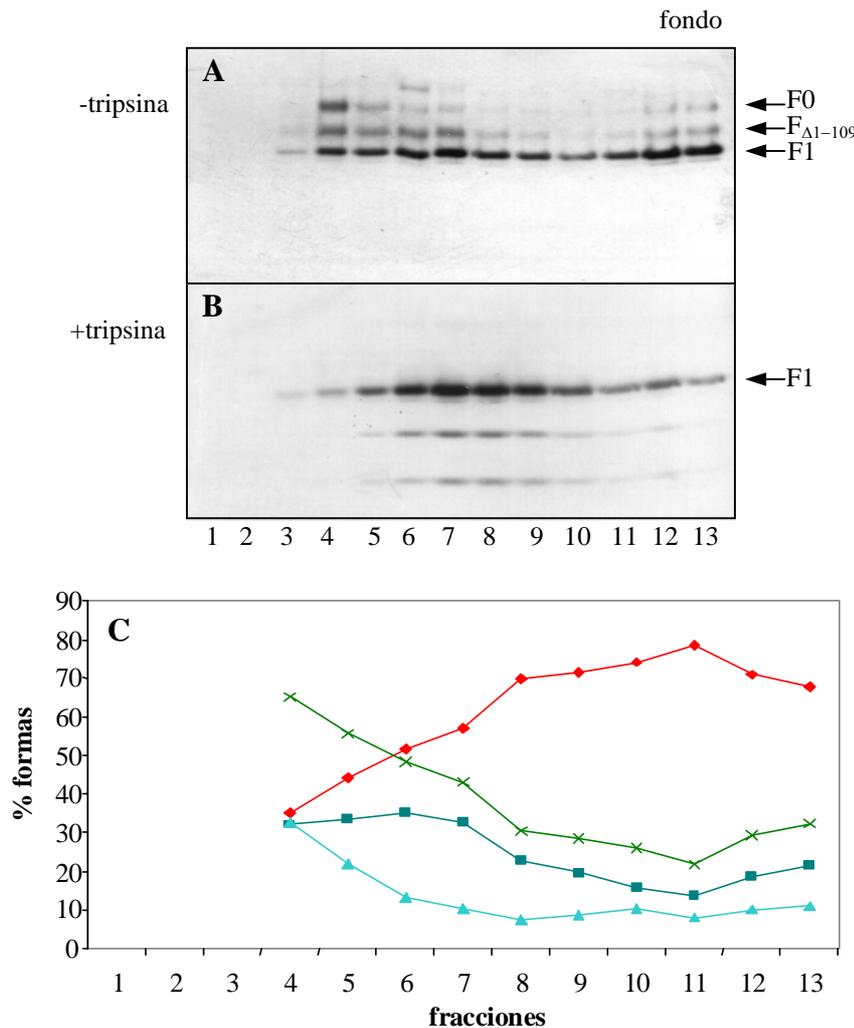


Figura IV.5.3: Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de la proteína F_{TM} sin digerir y digerida con tripsina. La proteína F_{TM} ($\approx 100 \mu\text{g}$) se digirió (o no) con $2,5 \mu\text{g}$ tripsina-TPCK en $160 \mu\text{l}$ de PBS durante 1 h a 37°C (condiciones equivalentes a la digestión con 250 ng de la Figura IV.5.1), se añadió un quinto del volumen de la muestra de inhibidor de proteasas (Complete mini-EDTA) y las muestras se ultracentrifugaron 15 h, a 39000 rpm, en un rotor SW40, a 4°C , en un gradiente del 10 al 25% de sacarosa en PBS. Por último, se recogieron fracciones de 1 ml del gradiente y se analizaron $25 \mu\text{l}$ de las mismas mediante *western blot* con el suero $\alpha F1_{255-275}$. **A:** *Western blot de las fracciones del gradiente de la proteína F_{TM} no tratada con tripsina.* **B:** *Western blot de las fracciones del gradiente de la proteína F_{TM} digerida con tripsina.* **C:** *Porcentaje de las bandas F1, $F_{\Delta 1-109}$ y F0 respecto a la proteína F_{TM} total presente en cada fracción del gradiente de A.* Los cálculos presentados se realizaron a partir del densitometrado de las bandas presentes en el *western blot* de A. En rombos rojos se representa el porcentaje de la banda de F1, en cuadrados azul oscuro el de la banda de $F_{\Delta 1-109}$, en triángulos azul claro el de la banda de F0 y con cruces verdes la suma del porcentaje de las bandas de F0 y de $F_{\Delta 1-109}$. En las fracciones 1-3 no se muestran los datos ya que la cantidad de proteína detectada fue pequeña.

Los resultados de las Figuras IV.5.1 y IV.5.3 A y B indican, por tanto, que la digestión con tripsina de proteína F_{TM} procesa las formas F0 y $F_{\Delta 1-109}$ para convertirlas, presumiblemente, en polipéptidos totalmente procesados de la proteína. Además, la

Resultados

proteína totalmente procesada sedimenta mayoritariamente como agregados de mayor tamaño que a las formas individuales de proteína F_{TM^-} sin digerir, que sedimentan en las primeras fracciones del gradiente.

En la Figura IV.5.3 C se representa el porcentaje de cada banda (F1, $F_{\Delta 1-109}$ y F0) respecto a la cantidad de proteína F_{TM^-} presente en cada fracción del gradiente de la Figura IV.5.3 A. Se observa como las formas no procesadas (F0) o parcialmente procesadas ($F_{\Delta 1-109}$) de proteína F_{TM^-} se localizaron mayoritariamente en las fracciones superiores del gradiente, mientras que el máximo de la banda de la cadena F1 se desplazó hacia la mitad del gradiente.

Se juntaron las fracciones 4-7 del gradiente de la proteína sin digerir con tripsina, así como las fracciones 6-9 de la proteína digerida con tripsina, que correspondieron al máximo de proteína en cada gradiente. Ambas preparaciones se observaron al microscopio electrónico (Figura IV.5.4). Mientras que la proteína F_{TM^-} sin digerir presentó una mayoría de moléculas individuales con forma cónica (53%) en la proteína digerida con tripsina la mayoría de las moléculas adoptaron forma de varilla con cabeza globular y formaron rosetas (86%). Además, las rosetas de la proteína tratada con tripsina contenían un número mayor de espículas (entre 6 y 8 por roseta) que las de la proteína sin digerir (entre 2 y 4).

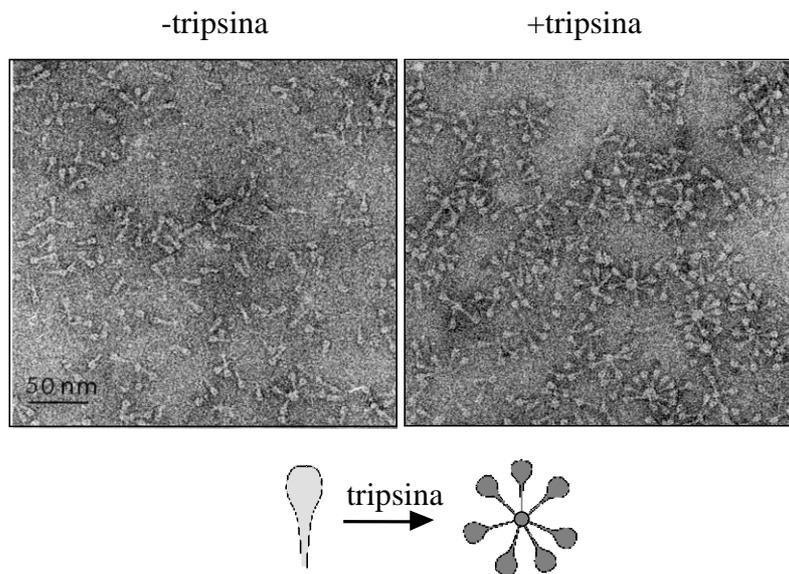


Figura IV.5.4: Microscopía electrónica de preparaciones de proteína F_{TM^-} sin digerir o digerida con tripsina. Se juntaron las fracciones 4-7 del gradiente de la proteína F_{TM^-} sin digerir con tripsina y las fracciones 6-9 del de la proteína digerida (Figura IV.5.3) y se observaron al microscopio electrónico por tinción negativa. En la parte inferior de la figura se muestra un diagrama de los cambios que se producen en la proteína F_{TM^-} .

Este resultado indica que cuando las formas no totalmente procesadas de la proteína F_{TM^-} se procesan *in vitro* por tratamiento con tripsina, la proteína tiende a agregarse en rosetas que sedimentan más rápidamente que las formas no agregadas. Al

Resultados

mismo tiempo, ese cambio en el estado de agregación de la proteína F_{TM^-} va asociado a un cambio en su forma que es visible al microscopio electrónico: la proteína que contiene formas no totalmente procesadas está, mayoritariamente, en forma de conos que se presentan como moléculas no agregadas, mientras que la proteína de la que se han eliminado las formas F_0 y $F_{\Delta 1-109}$ por tratamiento con tripsina forma rosetas de varillas con cabeza globular.

Una posible explicación de los anteriores resultados sería que la incubación a 37°C contribuyese al cambio conformacional observado (paso de formas cónicas a varillas con cabeza globular), además del procesamiento con tripsina. Para analizar esta posibilidad, la digestión de la proteína F_{TM^-} con tripsina se realizó a 10°C y 20°C . Como se muestra en la Figura IV.5.5, la digestión del polipéptido $F_{\Delta 1-109}$ fue algo menos eficiente a 10°C y a 20°C que a 37°C , por lo que, para digerir la proteína F_{TM^-} a dichas temperaturas para su posterior análisis por ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa, se utilizó una cantidad de tripsina tres veces mayor que en la digestión a 37°C .

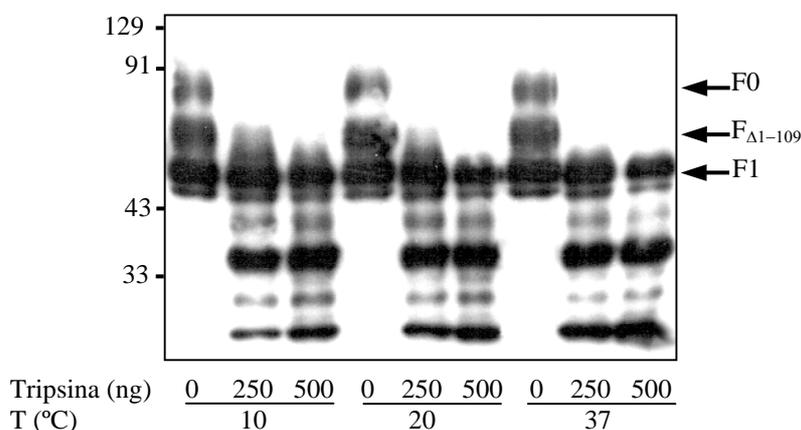


Figura IV.5.5: Digestión con tripsina de proteína F_{TM^-} a distintas temperaturas. $\approx 1\mu\text{g}$ de proteína F_{TM^-} purificada se digirió 1 h a 10, 20 ó 37°C en $20\mu\text{l}$ de PBS con las cantidades de tripsina-TPCK indicadas en la figura. Los productos de la digestión se analizaron en un gel del 10% de acrilamida mediante *western blot* con el AcM 47F.

La proteína F_{TM^-} sin digerir o digerida con tripsina a 10, 20 ó 37°C se ultracentrifugó en gradiente de sacarosa en las mismas condiciones de la Figura IV.5.3. En la parte A se muestran los *western blots* de las fracciones de los cuatro gradientes y en la parte B las imágenes de microscopía electrónica de las preparaciones de proteína que se cargaron en los gradientes. El gradiente de la proteína F_{TM^-} sin tratar con tripsina mostró el mismo perfil que en anteriores ocasiones (ver Figura IV.5.3 A). Cuando se digirió a 10°C ó 20°C la proteína migró hacia la parte media del gradiente, de manera análoga a la proteína digerida a 37°C . Además, como se puede observar en las micrografías de la Figura IV.5.6 B, las preparaciones digeridas con tripsina, a cualquiera de las tres temperaturas, contenían mayoritariamente moléculas en forma de varilla con cabeza globular, las cuales formaron rosetas de 6-8 unidades.

Se puede concluir, por tanto, que la agregación de la proteína F_{TM^-} y el cambio conformacional de moléculas con forma cónica a moléculas con morfología de varilla

Resultados

con cabeza globular, que se observa tras la digestión con tripsina a 37°C, no se debe a la temperatura de incubación, puesto que se aprecia el mismo efecto cuando la digestión se realiza a 10°C ó a 20°C.

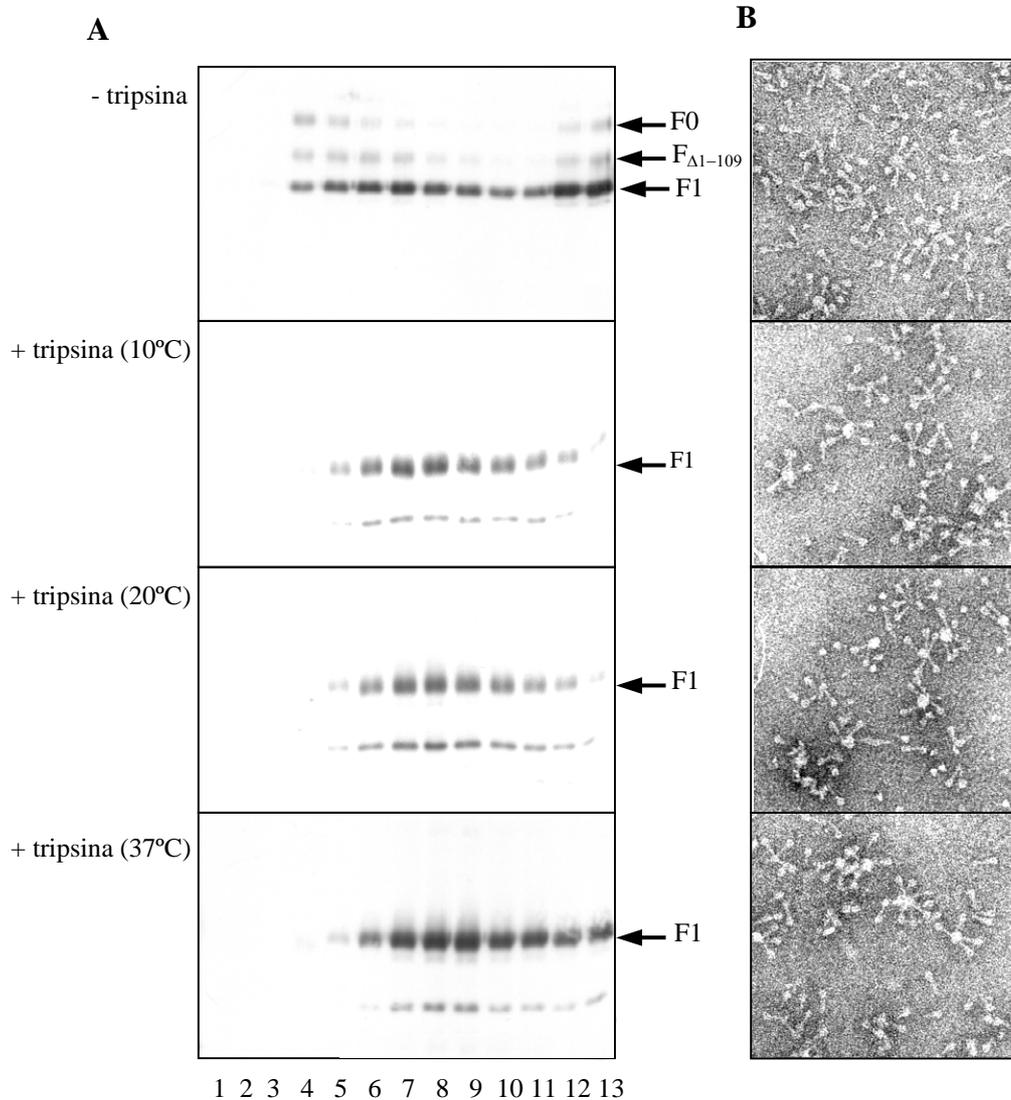


Figura IV.5.6: Proteína F_{TM} sin digerir o digerida con tripsina a distintas temperaturas. La proteína F_{TM} ($\approx 100 \mu\text{g}$) sin digerir o digerida con tripsina-TPCK en condiciones equivalentes a las descritas en la Figura IV.5.3 para la digestión a 37°C, y con una concentración de tripsina tres veces mayor para la digestión a 10 y a 20°C. Las muestras se ultracentrifugaron en un gradiente de sacarosa del 10 al 25%, según se indica en el pie de la Figura IV.5.3. Se recogieron fracciones del gradiente de 1 ml y 25 μl de las mismas se analizaron por *western blot* con el suero $\alpha F1_{255-275}$ (parte A). Las preparaciones cargadas en el gradiente se observaron al microscopio electrónico por tinción negativa (parte B).

Resultados

IV.5.2 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNA F TOTALMENTE PROCESADA PROTEOLÍTICAMENTE

La proteína F purificada se digirió con tripsina de manera equivalente a la proteína F_{TM-} con el fin de comprobar si también tenían lugar los cambios observados en la proteína F_{TM-} tras el procesamiento de las formas F0 y F_{Δ1-109}.

En la Figura IV.5.7 se muestra un *western blot* de la digestión de la proteína F con cantidades crecientes de tripsina. Se puede apreciar como, de nuevo, los intermediarios del procesamiento (F0 y F_{Δ1-109}) se digirieron con cantidades crecientes de tripsina, mientras que la cadena F1 no se afectó apreciablemente por el tratamiento.

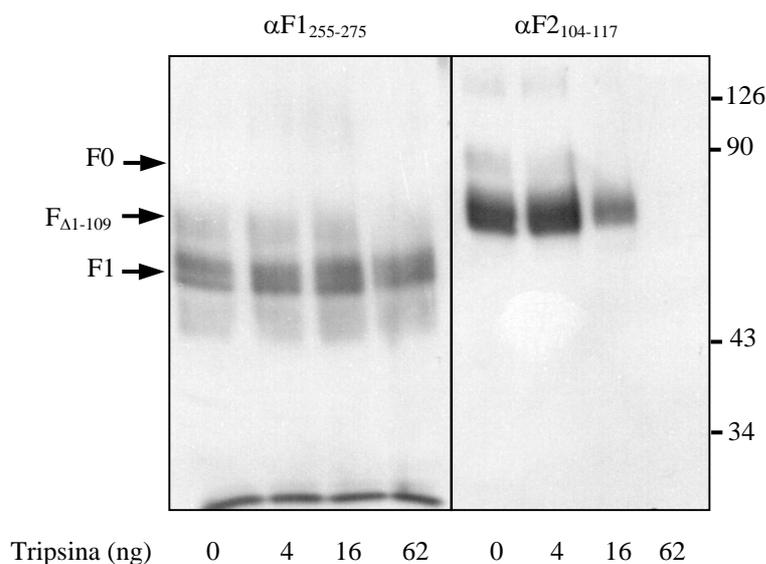


Figura IV.5.7: Digestión con tripsina de proteína F. Se digirieron alícuotas de $\approx 1 \mu\text{g}$ de proteína F purificada con las cantidades indicadas en cada canal de tripsina-TPCK en $20 \mu\text{l}$ de PBS durante 1 h a 37°C . El resultado de la digestión se analizó mediante SDS-PAGE (10% poliacrilamida) y posterior *western blot* con los sueros que se indican en la figura.

La proteína F sin digerir o digerida con tripsina en condiciones en las que se procesaron proteolíticamente las formas F0 y F_{Δ1-109}, se ultracentrifugó en un gradiente del 10 al 25% de sacarosa. En la Figura IV.5.8 se muestra el *western blot* de las fracciones de los gradientes. La proteína F no digerida migró como ya se había observado previamente en la Figura IV.2.4, es decir, la mayor parte de la proteína sedimentó hacia la mitad y hacia el fondo del gradiente, aunque una parte de la proteína, que se degradó espontáneamente, sedimentó hacia la parte superior del gradiente. Por el contrario, la proteína F digerida con tripsina sedimentó hacia regiones de mayor densidad del gradiente, aunque la parte de proteína degradada espontáneamente permaneció en la parte superior.

Por tanto, la preparación de proteína F que contiene moléculas totalmente procesadas por el tratamiento con tripsina presentó un grado de agregación mayor que la proteína que contiene aún formas sin procesar, al igual que se había observado con la proteína F_{TM-}.

Resultados

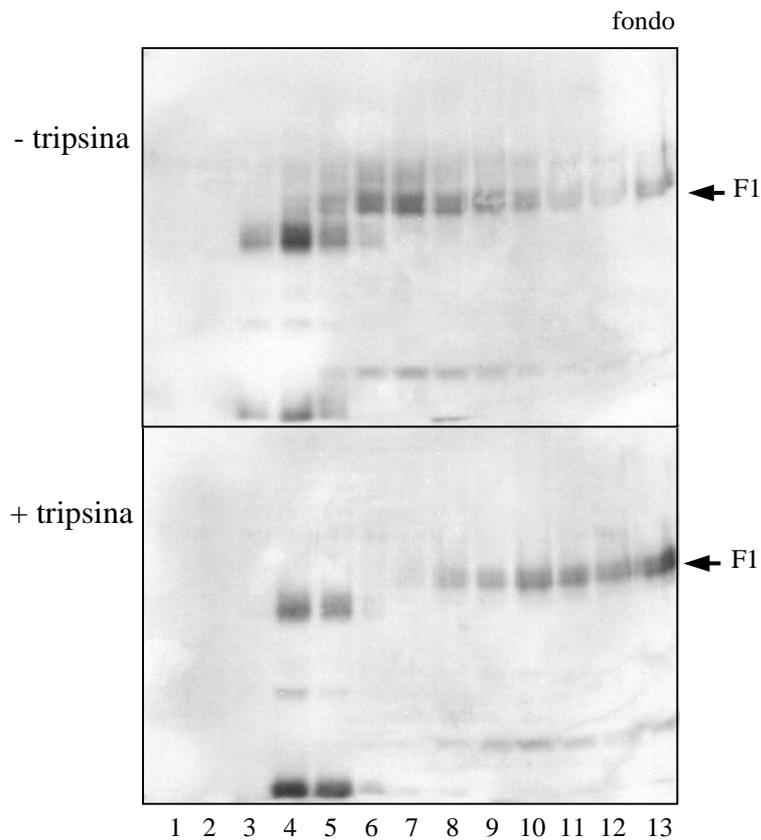


Figura IV.5.8: Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de la proteína F sin digerir o digerida con tripsina. La proteína F ($\approx 100 \mu\text{g}$) se digirió (o no) 1 h a 37°C con 430 ng de tripsina-TPCK en $160 \mu\text{l}$ de PBS (condiciones equivalentes a la digestión con 62 ng de la Figura IV.5.7). Tras la incubación se añadió un quinto del volumen de la muestra de inhibidor de proteasas (Complete mini-EDTA) y las muestras se ultracentrifugaron 15 h, a 39000 rpm, en un rotor SW40, a 4°C , en un gradiente del 10 al 25% de sacarosa. Se recogieron fracciones de 1 ml y se analizaron $25 \mu\text{l}$ de las mismas por *western blot* con el suero $\alpha\text{F1}_{255-275}$.

Las fracciones 6-9 del gradiente sin tratar y las fracciones 8-11 del gradiente de proteína F digerida con tripsina se analizaron mediante microscopía electrónica (Figura IV.5.9). Como era previsible por el resultado de los gradientes, la preparación de proteína tratada con tripsina presentó rosetas mayores que la que no se digirió. Además, las rosetas de la proteína totalmente procesada estuvieron formadas, casi en su totalidad, por moléculas con forma de varilla con cabeza globular.

Resultados

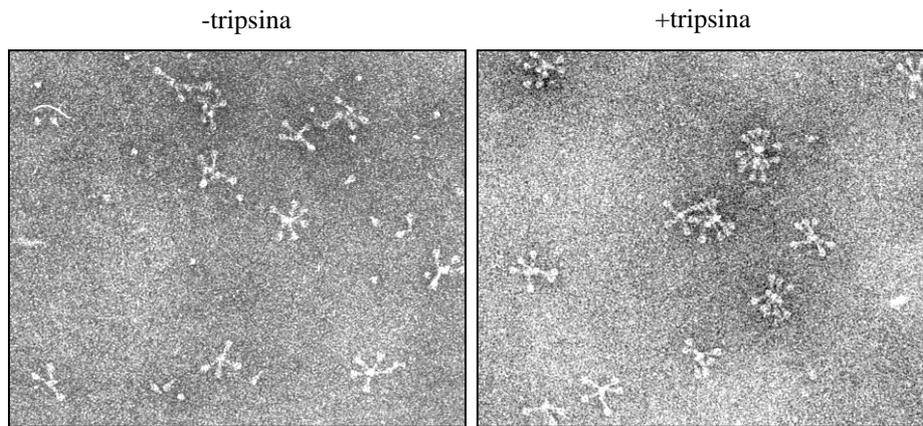


Figura IV.5.9: Microscopía electrónica de preparaciones de proteína F sin digerir y digerida con tripsina. Se juntaron las fracciones 6-9 del gradiente de la proteína F sin digerir con tripsina y las fracciones 8-11 del de la proteína digerida (Figura IV.5.8) y se observaron al microscopio electrónico por tinción negativa.

IV.5.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES F_{TM} -R108N/R109N Y F_{TM} - Δ 131-134

Con el fin de confirmar la relación entre la presencia de formas no totalmente procesadas de la proteína F_{TM} - (F_0 y $F_{\Delta 1-109}$), el estado de agregación de la misma y las formas discernibles al microscopio electrónico (proteínas con forma de cono o de varilla con cabeza globular) se purificaron las proteínas de los mutantes F_{TM} -R108N/R109N y F_{TM} - Δ 131-134, según se describe en el apartado IV.4.3.3. Las dos proteínas mutantes y la proteína F_{TM} - se ultracentrifugaron en un gradiente del 10 al 25% de sacarosa. En la Figura IV.5.10 se muestra como la proteína F_{TM} -, como ya se había descrito, migró como dos poblaciones de proteína distintas: i) las formas no totalmente procesadas migraron en la parte superior del gradiente; y ii) la cadena F1 (proviniente mayoritariamente de moléculas totalmente procesadas, como se comentó en el apartado IV.4.4) se localizó a lo largo de todo el tubo, con un máximo en la parte media y otro en el fondo. El polipéptido F_0 de la proteína F_{TM} -R108N/R109N se localizó en la parte superior del gradiente; mientras que la forma procesada únicamente en el sitio II (banda F1) de esta proteína, sedimentó mayoritariamente como una banda más ancha con agregados que llegaban al centro del gradiente y con algunas moléculas en un estado de agregación mayor. Por último, el polipéptido $F_{\Delta 1-109}$ de la proteína F_{TM} - Δ 131-134 sedimentó en la parte superior del gradiente, como lo hizo la forma homóloga de la proteína F_{TM} -.

En la Figura IV.5.11 se muestran las micrografías de las muestras cargadas en los gradientes y de las fracciones 4 y 7 de cada gradiente de la Figura IV.5.10. Se puede observar como, en la proteína F_{TM} -, la muestra inicial tenía moléculas individuales con forma de cono y moléculas con forma de varilla con cabeza globular agregadas en rosetas, como ya se había mostrado anteriormente. Los dos tipos de moléculas se separaron en el gradiente de sacarosa durante la ultracentrifugación, de forma que en la fracción 4 fundamentalmente aparecieron moléculas individuales cónicas, mientras que

Resultados

en la fracción 7 la mayoría de las proteínas formaron rosetas. En el mutante $F_{TM-R108N/R109N}$ también apareció una mezcla de moléculas con forma de cono y de varilla con cabeza globular, sin embargo, el porcentaje de moléculas con forma de cono fue mayor en este mutante que en la proteína F_{TM^-} . Tras la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa también fue posible separar las moléculas individuales (fracción 4) de las que forman rosetas (fracción 7). Por último, la proteína $F_{TM-\Delta 131-134}$ presentó al microscopio electrónico únicamente moléculas individuales con forma de cono, que, como era de esperar, migraron fundamentalmente en la fracción 4 del gradiente. En la fracción 7 se pudieron observar algunas moléculas agregadas con forma de varilla con cabeza globular que, posiblemente, sean moléculas de $F_{TM-\Delta 131-134}$ que se hayan procesado en el sitio II.

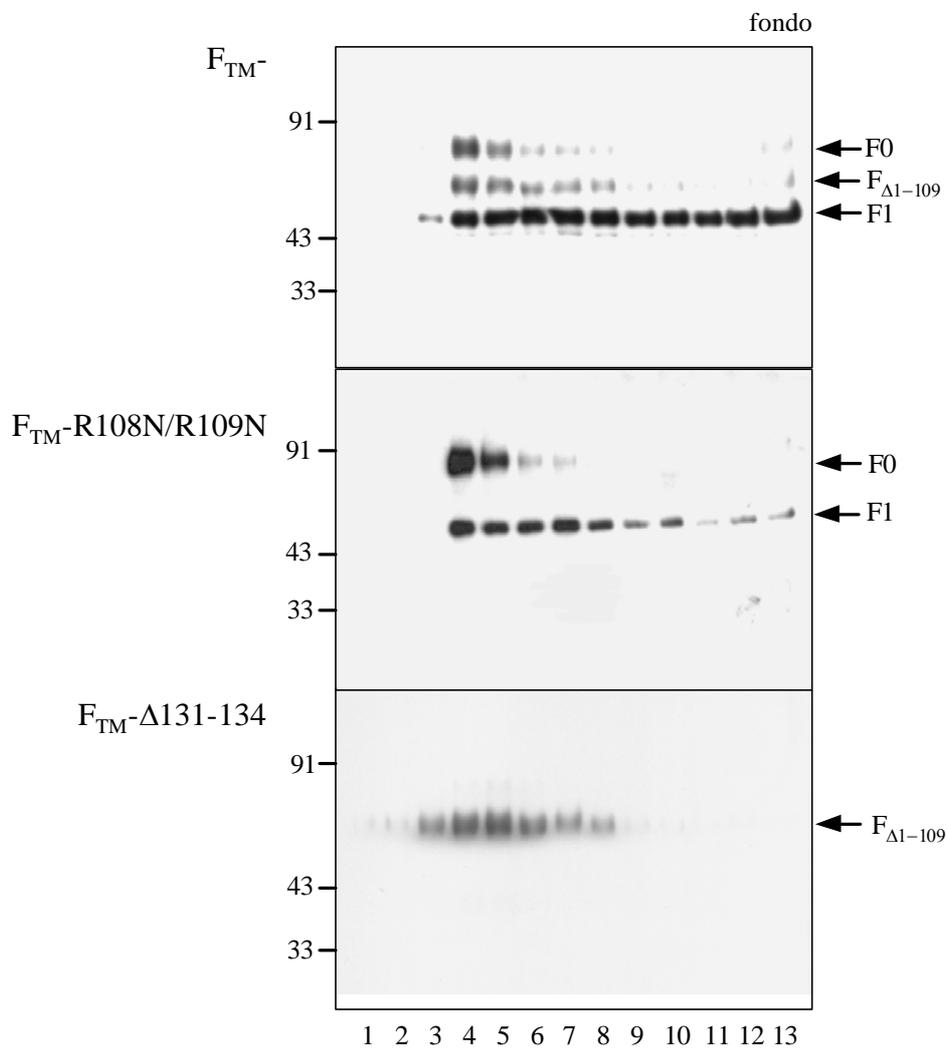


Figura IV.5.10: Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de las proteínas F_{TM^-} , $F_{TM-R108N/R109N}$ y $F_{TM-\Delta 131-134}$. Las proteínas purificadas ($\approx 200 \mu\text{g}$) se ultracentrifugaron en un gradiente del 10 al 25% de sacarosa a 39000 rpm, 15 h, en un rotor SW40, a 4°C. Se recogieron fracciones de 1 ml y se analizaron 10 μl de las mismas mediante *western blot* con el suero $\alpha F1_{255-275}$.

Resultados

Estos resultados corroboran que la proteína procesada únicamente en el sitio II adopta una conformación de varilla con cabeza globular que forma rosetas en disolución acuosa; mientras que la proteína que únicamente se procesa con el sitio I está en forma de conos individuales.

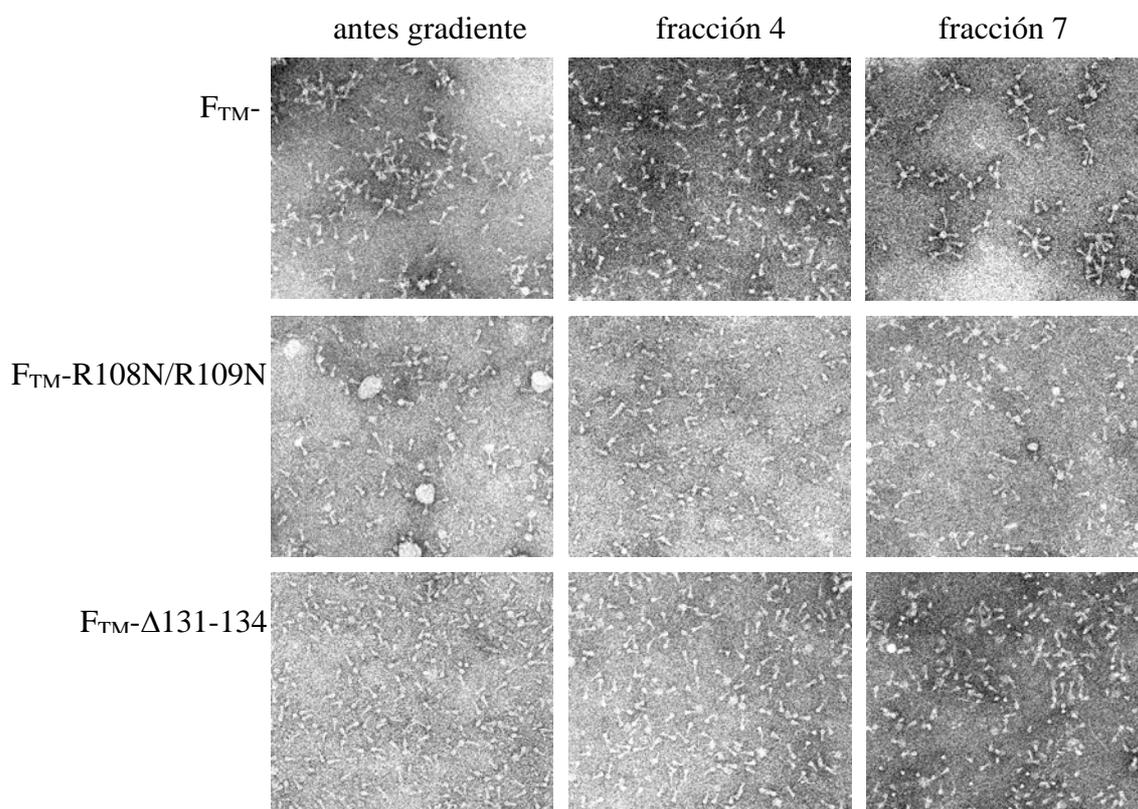


Figura IV.5.11: Microscopía electrónica de fracciones de los gradientes de proteína F_{TM} , $F_{TM-R108N/R109N}$ y $F_{TM-\Delta 131-134}$. Se muestran las micrografías por tinción negativa de las muestras que se cargaron en los gradientes de la Figura IV.5.10 (antes gradiente), de la fracción 4 y de la fracción 7.

V. DISCUSIÓN

V.1 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA F

V.1.2 PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS VIRALES DE FUSIÓN EN AUSENCIA DE LAS REGIONES TRANSMEMBRANA Y CITOPLASMÁTICA

El plegamiento de glicoproteínas con regiones transmembrana tiene lugar en tres ambientes topológica y bioquímicamente distintos: i) el lumen del retículo endoplásmico, donde se pliega el ectodominio en un ambiente oxidante; ii) la membrana del retículo endoplásmico, en la cual se pliega la región transmembrana; y iii) el citosol, donde se pliega el dominio citoplasmático en un ambiente reductor (Doms y col., 1993; Spies y col., 1994). Por tanto, los tres dominios de las glicoproteínas se plegarían independientemente y, en principio, la eliminación de uno de ellos no influiría en el correcto plegamiento del resto. Los experimentos detallados en los apartados IV.2 y IV.3 de Resultados (comportamiento en SDS-PAGE en distintas condiciones de reducción y calentamiento, susceptibilidad a digestión con tripsina, reactividad frente a AcMs y observación al microscopio electrónico) sugieren que las proteínas F y F_{TM} tienen la misma estructura, lo que implica que no son necesarias las regiones transmembrana ni citoplasmática para el correcto plegamiento del ectodominio de la proteína F del VRSH.

La proteína F sin las regiones transmembrana y citoplasmática del virus de la parainfluenza humana de tipo 2 (VPIH-2) se expresa y se procesa dando lugar a las cadenas F1 y F2 (Tong y Compans, 2000). Dicha proteína, al igual que la estudiada en el presente trabajo, también se excreta al medio extracelular y forma trímeros. Cuando se elimina únicamente la región citoplasmática, la proteína se expresa en la superficie y es capaz de inducir la fusión de membranas (Yao y Compans, 1995). Con la proteína F del virus de las paperas también se ha conseguido un mutante sin las regiones transmembrana y citoplasmática que se expresa, procesa y oligomeriza correctamente (McAleer y Rima, 2000). La proteína de fusión del virus del sarampión, en la cual se le introduce un codon de terminación que elimina los 24 últimos aminoácidos (región citoplasmática), es capaz de formar partículas infectivas (Cathomen y col., 1998). En la proteína F del virus simio 5 se ha preparado un mutante sin la región citoplasmática (Bagai y Lamb, 1996) que oligomeriza, se glicosila y se procesa igual que la proteína completa. En el virus Sendai, una proteína de fusión con sólo los 4 primeros residuos de la región citoplasmática es capaz de formar viriones infectivos (Fouillot-Coriou y Roux, 2000).

Todos estos resultados sugieren que las proteínas F de los paramixovirus no requieren las regiones citoplásmica y transmembrana para el correcto plegamiento de sus correspondientes ectodominios. Sin embargo, esto no es así para todas las proteínas F de los paramixovirus. Así, en la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle, la eliminación de la región citoplasmática conlleva una reducción muy importante de la capacidad de procesamiento proteolítico de la proteína (Sergel y Morrison, 1995). La proteína F del virus de la parainfluenza humana de tipo 3 (VPIH-3), desprovista de la región citoplásmica, no se expresa en la superficie, probablemente por un plegamiento incorrecto (Yao y Compans, 1995).

Proteínas de fusión de otros virus se pliegan incorrectamente si se les introducen mutaciones en las regiones citoplasmática o transmembrana, o se eliminan estas regiones (Doms y Helenius, 1988; Rose y Doms, 1988). Por ejemplo, se han

Discusión

preparado proteínas de fusión del virus de la gripe (HA) de las cepas X31/A/Aichi/68 (subtipo H1) y A/Japan/305/57 (subtipo H2) en las cuales se han eliminado las regiones transmembrana y citoplasmática. La proteína de la cepa X31/A/Aichi/68 no oligomeriza y se presenta como un monómero parecido estructuralmente al de la HA completa, pero no igual, como se puede comprobar por la pérdida de reactividad con AcMs específicos de los trímeros de HA, ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y cambios en la susceptibilidad a la digestión con tripsina. La proteína HA de la cepa A/Japan/305/57 sin las regiones transmembrana y citoplasmática también se mantiene mayoritariamente en forma monomérica (Singh y col., 1990). En la proteína gp41 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 2 (VIH-2), mutaciones en la región transmembrana impiden la correcta oligomerización de la proteína (Center y col., 1997). La proteína env del virus de la inmunodeficiencia simia (VIS) sin la región citoplásmica tampoco adquiere la conformación adecuada (Spies y col., 1994). La proteína G del virus de la rabia sin las regiones transmembrana y citoplasmática no adquiere la misma conformación que la proteína completa (Gaudin y col., 1999). Por último, en la proteína G del virus de la estomatitis vesicular, cuando se la elimina la región citoplasmática, se produce un plegamiento incorrecto (Rose y Bergmann, 1983).

También existen ejemplos de otras proteínas virales encargadas de la fusión que se pliegan correctamente sin las regiones transmembrana y citoplasmática, como la proteína env del virus del sarcoma de Rous (Eingfeld y Hunter, 1988) o la proteína env del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (Earl y col., 1990).

Todos estos datos muestran que las regiones transmembrana y citoplasmática no son necesarias en el plegamiento de la mayoría de las proteínas F de los paramixovirus, pero que, en cambio, sí son necesarias en muchas otras proteínas virales encargadas de la fusión. De este modo se puede concluir que, aunque el plegamiento de los distintos dominios de las glicoproteínas con regiones transmembrana se realiza en compartimentos separados, sólo en algunas proteínas es independiente el plegamiento de los tres dominios.

V.1.2 ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS F Y F_{TM}-

La proteína F_{TM}- tiene forma de espícula de 16 nm de longitud y 6 nm de diámetro en la cabeza y adopta dos conformaciones morfológicamente distintas, según se pudo observar por microscopía electrónica (Figura IV.2.5), pero antigénicamente indistinguibles (apartado IV.3 de Resultados). En una de las conformaciones la proteína tiene forma de cono y en la otra de varilla con cabeza globular. Las proteínas con morfología de cono se presentan en forma individual (Figura V.1.1 B), mientras que las otras se agrupan en rosetas (Figura V.1.1 C). En la proteína F_{TM}- la única región altamente hidrofóbica que queda en la molécula es el péptido señal (Figura V.1.1 A), lo que sugiere que es esa región por la que agregan las moléculas de F_{TM}- con forma de varilla con cabeza globular (Figura V.1.1 E).

Discusión

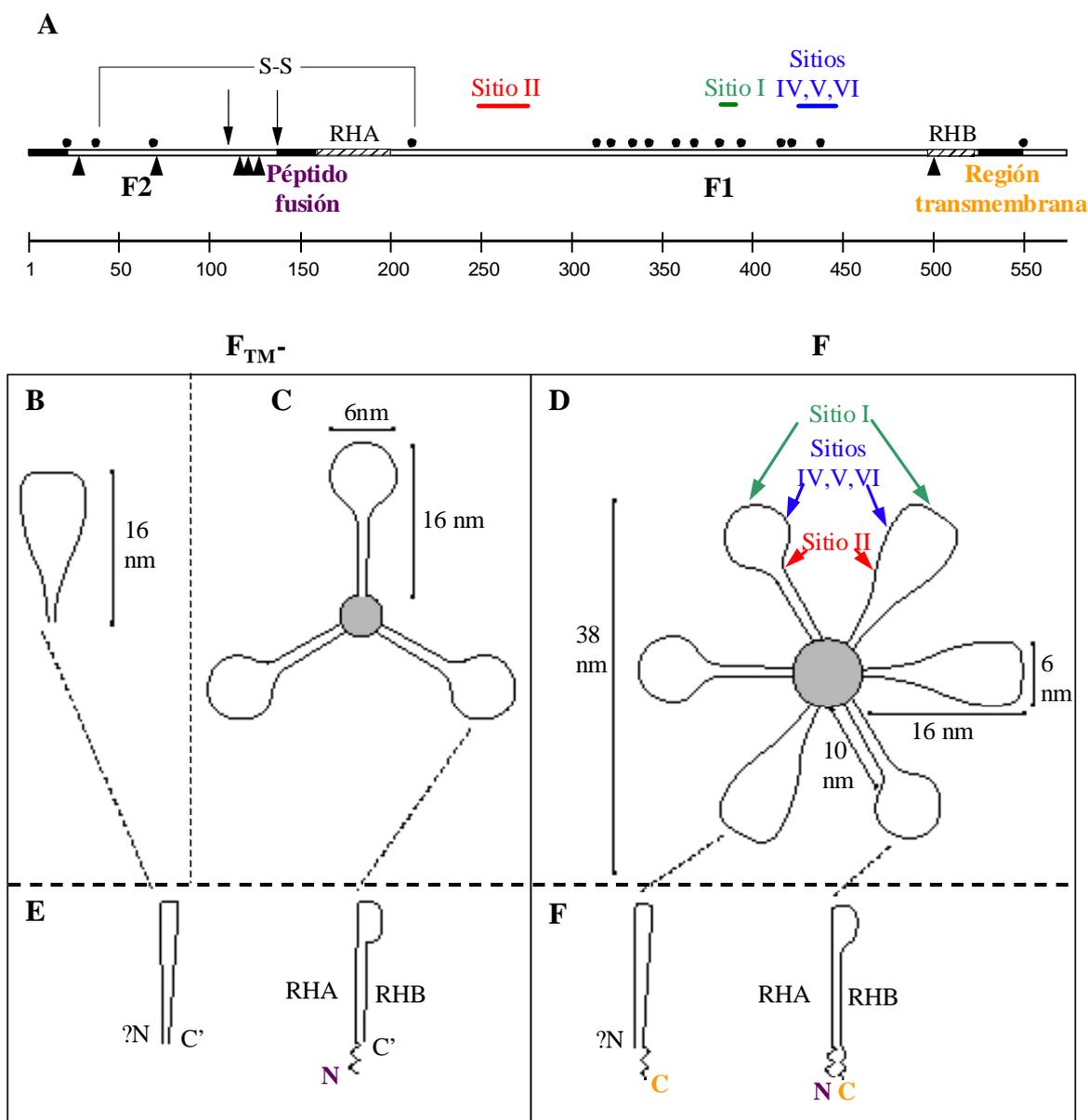


Figura V.1.1: Diagrama de la estructura primaria de la proteína F y localización de las regiones antigénicas en las espículas. A: Estructura primaria de la proteína F del VRSH. Se indican las regiones hidrofóbicas (rectángulos negros), las regiones heptádicas (RHA y RHB, rectángulos rayados), los residuos de Cys (círculos negros), los sitios potenciales de N-glicosilación (triángulos negros), los dos sitios de procesamiento (flechas negras) y la localización de los sitios antigénicos (I, II, IV, V, VI). **B: Molécula individual con forma cónica de la proteína F_{TM^-} .** Se indican las dimensiones de la proteína calculadas a partir de las imágenes de microscopía electrónica. **C: Roseta de tres moléculas de F_{TM^-} con forma de varilla con cabeza globular.** **D: Roseta de proteína F con tres moléculas con forma cónica y tres con forma de varilla con cabeza globular.** Se indica la localización de los sitios antigénicos, así como las dimensiones de la proteína calculadas a partir de las imágenes de microscopía electrónica. **E: Modelos de la cadena F1 de monómeros de proteína F_{TM^-} correspondientes a las conformaciones cónica y de varilla con cabeza globular.** Se indica la orientación antiparalela de las regiones RHA y RHB. La localización de la región N-terminal (N) en las formas cónicas no se conoce, en la conformación de varilla con cabeza globular se propone que se localice en el centro de la roseta. C' indica el extremo C-terminal de la proteína F_{TM^-} . **F: Modelos de la cadena F1 de monómeros de proteína F correspondientes a las estructuras cónica y de varilla con cabeza globular.** De igual modo que en la parte E, se representa la estructura de la cadena F1 de la proteína F. C indica el extremo C-terminal de la proteína F.

Discusión

El péptido señal de la proteína F del virus simio 5 es capaz de convertir una proteína soluble en una proteína que se une a membranas (Paterson y Lamb, 1987). También se ha observado la capacidad de unirse a membranas del péptido de fusión de la proteína F del virus Sendai mediante marcadores de fotoafinidad (Novick y Hoekstra, 1988), así como con el péptido de fusión de la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle por espectroscopía infrarroja (Brasseur y col., 1988). En proteínas de otras familias virales encargadas de la fusión de membranas, como el virus del sarcoma de Rous (env), se ha observado que un mutante soluble de la proteína, tras la interacción con su receptor, se vuelve insoluble e interacciona con membranas (Damico y col., 1998). Con la proteína HA de gripe se han obtenido resultados equivalentes a los de la proteína env; así, la proteína soluble tBHA (la proteína HA unida a membranas solubilizada por digestión con bromelina de forma que se libera el ectodominio) sufre un cambio conformacional tras su exposición a pH ácido que hace que se exponga una región hidrofóbica capaz de insertarse en liposomas (Doms y col., 1985).

Todos estos datos sugieren que las moléculas de la proteína F_{TM-} con la conformación de varilla con cabeza globular pueden estar agregando en disolución por tener expuesto el péptido señal y ser, por tanto, el estado post-activo de la proteína. En cambio, las moléculas de F_{TM-} con forma de cono, que se mantienen no agregadas en medio acuoso, deben mantener el péptido señal fuera del contacto con el medio hidrofílico (Figura V.1.1 E) y serían la conformación pre-activa de la proteína.

Las rosetas que se forman después de eliminar el detergente de las preparaciones de proteína F están formadas por espículas con forma de cono (70%) y de varilla con cabeza globular (30%), indistinguibles antigénicamente, como se esquematiza en el Figura V.1.1 D. Los dos tipos de espículas proyectan sus regiones más anchas hacia fuera de la roseta, indicando que sus regiones transmembrana están en el centro de la roseta. En las moléculas con morfología de varilla con cabeza globular, por analogía con la proteína F_{TM-} , cabe suponer que el péptido de fusión también se localice en el centro de la roseta. Esto concuerda con el hecho de que las rosetas de proteína F no agregan entre si, lo que sugiere que la región hidrofóbica que se expondría en la conformación de varilla con cabeza globular se situaría inaccesible para la unión de varias rosetas (Figura V.1.1 F).

La estructura tridimensional de la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle (Chen y col., 2001) muestra una morfología cónica de 17 nm de longitud (aunque debe ser algo más larga, ya que no se ha podido resolver la estructura de la parte inferior del cono), con una cabeza triangular de 7 nm de diámetro. Esta estructura es morfológicamente muy similar a la observada en la proteína F del VRSH. Además, se propone que la estructura resuelta de la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle sea la mezcla de las formas pre y post-activas de la proteína, lo cual está en consonancia con la alta similitud estructural encontrada entre las proteínas con conformación cónica y de varilla con cabeza globular en la proteína F del VRSH.

Las predicciones de estructura secundaria indican la presencia de dos regiones heptádicas (RH) que formarían hélices α en la cadena F1 de la proteína F del VRSH: la RHA del residuo 156 al 201 y la RHB del 488 al 516 (Zhao y col., 2000). La presencia de estas regiones heptádicas es una característica de las proteínas F de todos los paramixovirus (Chambers y col., 1990; Buckland y Wild, 1989). La estructura determinada por difracción de rayos X de complejos de péptidos de las dos regiones heptádicas de la proteína F del VRSH indica que la RHA forma un trímero de hélices α

Discusión

enrolladas entre sí, recubierto antiparalelamente por tres hélices de la RHB (Zhao y col., 2000). La longitud de la estructura formada por los péptidos de la RHA y la RHB es de 64 Å. Un resultado similar se ha obtenido con péptidos de la RHA y la RHB de la proteína F del virus simio 5 (Baker y col., 1999). Sin embargo, en el caso de los péptidos del virus simio 5, la longitud de la estructura del hexámero fue de 96 Å, que está muy próxima a la calculada para la misma molécula a partir de imágenes de microscopía electrónica (97 Å) (Dutch y col., 1999). Probablemente la diferencia de longitudes entre las estructuras de las regiones heptádicas de las proteínas F del VRSH y del virus simio 5 se deba a que el número de aminoácidos de los péptidos cristalizados fue mayor en los del virus simio 5 que en los del VRSH. Como las estructuras determinadas fueron casi superponibles (Zhao y col., 2000), si se hubiese cristalizado un número igual de aminoácidos en ambos trabajos cabría esperar que la longitud del complejo hubiese sido la misma.

La posibilidad de que el péptido de fusión sea el responsable de la formación de rosetas en la proteína F_{TM^-} , como se indica en la Figura V.1.1 E, y que en la proteína F se localice en el centro de las rosetas (Figura V.1.1 F), indica que el péptido fusión y la región transmembrana deben orientarse antiparalelamente en las moléculas de proteína F. Si esto es así, el tallo de las espículas de proteína F estaría formado por la RHA y la RHB. En la secuencia de la proteína F, la RHA y la RHB están separadas por unos 300 aminoácidos, que serían los que formarían la cabeza globular.

En la Figura V.1.1 D se muestra la localización de los sitios de unión de los AcMs observados por microscopía electrónica. El sitio antigénico II (residuos 262, 268, 272 y 275), se localiza cerca de la RHA en la estructura primaria de la proteína F y está en la base de la cabeza globular en las imágenes de inmunomicroscopía electrónica. Los sitios antigénicos IV, V y VI (residuos 429, 432, 433, 436 y 447), localizados en el lateral de la cabeza globular en las micrografías, están más cerca de la RHB en la estructura primaria de la proteína F que el sitio antigénico I (residuo 389), que, como se observa por microscopía electrónica, está en la parte superior de la cabeza globular. Estos resultados apoyan la idea de que el tallo de las espículas de proteína F esté formado por la RHA y la RHB orientadas de forma antiparalela, como se determinó mediante difracción de rayos X de los complejos de péptidos de las regiones heptádicas de las proteínas F del VRSH y del virus simio 5. Además, la localización de las regiones antigénicas de la proteína F del VRSH y de sus regiones homólogas en la estructura atómica de la proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle son muy parecidas (Chen y col., 2001). En la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle la RHA se encuentra en el tallo de la estructura y la RHB probablemente también (ver Figura I.4.5) lo que, por analogía, sugiere que esto también ocurra en la proteína del VRSH.

Por último, la longitud del tallo de las espículas de la proteína F del VRSH, determinada mediante microscopía electrónica (100 Å) (apartado de Resultados IV.2.5) está en consonancia con el tamaño obtenido mediante difracción de rayos X y microscopía electrónica de los complejos formados por péptidos de la RHA y la RHB del VRSH (64 Å) y del virus simio 5 (96 Å), con las consideraciones hechas anteriormente; así como con la longitud del tallo y el cuello en la estructura de la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle (90 Å) (ver Figura I.4.5) (Chen y col., 2001).

Discusión

La presencia de una región central de tres hélices es un elemento estructural muy conservado en proteínas de fusión virales como la gp41 del VIH-1 (Chan y col., 1997; Tan y col., 1997; Weissenhorn y col., 1997), la gp41 del VIS (Caffrey y col., 1998; Malashkevich y col., 1998; Yang y col., 1999), la HA del virus de la gripe tipo A (Bullough y col., 1994), la HEF del virus de la gripe tipo C (Rosenthal y col., 1998), la GP2 del virus Ébola (Weissenhorn y col., 1998; Malashkevich y col., 1999), la gp21 del virus de la leucemia humana tipo 1 de células T (Kobe y col., 1999) y la proteína Env-TM del virus de la leucemia murina de Moloney (Fass y col., 1996). Además, en algunas de estas proteínas (gp41, HA, F, GP2) también existe una segunda serie de regiones heptádicas que se unen antiparalelamente al núcleo central de tres hélices.

La estructura de seis hélices α superenrolladas sería la estructura final parcial de las glicoproteínas de fusión de los paramixovirus (entre ellos el VRSH) tras el cambio conformacional que se produce durante la fusión de membranas (Skehel y Wiley, 1998) por la alta estabilidad de la estructura que forman (Zhao y col., 2000; Lawless-Delmedico y col., 2000; Lamb y col., 1999; Dutch y col., 1999; Joshi y col., 1998). Esto estaría de acuerdo con la capacidad de péptidos análogos de la RHA y la RHB de inhibir la fusión en numerosos paramixovirus (Yao y Compans, 1996; Lambert y col., 1996; Wild y Buckland, 1997; Young y col., 1997, 1999; Lamb y col., 1999; Joshi y col., 1998; Ghosh y col., 1997, 1998; Ben-Efrain y col. 1999; Joshi y col., 1998; Rapaport y col., 1995), puesto que estos péptidos interferirían con la formación de la estructura final de hexámeros de la RHA y la RHB.

V.1.3 ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LA PROTEÍNA F

Las proteínas F y F_{TM}- forman oligómeros, ya que espículas de las dos conformaciones se unen, al menos, a dos AcMs, como se pudo determinar mediante inmunomicroscopía electrónica (Figura IV.3.1). Por estudios con reactivos de entrecruzamiento Collins y col. (1991) llegaron a la conclusión de que la proteína F del VRSH forma tetrámeros y Arumugham y col. (1989a) a que se compone de dímeros. Sin embargo, al microscopio electrónico, la vista superior de las espículas es triangular (Figura IV.2.5), lo que sugiere que son trímeros.

La estructura cuaternaria postulada para la proteína F de los paramixovirus se apoya en la estructura tridimensional de la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle y en los estudios de la interacción de péptidos de las regiones heptádicas (la RHA y la RHB). Como se dijo anteriormente, las estructuras que se obtienen en el VRSH, el virus simio 5 y el virus de la enfermedad de Newcastle son trímeros (Zhao y col., 2000; Baker y col., 1999; Chen y col., 2001). A esta misma conclusión se ha llegado mediante otros métodos (apartado I.4.4.2 de la Introducción) en el VRSH, el virus simio 5 y el VPIH-3 (Matthews y col., 2000; Lawless-Delmedico y col., 2000; Zhao y col., 2000; Lamb y col., 1999; Dutch y col., 1999; Joshi y col., 1998; Russell y col., 1994; Tong y Compans, 2000).

De esta forma, las imágenes de microscopía electrónica apoyan, mediante una técnica con la cual no se había estudiado hasta ahora la estructura tridimensional de proteínas F y que permite analizar la proteína completa, la estructura trimérica de la proteína F del VRSH y, en general, de los paramixovirus.

Discusión

En otras proteínas de fusión (gp41 del VIH-1, gp41 del VIS, HA del virus de la gripe A, HEF del virus de la gripe C, GP2 del virus Ébola, Env-TM del virus de la leucemia murina de Moloney, gp64 de baculovirus (Volkman y Goldsmith, 1984) y gp21 del virus de la leucemia humana tipo 1 de células T) también se ha podido determinar que su estructura tridimensional es de trímeros (Weissenhorn y col., 1999). Todo ello sugiere la existencia de un alto grado de similitud en la estructura cuaternaria de las proteínas virales de fusión.

V.2 PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA F

V.2.1 COMPARACIÓN DEL PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA F DEL VRSH CON EL DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE OTROS PARAMIXOVIRUS

Los datos presentados en el apartado IV.4 de Resultados demuestran que el precursor F0 de la proteína F del VRSH se procesa proteolíticamente en dos sitios con secuencias reconocidas por proproteínas convertasas (entre las que se encuentra la furina): el sitio I detrás del residuo 109 y el II tras el residuo 136. Además, el péptido comprendido entre ambos sitios se libera de la estructura final adoptada por la proteína madura (apartado de Resultados IV.4.4).

Este estudio se ha realizado con la proteína F de la cepa Long del VRSH, sin embargo, los sitios I y II están conservados en todas las cepas secuenciadas de la proteína F del VRSH, tanto del grupo antigénico A como del B, según se muestra en la Figura V.2.1. Por ello, el doble procesamiento proteolítico de la proteína F es presumiblemente, general para todas las cepas del VRSH. En la Figura V.2.1 se puede observar también que las secuencias de F2 comprendidas entre los sitios de procesamiento I y II presentan mayor variabilidad entre las distintas cepas del virus que las regiones que se mantienen en la proteína madura. Probablemente, la región comprendida entre los sitios I y II sirve solamente de espaciador entre dos regiones de la estructura primaria de la proteína, pero no tiene otras restricciones estructurales para su funcionalidad. Es de resaltar que el péptido señal, que no se encuentra en la proteína madura, también tiene un alto grado de variabilidad de secuencias entre las cepas del VRSH, requiriendo solo que se mantenga una secuencia altamente hidrofóbica.

El sitio de procesamiento I también se encuentra conservado en distintas cepas de la proteína F del virus respiratorio sincitial bovino (VRSB) (Figura V.2.2). De hecho, también se ha observado que la proteína F del VRSB se procesa en los sitios I y II (G. Herrler, comunicación personal). Sin embargo, las cadenas F2 de las proteínas de fusión del resto de virus de la subfamilia *Pneumovirinae* (el virus de la neumonía de ratón (VNR) y el neumovirus aviar (NVA)) no poseen esta región, apareciendo un hueco en el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de todas estas proteínas entre los sitios I y II (Chambers y col., 1992), como se puede apreciar en la Figura V.2.2.

Discusión

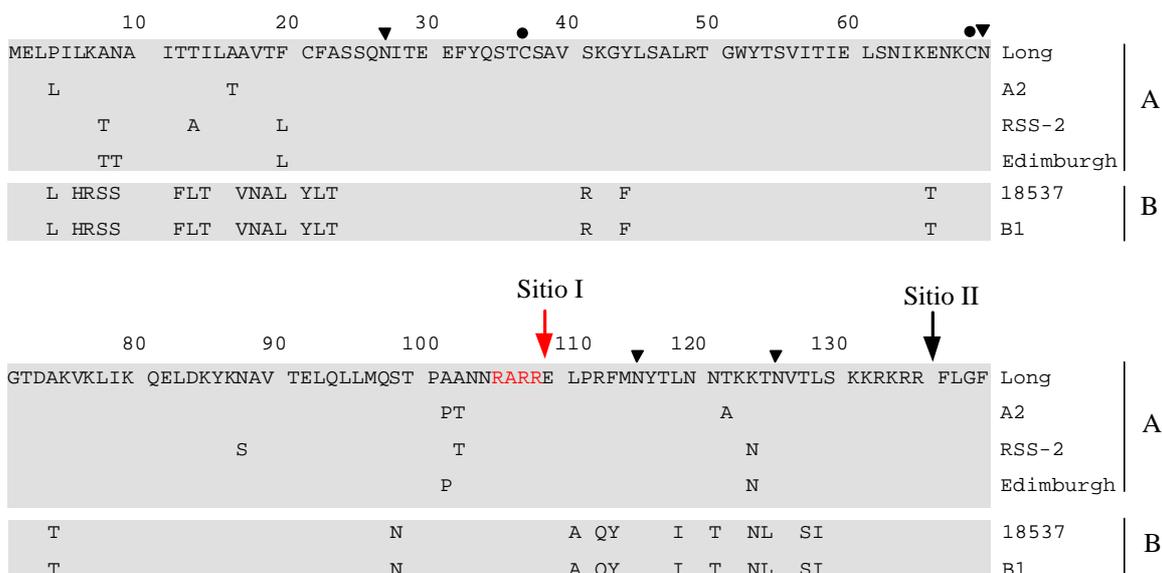


Figura V.2.1: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la cadena F2 de la proteína F de distintas cepas del VRSH. Se representa la secuencia aminoacídica de la cadena F2 de la proteína F de la cepa Long del VRSH y, debajo, los aminoácidos que varían en distintas cepas agrupadas según su grupo antigénico (A o B). En rojo se marca la secuencia de reconocimiento por furina del sitio de corte I, con flechas se indican los sitios I y II, los círculos señalan los residuos de Cys conservados y los triángulos los sitios potenciales de N-glicosilación conservados. El péptido señal está formado, probablemente, por los primeros 22 aminoácidos. Las secuencias representadas se han extraído de: López y col., 1988 (Long); Collins y col., 1984a (A2); Baybutt y Pringle, 1987 (RSS-2); Scopes y col., 1990 (Edinburgh); Johnson y Collins, 1988a (18537); y Karron y col., 1997 (B1).

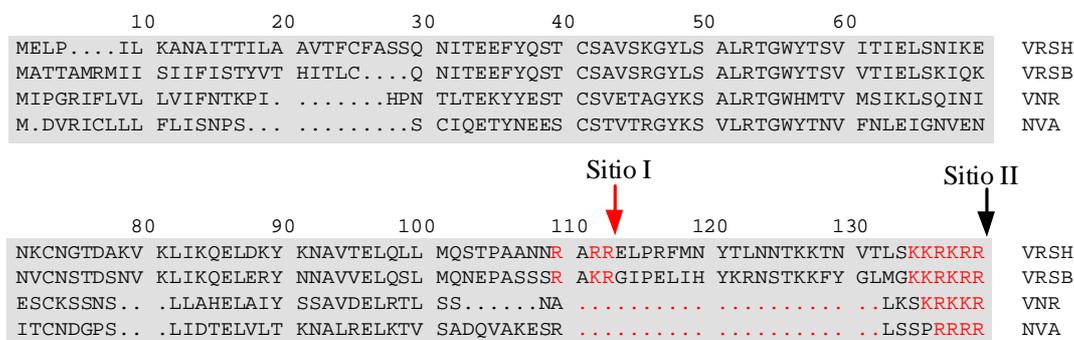


Figura V.2.2: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la cadena F2 de la proteína F de los neumovirus. Se representa el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la cadena F2 de la proteína F de la cepa Long del VRSH, la cepa RB95 del VRSB, la cepa 8 del virus de la neumonía de ratón (VNR) y la cepa UK/3B/85 del neumovirus aviar (NVA). Con puntos se indican los huecos donde no se alinea ningún residuo. En letras rojas se señala la secuencia de reconocimiento por proteasas de los sitios de corte I y II. Las secuencias representadas se han extraído de: López y col., 1988 (Long); Walravens y col., 1990 (RB94); Chambers y col., 1992 (8); y Ling y col., 1992 (UK/3B/85).

Si se compara el tamaño de la cadena F2 de la proteína F de distintos paramixovirus (Figura V.2.3) se puede observar como el número de residuos es aproximadamente el mismo entre todos los virus, excepto en el virus respiratorio

Discusión

sincicial (VRS), que es notablemente mayor (136 residuos). Pero si el VRS sufre el corte proteolítico en los sitios I y II, perdiéndose el fragmento intermedio (barra roja de 27 residuos), tendría una longitud equivalente a la del resto de paramixovirus. En esta figura no está descontado el péptido señal en ninguno de los virus, ya que se desconoce su longitud exacta; en todo caso, es probable que en todos ellos sea de un tamaño similar. Además, el alineamiento de la secuencia primaria de la proteína F del VRSH con la del virus de la enfermedad de Newcastle, el virus simio 5 y el virus Sendai presenta un hueco entre los sitios de corte I y II (Chambers y col., 1992).

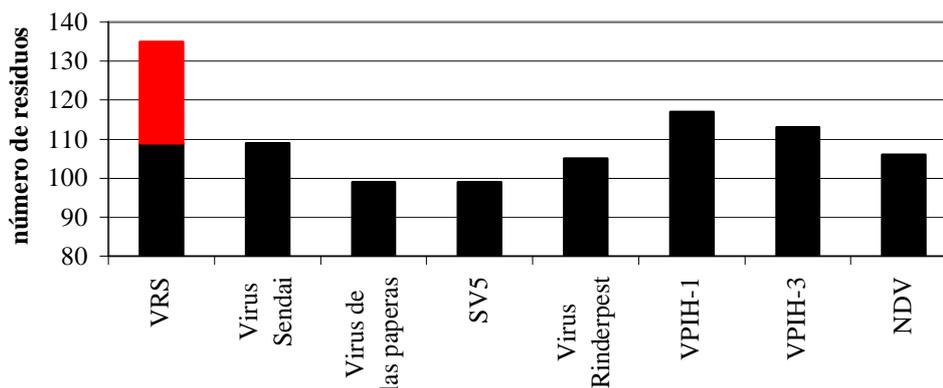


Figura V.2.3: Comparación del número de residuos de la cadena F2 de distintos paramixovirus.

La barra negra representa el número de residuos de las cadenas F2 de las proteínas F de los paramixovirus indicados en el eje de abscisas (en el VRS tras los dos cortes proteolíticos). La barra roja indica el número de residuos que se pierden tras el procesamiento en los sitios I y II en la proteína F del VRS. El número de aminoácidos de la cadena F2 de las proteínas F se extrajo de: López y col., 1988 (VRS); Walravens y col., 1990 (VRSB); Merson y col., 1988 (virus Sendai); Elliott y col., 1989 (virus de las paperas); Paterson y col., 1984 (virus simio 5, SV5); Tsukiyama y col., 1988 (virus Rinderpest); Shioda y col., 1986 (VPIH-1); Suzu y col., 1987 (VPIH-3); y Chambers y col., 1986 (virus de la enfermedad de Newcastle, NDV).

En la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle aparecen dos residuos de arginina consecutivos 16 aminoácidos antes del sitio de corte que precede al extremo N-terminal de la cadena F1. Estos dos residuos podrían estar jugando un papel similar al del sitio de corte I en la proteína F del VRSH (McGinnes y Morrison, 1986), pero hasta el momento no se ha observado que haya un doble procesamiento proteolítico en la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle. En el resto de paramixovirus no se ha encontrado una región susceptible de procesamiento por enzimas de tipo furina que pudiese sugerir un doble procesamiento proteolítico. Además, en la proteína F del virus del sarampión, una mutación en la región de procesamiento proteolítico, no produce un corte en un aminoácido más cercano del extremo N-terminal de la cadena F2, sino que parece que ocurre un procesamiento en una región situada en la cadena F1 (Alkhatib y col., 1994a). Esto mismo se puede observar en la proteína de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (Chen y col., 2001). Todo esto sugiere que el doble procesamiento proteolítico de la proteína F del VRSH puede ser peculiar entre las proteínas de fusión de los paramixovirus.

V.2.2 PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA F DEL VRSH

El sitio I probablemente sea reconocido por proteasas de la familia de las proproteínas convertasas, como la mayoría de los sitios de procesamiento de las proteínas de fusión de los paramixovirus (Klenk y Garten, 1994a). La detección del péptido N88-A107 entre los péptidos trípticos de la cadena F2 (Figura IV.4.2 D) sugiere que en el procesamiento en el sitio I puedan estar implicadas además otro tipo de proteasas. Además, no se detectó ningún péptido que contuviera los aminoácidos 108 y 109 (la furina cortaría detrás del residuo 109), lo que sugiere que, tras el corte por la proproteína convertasa, debe haber otras etapas que eliminan esos aminoácidos de la cadena F2. Algo similar ocurre en el caso de la HA del virus de la gripe (Garten y Klenk, 1983), donde, tras el corte por la proteasa tipo furina del precursor HA0, una carboxipeptidasa se encarga de eliminar los aminoácidos C-terminales de la cadena HA1.

Las formas no totalmente procesadas de la proteína F_{TM-} (F_0 y $F_{\Delta 1-109}$) están glicosiladas, como se deduce de: i) el cambio de movilidad electroforética que experimentan tras el tratamiento con N-glicosidasa-F (Figura IV.4.4); ii) la tinción con un colorante específico de azúcares (Figura IV.5.1); y iii) el marcaje de dichas formas con 3H -Glucosamina (Figura IV.4.7). La glicosilación de la forma $F_{\Delta 1-109}$ también se observa en la proteína F completa, ya que se tiñe con colorante específico de glicoproteínas (Figura IV.4.6). Esto sugiere que el procesamiento se produce después de la glicosilación, aunque no se puede excluir la posibilidad de glicosilaciones posteriores al procesamiento proteolítico.

La marcada diferencia en el tamaño entre las bandas F2 y F2* (15 kDa) (Figura IV.4.7) sugiere que la región entre los sitios I y II de procesamiento está glicosilada. En esa región existen tres sitios potenciales de N-glicosilación (Figura IV.4.1), pero sólo dos de ellos están conservados en las distintas cepas del virus (Figura V.2.1). La glicosilación de la región entre los sitios de procesamiento I y II también está de acuerdo con el hecho de que la banda $F_{\Delta 1-109}$ sufre un cambio de movilidad electroforética más acusado que la banda F1 tras su deglicosilación (Figura IV.4.4), lo que sugiere que en la primera se utilizan más sitios de glicosilación que en la segunda. La glicosilación de la región comprendida entre los sitios I y II en el precursor F_0 de la proteína puede condicionar el corte proteolítico en ambos sitios y, de esta manera, modular la maduración de la proteína F.

Los datos presentados en el apartado IV.4 de Resultados demuestran que el procesamiento de la proteína en los sitios I y II puede ocurrir independientemente. Sin embargo, parece que en condiciones normales el procesamiento ocurre de forma secuencial, primero en el sitio I y luego en el sitio II. Así, mientras que en preparaciones de proteína F o F_{TM-} se observa la presencia de la banda correspondiente al polipéptido $F_{\Delta 1-109}$ (moléculas cortadas únicamente en el sitio I) no se detecta, o está en cantidades mucho menores, la banda F2* (que vendría de las moléculas que sólo se procesasen en el sitio II). Además, en el mutante $F_{TM-\Delta 131-134}$ (donde sólo se produce el corte en el sitio I) hay una proporción pequeña de forma F_0 ; es decir, el procesamiento en el sitio I es eficiente aunque no se procese la molécula en el sitio II. Sin embargo, en el mutante $F_{TM-R108N/R109N}$ (la molécula se corta sólo en el sitio II) el procesamiento es menos eficiente y se observa una acumulación del polipéptido F_0 .

Por tanto, estos datos sugieren que la proteína F se procesa de manera secuencial, con un corte primero en el sitio I y después en el sitio II. Alternativamente, no se puede descartar que la proteína inicie su procesamiento indistintamente en los sitios I o II, pero que una vez procesada en el sitio II se produzca rápidamente el corte en el sitio I.

V.3 ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA F

V.3.1 MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA F DEL VRSH

Las proteínas virales implicadas en la fusión de las membranas del virus y de la célula experimentan diversos cambios conformacionales durante su maduración y durante el proceso de fusión de membranas (Chan y Kim, 1998; Hernández y col., 1996; Lamb, 1993; Skehel y Wiley, 1998; Weissenhorn y col., 1999). En el caso de la HA del virus de la gripe, el procesamiento proteolítico del precursor HA0 supone el desplazamiento del nuevo extremo N-terminal de la cadena HA2 hacia una cavidad hidrofóbica presente en el tallo del trímero de HA, mientras que la gran mayoría de la molécula no sufre cambios importantes. Esta relocalización del péptido de fusión sitúa a la molécula en un estado metaestable (Carr y col., 1997; Carr y Kim, 1993; Ruigrok y col., 1986) que puede evolucionar hacia otras conformaciones más estables inducidas a pH ácido.

Cuando la HA se une a ácido siálico en la superficie de la célula se induce la internalización de la partícula viral en vesículas endocíticas. Estas vesículas experimentan una acidificación tras su fusión con liposomas. La caída del pH induce un cambio de conformación en la HA, que incluye la formación de un trímero de cadenas de hélices α superenrolladas, a partir de dos hélices α separadas en cada cadena de HA2. Esto hace que el péptido de fusión (situado en el extremo N-terminal de la cadena HA2) se relocalice a 100 Å de su posición inicial (Bullough y col., 1994; Chen y col., 1999). Al mismo tiempo, la parte C-terminal de la cadena HA2 se sitúa alrededor del trímero de hélices α , de tal manera que los extremos N- y C-terminales de la cadena HA2, unidos a las membranas celular y viral respectivamente, quedan próximos uno del otro, lo que favorece la fusión de ambas membranas.

Otras proteínas virales de fusión, como la del virus de la estomatitis vesicular y la del virus del bosque Semliki (Hernández y col., 1996), también se activan tras la exposición a un medio ácido. En el caso de las proteínas de fusión de retrovirus también se han observado cambios conformacionales, en este caso a pH neutro, tras la interacción de dichas proteínas con sus receptores. Los cambios conformacionales, en última instancia, suponen la exposición del péptido fusión (Damico y col., 1998; Furuta y col., 1998; Hernández y col., 1997; Moore y col., 1990) y la fusión de membranas.

El agente que dispara los cambios conformacionales en las proteínas F de los paramixovirus asociados a la fusión de membranas se desconoce. A diferencia del virus de la gripe (Skehel y Wiley, 2000), los paramixovirus fusionan sus membranas con las de la célula a pH neutro. Se ha propuesto que la interacción de la proteína de unión al

Discusión

receptor de los paramixovirus con el receptor dispara el cambio conformacional en la proteína F para que tenga lugar la fusión (Lamb, 1993). En el caso del VRSH, sin embargo, un mutante que no contiene la proteína de unión al receptor (G) ni la proteína SH es capaz de replicar eficientemente en determinadas líneas celulares y de inducir la producción de sincitios (Karger y col., 2001; Karron y col., 1997). Además, en nuestro laboratorio se ha observado que la transfección de células BHK con un plásmido que expresa la proteína F es suficiente para que se produzcan sincitios. El procesamiento proteolítico de la proteína F de los paramixovirus, entre ellos el VRSH, es imprescindible para que se produzca la fusión de membranas y es un determinante de la patogenicidad viral (Lamb y Kolakofsky, 1996; Scheid y Choppin, 1977; Lamb, 1993; Nagai, 1993).

Los resultados de este trabajo sugieren que el procesamiento proteolítico de la proteína F del VRSH, los cambios en su morfología observados al microscopio electrónico, la formación de rosetas y la capacidad de fusionar membranas podrían estar directamente relacionadas. En este sentido, resultados obtenidos en el laboratorio indican que mutantes de la proteína F alterados en los sitios de procesamiento I o II son deficientes en la inducción de sincitios en células BHK transfectadas con plásmidos que codifican dichas proteínas (B. Ruiz, comunicación personal). Así se plantea la cuestión: ¿es el procesamiento en los sitios I y II de la proteína F del VRSH el evento que dispara el cambio conformacional en la proteína y que conduce a la fusión de membranas?

Las preparaciones de proteína F_{TM^-} purificada poseen un número significativo de moléculas no procesadas en el sitio II (forma $F_{\Delta 1-109}$) o sin procesar en ninguno de los dos sitios (forma F0). Al tratar la proteína F_{TM^-} con tripsina, en condiciones en las cuales los intermedios $F_{\Delta 1-109}$ y F0 se digieren dando lugar a proteínas totalmente procesadas, la proteína se agrega mayoritariamente en rosetas y cambia su forma de cono a la de varilla con cabeza globular (Figura IV.5.4). Las rosetas de proteína F_{TM^-} , como se ha comentado anteriormente, se forman probablemente como consecuencia de la exposición del péptido de fusión al medio acuoso, ya que es la principal zona hidrofóbica que queda en la molécula de F_{TM^-} .

Resultados equivalentes, tras la digestión de las formas no totalmente procesadas, se obtuvieron con la proteína F. En este caso, el procesamiento de las formas F0 y $F_{\Delta 1-109}$ dio lugar a la aparición de agregados de mayor tamaño (Figura IV.5.8), compuestos casi en su totalidad por moléculas con forma de varilla con cabeza globular (Figura IV.5.9). El mayor tamaño de las rosetas tras la digestión con tripsina se podría deber a que el péptido de fusión ahora estaría expuesto en la mayoría de las moléculas, con lo que en el interior de la roseta existiría un mayor contenido hidrofóbico que cuando sólo estaba expuesta la región transmembrana en la mayor parte de los monómeros, lo que generaría la necesidad de una mayor protección del entorno acuoso.

Como se puede observar en el porcentaje de cada banda (F1, $F_{\Delta 1-109}$ y F0), respecto a la cantidad total de proteína F_{TM^-} en cada una de las fracciones de un gradiente de sacarosa de la proteína F_{TM^-} (Figura IV.5.3 C), las formas no procesadas en el sitio II (F0 y $F_{\Delta 1-109}$) migran preferentemente en las fracciones superiores (fracción 4). Cuando se observan al microscopio electrónico, las proteínas de esta fracción se encuentran mayoritariamente en moléculas individuales de forma cónica. En cambio, en las fracciones con mayor porcentaje de sacarosa, en las cuales la proteína está mayoritariamente en estado agregado y tiene la conformación de varilla con cabeza

Discusión

globular, la cantidad de proteína no procesada disminuyó notablemente (Figura IV.5.3 C). Estos datos sugieren la existencia de una relación entre la presencia de formas no procesadas en el sitio II y las moléculas con forma de cono.

En las fracciones superiores del gradiente de la proteína F_{TM^-} (Figura IV.5.3 A) se puede observar también una importante presencia de moléculas de proteína totalmente procesada (banda de F1), lo que sugiere que, al menos parte de los conos, están formados por moléculas cuyos monómeros están procesados. Esto sugiere que el cambio conformacional de conos a varillas con cabeza globular se produce cuando los tres monómeros del trímero están procesados. En la proteína HA del virus de la gripe el cambio conformacional en el trímero inducido por el pH ácido es cooperativo (Boulay y col., 1988; Carr y Kim, 1993), lo que, por analogía, sugiere que también sea así en la proteína F y que sea necesario el procesamiento proteolítico de las tres subunidades para disparar el cambio estructural. Los resultados expuestos en la Figura IV.4.11 sugieren que se produce la cooligomerización de, al menos, una de las formas no procesadas en el sitio II con la molécula totalmente procesada. Esta cooligomerización de formas no totalmente y totalmente procesadas también se ha observado en la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle (Li y col., 1998a).

La proteína $F_{TM^-}\Delta 131-134$ aparece al microscopio electrónico como conos no agregados (apartado IV.5.3 de Resultados), lo que sugiere que las formas procesadas únicamente en el sitio I se encuentran en forma cónica. En cambio, cuando la proteína se procesa sólo en el sitio II, se produce el cambio conformacional apareciendo moléculas con forma de varilla con cabeza globular en estado agregado, como se pudo determinar con el mutante $F_{TM^-}R108N/R109N$ (apartado de Resultados IV.5.3). Estos datos se esquematizan en el modelo de la Figura V.3.1, dónde se sugiere que el procesamiento de la proteína F_{TM^-} en el sitio II es el responsable del cambio conformacional. Así surge la cuestión del papel del sitio I en la activación de la proteína. Como se ha discutido anteriormente (apartado V.2.2), probablemente el procesamiento sea secuencial y primero se dé en el sitio I y después en el sitio II. La función del procesamiento en el sitio I podría ser hacer accesible el sitio II, que previamente estaría protegido. En este sentido, el mutante $F_{TM^-}R108N/R109N$ presente un porcentaje menor de moléculas en estado post-activo que la proteína F_{TM^-} . De este modo se podría conseguir que un porcentaje de moléculas adecuado llegasen a los viriones en condiciones de fusionar.

Si efectivamente la proteína se activa tras el corte proteolítico, la inactivación de la proteína F podría ocurrir antes de que la proteína alcanzase la membrana celular. Tal vez, el cambio conformacional se produzca lentamente y la exposición del péptido de fusión tarde en producirse, asegurando que, por un tiempo suficiente, un número considerable de moléculas puedan mantenerse en el estado pre-activo y mantener la infectividad del virus. Otra posibilidad es que, en el proceso de activación, el cambio conformacional tras el procesamiento proteolítico, esté estimulado por el reconocimiento de la membrana diana por la cadena F2 o por otra región de la proteína F (recientemente Karger y col. (2001) han observado la capacidad de unión de la proteína F del VRSB a proteoglicanos).

El procesamiento proteolítico de algunas proteínas de fusión es uno de los factores fundamentales en la patogenicidad del virus (Klenk y Garten, 1994a). En el caso de gripe, la facilidad de procesar la HA se correlaciona claramente con su patogenicidad (Steinhauer, 1999; Perdue y col., 1997; Deshpande y col., 1987). Para la

Discusión

HA del virus de la gripe de ave, por ejemplo, inserciones en el sitio de corte aumentan la capacidad de procesamiento de la proteína y la virulencia del virus en pollos (Khatchikian y col., 1989). En el virus simio 5, la inclusión de aminoácidos en el extremo C-terminal de la cadena F2, produce una pérdida de actividad de la proteína F (Paterson y col., 1989). Por analogía, las secuencias localizadas entre los sitios I y II podrían conferir unas propiedades patogénicas únicas al VRS humano y bovino. En este sentido, se ha podido observar que, mutaciones en los sitios potenciales de N-glicosilación comprendidos entre el sitio I y el II, afectan a la capacidad fusogénica de la proteína F del VRSH, a pesar de no encontrarse en la proteína madura (Zimmer y col., 2001).

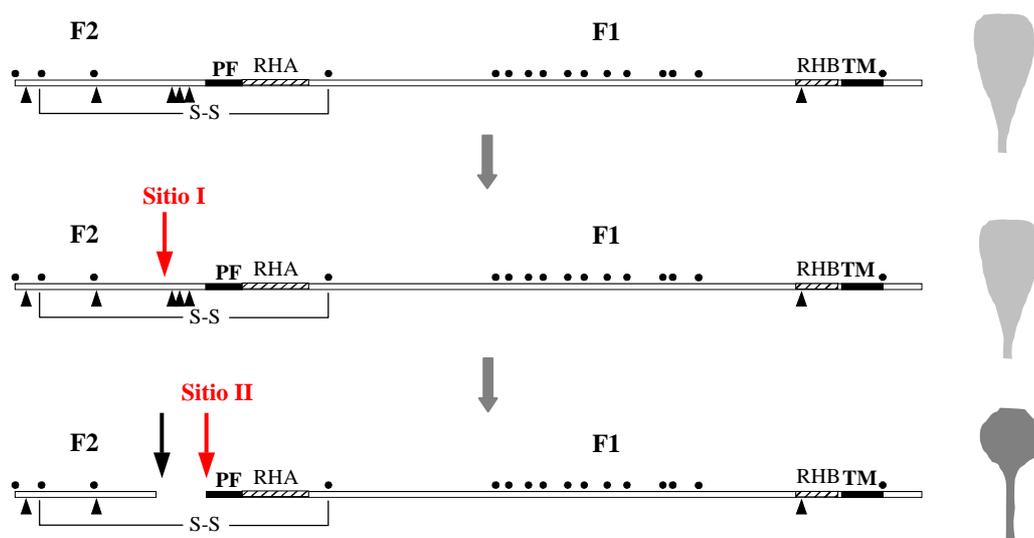


Figura V.3.1: Modelo de activación de la proteína F del VRSH. La activación sería un proceso secuencial en el cual, tras el corte proteolítico en el sitio I, se produciría el corte en el sitio II. Este segundo procesamiento en los tres monómeros del trímero, daría lugar al cambio conformacional entre el estado pre-activo (trímeros con morfología cónica) y post-activo (trímeros con forma de varilla con cabeza globular).

Otro factor a considerar es que se ha propuesto (Collins y Mottet, 1991) que la proteína F no procesada no está presente en la superficie de células infectadas con el VRSH, lo que sería incompatible con la hipótesis expuesta en el presente trabajo. Sin embargo, en la Figura IV.4.5 se observa la presencia de la forma $F_{\Delta 1-109}$ en viriones del VRSH. Los resultados de Collins y Mottet podrían deberse a que en la superficie de las células infectadas la cantidad de formas no totalmente procesadas es pequeña y estuviese por debajo del umbral de detección. Además, en las proteínas F de otros paramixovirus, como el virus simio 5 (Paterson y col., 1989; Ward y col., 1995; Dutch y col., 2001) y el virus de la enfermedad de Newcastle (Li y col., 1998a), las proteínas no procesadas se expresan en la superficie.

Así, la ausencia de infectividad en un alto porcentaje de los viriones del VRSH se puede deber en parte a una baja concentración de moléculas de proteína F no totalmente procesadas. En todo, caso no es de esperar una alta concentración total de

formas no procesadas en los viriones, lo que sugiere que sean necesarios pocos trímeros para la formación del poro de fusión o que los trímeros en estado pre-activo se localicen en regiones determinadas de la envuelta viral.

V.3.2 ANALOGÍAS Y DIFERENCIAS ENTRE LOS MECANISMOS DE FUSIÓN DE LOS PARAMIXOVIRUS

La siguiente cuestión que surge es si el modelo de activación propuesto para la proteína F del VRSH es aplicable al resto de paramixovirus. Como se ha comentado anteriormente, las proteínas de fusión de esta familia guardan una similitud estructural muy alta entre si, lo que sugiere que su activación para la fusión de membranas venga desencadenada por un mismo evento, el procesamiento proteolítico de la proteína.

Se ha podido observar que en la proteína F del virus Sendai se produce un cambio conformacional después del corte proteolítico que supone la exposición de una región hidrofóbica y el aumento del contenido de hélices α (Hsu y col., 1981), datos que serían compatibles con un cambio conformacional similar al encontrado en la proteína F del VRSH. Además, si se hace una digestión parcial del virus Sendai con tripsina (en la cual no se ve afectada la otra glicoproteína, HN) el virus se activa sin que aparezcan cambios en el comportamiento electroforético de la proteína F, aunque esta activación también se puede observar con el tratamiento de los viriones con quimotripsina, Arg-C o Lys-C, que tienen secuencias de corte distintas a la tripsina (Tomasi y col., 1998). En la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle, la estructura del polipéptido F0 y de la proteína procesada es distinguible por reactividad con AcMs (Umino y col., 1990) y por un cambio de carga en la proteína atribuible a la eliminación del péptido básico que quedaría en el extremo C-terminal de la cadena F2 (Kohama y col., 1981). En esta proteína el procesamiento en el residuo 22 de la cadena F1 también se ha propuesto que produzca el cambio conformacional entre las formas pre y post-activas (Chen y col., 2001).

En la estructura que se propone en este trabajo para la proteína F del VRSH, la RHA y la RHB estarían formando el tallo de las espículas en el estado pre-activo (moléculas con forma de cono) y en el post-activo (moléculas con forma de varilla con cabeza globular). Pero, probablemente, sólo formen el complejo de seis hélices superenrolladas descrito anteriormente (apartado V.1.2) tras el procesamiento proteolítico de la proteína que supondría el cambio conformacional que terminaría en el estado post-activo, como se deduce de la capacidad de inhibición de la fusión de péptidos de la RHB (Lambert y col., 1996). En el caso del virus simio 5 se ha descrito que anticuerpos dirigidos contra la RHA y la RHB son capaces de unirse a moléculas no procesadas de proteína F, pero no a las moléculas procesadas. Esto sugiere que, como en el caso del VRSH, hay un cambio conformacional asociado al procesamiento proteolítico de la proteína F; este cambio implicaría la interacción de la RHA y la RHB impidiendo la interacción de los anticuerpos dirigidos contra la RHA y la RHB (Dutch y col., 2001). Todos estos datos están en consonancia con que el VRSH, el virus Sendai, el virus de la enfermedad de Newcastle y el virus simio 5 se activen tras un procesamiento proteolítico.

Anteriormente se comentó que, después del procesamiento proteolítico, el cambio conformacional se podría producir lentamente (la energía de activación del

Discusión

proceso sería alta), esta posibilidad estaría de acuerdo con una serie de experimentos en los cuales cambios en el medio (temperatura, pH), que podrían disminuir la energía de activación, produjeran cambios conformacionales en las proteínas de fusión de paramixovirus. Una segunda interpretación de estos experimentos sería que el procesamiento y la activación de la proteína son etapas independientes.

En la proteína F del virus Sendai se ha observado que su preincubación a 50°C produce cambios en la susceptibilidad a la digestión con Proteinasa K, este proceso parece estar asociado a una mayor capacidad de fusionar membranas por los viriones (Wharton y col., 2000). Además, se ha podido observar un aumento de la actividad fusogénica del virus al exponerlo a pH básico, lo que se relaciona con un cambio conformacional en la proteína F (Hsu y col., 1982); pero este cambio conformacional parece ser distinto del que se produce al procesarse la proteína, comentado anteriormente, ya que no supone la exposición de más zonas hidrofóbicas. En el virus de la enfermedad de Newcastle se ha observado un aumento de la capacidad fusogénica del virus a pH ácido (San Román y col., 1999). Por último, en el virus simio 5 también se aumenta la capacidad fusogénica al aumentar la temperatura, proceso que estaría relacionado con la proteína F (Paterson y col., 2000).

En todo caso, existen numerosos resultados que podrían sugerir que el mecanismo de fusión de los paramixovirus presenta diferencias entre las distintas proteínas de fusión. Por ejemplo, péptidos de la RHA y la RHB de la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle sólo inhiben la fusión si se añaden antes de que se produzca el procesamiento proteolítico de la proteína y no cuando este ya se ha producido (Young y col., 1999, 1997), lo que sugiere que la región a la que se uniría el péptido sintético (presumiblemente la RHA o/y la RHB) sólo es accesible antes de que la proteína se procese. Sin embargo, la necesidad de que no se haya producido el corte proteolítico de la proteína para que se produzca la inhibición por péptidos de la RHA y la RHB no se observa en otros paramixovirus, como en el VRSH, el VPIH-3, el del sarampión (Lambert y col., 1996), el simio 5 (Lamb y col., 1999; Joshi y col., 1998), el VPIH-2 (Yao y Compans, 1996) y el Sendai (Ghosh y col., 1997, 1998; Ben-Efrain y col., 1999).

En la proteína F del VRSH la región entre el péptido de fusión y la RHA parece ser flexible, aunque caben otras interpretaciones de los resultados de resistencia a digestiones enzimáticas del complejo formado por péptidos sintéticos de la RHA y la RHB (Matthews y col., 2000). Esta flexibilidad también se observa en otras proteínas de fusión virales, como la HA del virus de la gripe y la gp41 del VIH-1, donde existen 12-16 aminoácidos entre el péptido de fusión y la RHA y 18-37 residuos entre la región transmembrana y la RHB respectivamente. En la proteína de fusión del virus simio 5 esto no sería así, sino que la hélice que forma la RHA continuaría hasta el péptido de fusión y no existiría dicha flexibilidad (Baker y col., 1999), además, sólo existen 8 aminoácidos entre la RHB y la región transmembrana, los cuales se pueden eliminar sin que ello afecte a la fusión (Zhou y col., 1997). Este hecho tiene implicaciones en el mecanismo de fusión que diferenciarían al VRSH y al virus simio 5 (Baker y col., 1999).

Otro elemento diferenciador entre los mecanismos de fusión de los paramixovirus es el hecho de que para algunos parece ser necesaria la presencia de la proteína de unión a receptor, como en el virus de la enfermedad de Newcastle (Morrison y col., 1991; Horvarth y col., 1992; Sergel y col., 1993), el VPIH-2 (Hu y col., 1992;

Discusión

Heminway y col., 1994b), el virus de las paperas (Tanabayashi y col., 1992) y el virus bovino de la parainfluenza tipo 3 (Sakai y Shibuta, 1989); mientras que en otros no ocurre esto, como en el VRSH (Karger y col., 2001; Olmsted y col., 1986), el virus simio 5 (Paterson y col., 1985; Horvarth y col., 1992; Ward y col., 1995; Dutch y col., 1998; Ito y col., 1997), el VPIH-3 (Spriggs y col., 1987; Horvarth y col., 1992), el virus Sendai (Gibson y col., 1988; Bagai y col., 1993) y el virus del sarampión (Alkhatib y col., 1994a). Aunque habría que tener en cuenta las consideraciones expuestas en el apartado I.5 de la Introducción, que podrían implicar que dichas diferencias realmente no existiesen. Para los paramixovirus que necesitan la presencia de las proteínas de fusión y de unión al receptor para fusionar, se propone que un cambio conformacional en la proteína de unión al receptor sea el desencadenante del cambio conformacional en la proteína F; mientras que en los que no necesitan la presencia la proteína de unión al receptor el mecanismo tiene que ser distinto (Lamb, 1993).

Además, el mecanismo de fusión que se propone en el virus Sendai (Ben-Efraim y col., 1999; Peisajovic y col., 2000) incluye la participación de un segundo péptido de fusión en la cadena F1 que estaría jugando un papel importante en la fusión de membranas (Peisajovich y col., 2000; Ghosh y col., 2000; Blumberg y col., 1985). Este nuevo péptido de fusión también se ha encontrado en el virus de sarampión (Peisajovich y col., 2000) y puede que aparezca una zona homóloga en el virus de la enfermedad de Newcastle (Chen y col., 2001), aunque no se ha encontrado en el VRSH ni en otros paramixovirus. El segundo péptido de fusión estaría acompañado de una tercera región heptádica, que puede formar una cremallera de leucinas, y está muy conservada en distintas cepas del virus Sendai. Además también se encuentra (al menos las Leu e Ile de la putativa cremallera de leucinas) en los virus simio 5, Rinderpest, del sarampión y parainfluenza (Ghosh y col., 1997). Péptidos de esta tercera región heptádica pueden inhibir la fusión en el caso del virus Sendai, lo que sugiere que puede jugar un papel importante en la fusión (Ghosh y col., 1997; Ghosh y Shai, 1998). En la proteína F del VRSH y de otros paramixovirus no se ha encontrado ninguna región equivalente, aunque el péptido 255-275 de la cadena F1 de la proteína adopta una conformación de hélices α (Torion y col., 1995), lo que sugiere que esa región podría estar desempeñando el papel de la tercera región heptádica encontrada en otros paramixovirus.

Por último, en la proteína F del VRSH aparecen elementos que, hasta el momento, no se han encontrado en otros paramixovirus. Por un lado está el doble procesamiento proteolítico descrito en este trabajo. Por otro, la estructura primaria de la proteína F del VRSH presenta el grado de homología más bajo (menos del 20%) respecto al resto de proteínas de fusión de los paramixovirus (Morrison y Porter, 1991; Baker y col., 1999). Por último, en la proteína F del VRSH aparece una región heptádica en la cadena F2 (Lambert y col., 1996) que sólo se ha encontrado homólogo en la proteína F del virus de la enfermedad de Newcastle (Chen y col., 2001), aunque hasta el momento se desconoce su función.

Resumiendo, estos datos no están en contradicción con que el procesamiento proteolítico sea el evento que dispare el cambio conformacional en las proteínas F de los paramixovirus y no sólo en el VRSH, por lo tanto se propone como hipótesis de trabajo que el procesamiento proteolítico dispare el cambio conformacional entre los estados pre y post-activos en los paramixovirus. En todo caso es posible que en esta familia exista más de un mecanismo por el cual se lleve a cabo la fusión de membranas. La

Discusión

existencia de mecanismos de fusión distintos no sería algo extraño; por ejemplo, en la proteína HA del virus de la gripe se han encontrado diferencias entre los cambios conformacionales que se producen en los subtipos H3 y H2 (Puri y col., 1990), lo que sugiere que puedan existir diferencias incluso más drásticas entre proteínas de virus distintos.

VI. CONCLUSIONES

Conclusiones

- Las regiones transmembrana y citoplasmática son dispensables para el correcto plegamiento del ectodominio de la proteína F del VRSH.
- Las proteínas F y F_{TM-} forman espículas de 16 nm de longitud con una cabeza de 6 nm de diámetro. El tallo está formado, presumiblemente, por las regiones heptádicas A y B de la cadena F1 orientadas antiparalelamente. Los aminoácidos situados entre ambas regiones heptádicas, en la estructura primaria de la proteína, forman la cabeza globular de las espículas.
- Las proteínas F y F_{TM-} del VRSH adoptan dos conformaciones distinguibles por microscopía electrónica: conos y varillas con cabeza globular. En la proteína F_{TM-}, la primera conformación es soluble en medio acuoso, mientras que la segunda forma rosetas. Se propone que la conformación de varilla con cabeza globular sea el estado post-activo de la proteína, mientras que la conformación cónica sea el estado pre-activo.
- Las proteínas F y F_{TM-} del VRSH son homotrimeros, como se deduce de su apariencia al microscopio electrónico.
- Las proteínas F y F_{TM-} del VRSH, durante su maduración proteolítica, experimentan dos cortes proteolíticos en zonas reconocidas por enzimas de tipo furina y no sólo uno como estaba descrito hasta ahora. El procesamiento se produce tras el residuo 109 (sitio I) y tras el residuo 136 (sitio II). El péptido entre los dos sitios de corte no está en la proteína madura.
- El nuevo sitio de procesamiento (sitio I) se encuentra conservado en todas las cepas del VRSH y del VRSB. El doble procesamiento daría lugar a una cadena F2 de un tamaño similar a la del resto de cadenas F2 de los paramixovirus (dónde sólo está descrito un corte proteolítico).
- Las proteínas no totalmente procesadas (F0 y F_{Δ1-109}) están glicosiladas. Además, el péptido comprendido entre los sitios de procesamiento I y II también se encuentra glicosilado.
- El corte en el sitio I se puede producir independientemente del procesamiento en el sitio II y viceversa. Sin embargo, los datos obtenidos sugieren que primero se produce el procesamiento en el sitio I y, posteriormente, en el II.
- El procesamiento en el sitio II es suficiente para producir un cambio conformacional en la proteína F_{TM-}, que hace que ésta pase de tener una forma cónica a otra de varilla con cabeza globular.
- En la proteína F_{TM-}, los trímeros con forma cónica pueden contener algún monómero en el que el procesamiento en el sitio II no se haya producido. Las moléculas con forma de varilla con cabeza globular están, posiblemente, compuestas por trímeros de monómeros totalmente procesados.

Conclusiones

- Se propone que el procesamiento proteolítico de la proteína F es el evento que dispara el cambio conformacional entre el estado pre-activo y el post-activo de la proteína F del VRSH.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- **Ahmadian, G., Chambers, P., Easton, A. J.** (1999). Detection and characterization of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses. *J. Gen. Virol.* **80**, 2011-2016.
- **Akerlind, B., Norrby, E., Örvell, C., Mufson, M. A.** (1988). Respiratory syncytial virus: heterogeneity of subgroup B strains. *J. Gen. Virol.* **69**, 2145-2154.
- **Alkhatib, G., Briedis, D. J.** (1988). High-level eucaryotic in vivo expression of biologically active measles virus hemagglutinin by using an adenovirus type 5 helper-free vector system. *J. Virol.* **62**, 2718-2727.
- **Alkhatib, G., Roder, J., Richardson, C., Briedis, D., Weinberg, R., Smith, D., Taylor, J., Paoletti, E., Shen, S.-H.** (1994a). Characterization of a cleavage mutant of the measles virus fusion protein defective in syncytium formation. *J. Virol.* **68**, 6770-6774.
- **Alkhatib, G., Shen, S., Briedis, D., Richardson, C., Massie, B., Weinberg, R., Smith, D., Taylor, J., Paoletti, E., Roder, J.** (1994b). Functional analysis of N-linked glycosylation mutants of the measles virus fusion protein synthesized by recombinant vaccinia virus vectors. *J. Virol.* 1522-1531.
- **Anderson, L. J., Hendry, R. M., Pierik, L. T., Tsou, C., McIntosh, K.** (1991). Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* **163**, 687-692.
- **Anderson, L., Hierholzer, J. C., Tsou, C., Hendry, R. M., Fernie, B., F., Stone, Y., McIntosh, K.** (1985). Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* **151**, 626-633.
- **Anderson, L. J., King, A. M., Lerch, R. A., Wertz, G. W.** (1992a). Polylactosaminoglycan modifications of the respiratory syncytial virus small hydrophobic (SH) protein: a conserved feature among human and bovine respiratory syncytial viruses. *Virology* **191**, 417-430.
- **Anderson, K., Stott, E., J., Wertz, G. W.** (1992b). Intracellular processing of the respiratory syncytial virus fusion glycoprotein: amino acid substitutions affecting folding, transport and cleavage. *J. Gen. Virol.* **73**, 1177-1188.
- **Arbiza, J., Taylor, G., López, J. A., Furze, J., Wyld, S., Whyte, P., Stott, E. J., Wertz, G., Sullender, W., Trudel, M., Melero, J. A.** (1992). Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **73**, 2225-2234.
- **Aroeti, B., Henis, Y. I.** (1991). Accumulation of Sendai virus glycoproteins in cell-cell contact regions and its role in cell fusion. *J. Biol. Chem.* **266**, 15845-15849.
- **Arumugham, R., Hildreth, S. W., Paradiso, P., R.** (1989a). Evidence that the fusion protein of respiratory syncytial virus exists as a dimer in its native form. *Archives Virol.* **106**, 327-334.
- **Arumugham, R., Seid, R. C., Jr., Doyle, S., Hildreth, S. W., Paradiso, P., R.** (1989b). Fatty acid acylation of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Biol. Chem.* **264**, 10339-10342.

Bibliografía

- **Atreya, P. L., Peeples, M. E., Collins, P. L.** (1998). The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replications. *J. Virol.* **72**, 1452-1461.
- **Bagai, S., Lamb, R. A.** (1996). Truncation of the COOH-terminal region of the paramyxovirus SV5 fusion protein leads to hemifusion but not complete fusion. *J. Cell Biol.* **135**, 73-84.
- **Bagai, S., Puri, A., Blumenthal, R., Sarkar, D. P.** (1993). Hemagglutinin-neuroaminidase enhances F protein-mediated membrane fusion of reconstituted Sendai virus envelopes with cells. *J. Virol.* **67**, 3312-3318.
- **Baker, K. A., Dutch, R. E., Lamb, R. A., Jardetzky, T. S.** (1999). Structural Basis for Paramyxovirus-Mediated Membrane Fusion. *Molecular Cell* **3**, 309-319.
- **Barr, P. J.** (1991). Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell* **12**, 1-3.
- **Basak, A., Zhong, M., Munzer, J. S., Chrétien, M., Seidah, N. G.** (2001). Implication of the proprotein convertases furin, PC5, and PC7 in the cleavage of surface glycoproteins of Hong Kong, Ebola and respiratory syncytial viruses: a comparative analysis with fluorogenic peptides. *Biochem. J.* **353**, 537-545.
- **Bastien, N., Taylor, G., Thomas, L. H., Wyld, S. G., Simard, C., Trudel, M.** (1997). Immunization with a peptide derived from the G glycoprotein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) reduces the incidence of BRSV-associated pneumonia in the natural host. *Vaccine* **15**, 1385-1390.
- **Baybutt, H. N., Pringle, C. R.** (1987). Molecular cloning and sequencing of the F and 22K membrane protein genes of the RSS-2 strain of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **68**, 2789-2796.
- **Bembridge, G. P., López, J. A., Bustos, R., Melero, J. A., Cook, R., Mason, H., Taylor, G.** (1999). Priming with a secreted form of the fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV) promotes interleukin-4 (IL-4) and IL-5 production but not pulmonary eosinophilia following RSV challenge. *J. Virol.* **73**, 10086-10094.
- **Bembridge, G. P., López, J. A., Cook, R., Melero, J. A., Taylor, G.** (1998). Recombinant vaccinia virus coexpressing the F protein of respiratory syncytial virus (RSV) and interleukin-4 (IL-4) does not inhibit the development of RSV-specific memory cytotoxic T lymphocytes, whereas priming is diminished in the presence of high levels of IL-2 or gamma interferon. *J. Virol.* **72**, 4080-4087.
- **Bembridge, G. P., Rodríguez, N., García-Beato, R., Nicolson, C., Melero, J. A., Taylor, G.** (2000). DNA encoding the attachment (G) or fusion (F) protein of respiratory syncytial virus induces protection in the absence of pulmonary inflammation. *J. Gen. Virol.* **81**, 2519-2523.
- **Ben-Efrain, I., Kligler, Y., Hermesh, C., Shai, Y.** (1999). Membrane-induced step in the activation of Sendai virus fusion protein. *J. Mol. Biol.* **285**, 609-625.
- **Bermingham, A., Collins, P. L.** (1999). The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *PNAS* **96**, 11259-11264.

Bibliografía

- **Blasco, R., Moss, B.** (1995). Selection of recombinant vaccinia viruses on the basis of plaque formation. *Gene* **158**, 157-162.
- **Blumberg, B. M., Giorgi, C., Rose, K., Kolakofsky, D.** (1985). Sequence determination of the Sendai virus fusion protein gene. *J. Gen. Virol.* **66**, 317-331.
- **Bolt, G., Pedersen, L. Ø., Birkeslund, H. H.** (2000). Cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is required for its surface expression: role of furin. *Virus Res.* **68**, 25-33.
- **Bosch, M. L.** (1989). Identification of the fusion peptide of primate immunodeficiency viruses. *Science* **244**, 694-696.
- **Boulay, F., Doms, R. W., Webster, R. G., Helenius, A.** (1988). Post-translational oligomerization and cooperative acid-activation of mixed influenza hemagglutinin trimers. *J. Cell Biol.* **106**, 629-639.
- **Bourgeois, C., Corvaisier, C., Bour, J. B., Kohli, E., Pothier, P.** (1991). Use of synthetic peptides to locate neutralizing antigenic domains in the fusion protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **72**, 1051-1724.
- **Brasseur, R., Lorge, P., Goormaghtingh, E. Ruyschaert, J. -M., Espion, D., Burny, A.** (1988). The mode of insertion of the paramyxovirus F1 N-terminus into lipid matrix, an initial step in host cell/virus fusion. *Virus Genes* **4**, 325-332.
- **Brasseur, R., Vandenbranden, M., Cornet, B., Burny, A., Ruyschaert J. M.** (1990). Orientation into the lipid bilayer of an asymmetric amphipathic helical peptide located at the terminus of viral fusion proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1029**, 267-273.
- **Buckland, R., Malvoisin, E., Beauverger, P., Wild, F.** (1992). A leucine zipper structure present in the measles virus fusion protein is not required for its tetramerization but is essential for fusion. *J. Gen. Virol.* **73**, 1703-1707.
- **Buckland, R., Wild, F.** (1989). Leucine zipper motif extends. *Nature* **338**, 547.
- **Bukreyev, A., Camargo, E., Collins, P. L.** (1996). Recovery of infectious respiratory syncytial virus expressing an additional, foreign gene. *J. Virol.* **70**, 6634-6641.
- **Bukreyev, A., Whitehead, S. S., Murphy, B. R., Collins, P. L.** (1997). Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. *J. Virol.* **71**, 8973-8982.
- **Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J., Wiley, D. C.** (1994). Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* **371** 37-43.
- **Burke, E., Dupuy, L., Wall, C., Barik, S.** (1998). Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. *Virology* **252**, 137-148.
- **Burke, E., Mahoney, N. M., Almo, S. C., Barik, S.** (2000). Profilin is required for optimal actin-dependent transcription of respiratory syncytial virus genome RNA. *J. Virol.* **74**, 669-675.

Bibliografía

- **Caballero, M., Carabaña, J., Ortego, J., Fernández-Muñoz, R., Celma, M. L.** (1998). Measles virus fusion protein is palmitoylated on transmembrane-intracytoplasmic cysteine residues which participate in cell fusion. *J. Virol.* **72**, 8198-8204.
- **Caffrey, M., Cai, M., Kaufman, J., Stahl, S. J. Groneriborn, A. M., Clore, G. M.** (1998). Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41. *EMBO J.* **17**, 4572-4584.
- **Cane, P. A., Matthews, D. A., Pringle, C. R.** (1994). Analysis of respiratory syncytial virus strain variation in successive epidemics in one city. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1-4.
- **Cane, P. A., Pringle, C. R.** (1991). Respiratory syncytial virus heterogeneity during an epidemic: analysis by limited nucleotide sequencing (SH gene) and restriction mapping (N gene). *J. Gen. Virol.* **72**, 349-57.
- **Carr, C. M., Chaudhry, C., Kim, P. S.** (1997). Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *PNAS* **94**, 13306-14313.
- **Carr, C. M., Kim, P. S.** (1993). A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell* **73**, 823-832.
- **Carreño, C., Roig, X., Cairo, J., Camarero, J., Mateu, M. G., Domingo, E., Giralt, E., Andreu, D.** (1992). Studies on antigenic variability of C strains of foot-and-mouth disease virus by means of synthetic peptides and monoclonal antibodies. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **39**, 41-47
- **Cathomen, T., Naim, H., Y., Cattaneo, R.** (1998). Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain fusion competence. *J. Virol.* **72**, 1224-1234.
- **Cavanagh, D., Davis, P. J., Pappin, D. J. C., Binns, M. M., Bournnell, M. E. G.** (1986). Coronavirus IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike precursor polypeptide of IBV strains Beaudette and M41. *Virus Res.* **4**, 133-143.
- **Center, R. J., Kemp, B. E., Pombourios, P.** (1997). Human immunodeficiency virus type 1 and 2 envelope glycoproteins oligomerize through conserved sequences. *J. Virol.* **71**, 5706-5711.
- **Chambers, P., Pringle, C. R., Easton, A.** (1990). Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **71**, 3075-3080.
- **Chambers, P., Millar, N. S., Emmerson, P. T.** (1986). Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* **67**, 2685-2694
- **Chambers, P., Pringle, C. R., Easton, A. J.** (1992). Sequence analysis of the gene encoding the fusion glycoprotein of pneumonia virus of mice suggests possible conserved secondary structure elements of paramixovirus fusion proteins. *J. Gen. Virol.* **72**, 1717-1724.
- **Chan, D. C., Fass, D., Berger, J., M., Kim, P., S.** (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **18**, 263-273.

Bibliografía

- **Chan, D. C., Kim, P. S.** (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-684.
- **Chanock, R. M., Roizman, B., Myers, R.** (1957). Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation properties and characterization. *Am. J. Hyg.* **66**, 281-290.
- **Chen, J., Skehel, J. J., Wiley D. C.** (1999). N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA2 subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil. *PNAS* **96**, 8967-8972.
- **Chen, L., Gorman, J. J., McKimm-Breschkin, J., Lawrence, L. J., Tulloch, P. A., Smith, B. J., Colman, P. M., Lawrence, M. C.** (2001). The structure of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus suggests a novel paradigm for the molecular mechanism of membrane fusion. *Structure* **9**, 255-266.
- **Cirino, N. M., Li, G., Wiao, W., Torrence, P. F., Silverman, R. H.** (1997). Targeting RNA decay with 2',5' oligoadenylate-antisense in respiratory syncytial virus-infected cells. *PNAS* **94**, 1937-1942.
- **Coelingh, K. v. W., Winter, C.** (1990) Naturally occurring human parainfluenza type 3 viruses exhibit divergence in amino acids sequence of their fusion protein neutralization epitopes and cleavages sites. *Virology* **64**, 1329-1334.
- **Collins, P. L.** (1991). The molecular biology of human respiratory syncytial virus (RSV) of the genus *Pneumovirus*. En: *The Paramyxoviruses* (Kingsbury, D. W. ed.), Plenum Press, New York, pp. 103-162.
- **Collins, P. L., Camargo, E., Hill, M. G.** (1999). Support plasmids and support proteins required for recovery of recombinant respiratory syncytial virus. *Virology* **259**, 251-255.
- **Collins, P. L., Dickens, L. E., Buckler-White, A., Olmsted, R. A., Spriggs, M. K., Camargo, E., Coelingh, K. V.** (1986). Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure and gene order. *PNAS* **83**, 4594-4598.
- **Collins, P. L., Hill, M. G., Cristina, J., Grosfeld, H.** (1996). Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *PNAS* **93**, 81-85.
- **Collins, P. L., Hill, M. G., Johnson, P. R.** (1990). The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. *J. Gen. Virol.* **71**, 3015-3020.
- **Collins, P. L., Huang, Y. T., Wertz, G. W.** (1984a). Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *PNAS* **81**, 7683-7687.
- **Collins, P. L., Huang, Y. T., Wertz, G. W.** (1984b). Identification of a tenth mRNA of respiratory syncytial virus and assignment of polypeptides to the 10 viral genes. *J. Virol.* **49**, 572-578.
- **Collins, P. L., Mottet, G.** (1991). Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **72**, 3095-3101.

Bibliografía

- **Collins, P. L., Mottet, G.** (1993). Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **74**, 1445-1450.
- **Collins, P. L., Olmsted, R. A., Spriggs, M. K., Johnson, P. R., Buckler-White, A. J.** (1987). Gene overlap and site-specific attenuation of transcription of the viral polymerase L gene of human respiratory syncytial virus. *PNAS* **84**, 5134-5138.
- **Collins, P. L., Wertz, G. W.** (1983). cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. *PNAS* **80**, 3208-3212.
- **Collins, P. L., Wertz, G. W.** (1985). Nucleotide sequences of the 1B and 1C nonstructural protein mRNAs of human respiratory syncytial virus. *Virology* **143**, 442-451.
- **Colotto, A., Martin, I., Ruyschaert, J. M., Sen, A., Hui, S. W., Epand, R. M.** (1996). Structural study of the interaction between the SIV fusion peptide and model membranes. *Biochemistry* **35**, 980-9.
- **Conzelmann, K. K.** (1996). Genetic manipulation of non-segmented negative-strand RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **77**, 381-389.
- **Cranage, M. P., Kouzarides, T., Bankier, A. T., Satchwell, S., Weston, K., Tomlinson, P., Barrell, B., Hart, H., Bell, S. E., Minsom, A. C., Smith, G. L.** (1986) Identification of the human cytomegalovirus glycoprotein B gene and induction of neutralizing antibodies via its expression in recombinant vaccinia virus. *EMBO J.* **5**, 3057-3063.
- **Cristina, J., Lopez, J. A., Albo, C., García-Barreno, B., García, J., Melero, J. A., Portela, A.** (1990). Analysis of genetic variability in human respiratory syncytial virus by the RNase A mismatch cleavage method: subtype divergence and heterogeneity. *Virology* **174**, 126-134.
- **Cristina, J., Moya, A., Arbiza, J., Russi, J., Hortal, M., Albo, C., García-Barreno, B., García, J., Melero, J. A., Portela, A.** (1991). Evolution of the G and P genes of human respiratory syncytial virus (subgroup A) studied by the RNase A mismatch cleavage method. *Virology* **184**, 210-218.
- **Crowe, J. E., Jr.** (1999). Host responses to respiratory virus infection and immunization. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **236**, 191-214.
- **Crowe, J. E., Jr, Murphy, B. R., Chanock, R. M., Williamson, R. A., Barbas, C. F., 3rd, Burton, D. R.** (1994). Recombinant human respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibody Fab is effective therapeutically when introduced directly into the lungs of RSV- infected mice. *PNAS* **91**, 1386-1390.
- **Damico, R. L., Crane, J., Bates, P.** (1998). Receptor-triggered membrane association of a model retroviral glycoprotein. *PNAS* **95**, 2580-2585.
- **Decroly, E., Wouters, S., Dibello, C., Lazure, C., Ruyschaert, J. M., Seidah, N. G.** (1996). Identification of the paired basic convertases implicated in HIV gp160 processing based on in vitro assays and expression in CD4⁺ cell lines. *J. Biol. Chem.* **271**, 30442-30450.

Bibliografía

- **De Groot, R. J., Luytjes, W., Horzinek, M. C., Van der Zeijst, B. A. M., Spaan, W. J., Lenstra, J. M.** (1987). Evidence for a coiled coil structure in the spike proteins of coronaviruses. *J. Mol. Biol.* **196**, 936-966.
- **Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., Michel, H.** (1985). Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature* **318**, 618-624.
- **Deshpande, K. L., Fried, V. A., Ando, M., Webster, R. G.** (1987). Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. *PNAS* **84**, 36-40.
- **Dickens, L. E., Collins, P. L., Wertz, G. W.** (1984). Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **52**, 364-369.
- **Doms, R. W., Helenius, A., White, J.** (1985). Membrane fusion activity of the influenza virus hemagglutinin. The low pH-induced conformational change. *J. Biol. Chem.* **260**, 2973-2981.
- **Doms, R. W., Helenius, A.** (1988). Properties of a viral fusion protein. En: *Molecular Mechanism of Membrane Fusion* (Ohki, D. D. S., Flanagan, T. D., Hui, S. W., Mayhew, W. ed.), pp. 385-398.
- **Doms, R. W., Lamb, R. A., Rose, J. K., Helenius, A.** (1993). Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* **193**, 545-562.
- **Dulbecco, R., Freeman, G.** (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **8**, 396-397.
- **Durrer, P., Galli, C., Hoenke, S., Corti, C., Gluck, R., Vorherr, T., Brunner, J.** (1996). H⁺-induced membrane insertion of influenza virus hemagglutinin involves the HA2 amino-terminal fusion peptide but not the coiled coil region. *J. Biol. Chem.* **271**, 13417-13421.
- **Dutch, R. E., Joshi, S. B., Lamb, R. A.** (1998). Membrane fusion promoted by increasing surface densities of the paramyxovirus F and HN proteins: comparison of fusion mediated by simian virus 5 F, human parainfluenza virus type 3 F, and influenza virus HA. *J. Virol.* **72**, 7745-7753.
- **Dutch, R. E., Leser, G. P., Lamb, R. A.** (1999). Paramyxovirus fusion protein: characterization of the core trimer, a rod-shaped complex with helices in anti-parallel orientation. *Virology* **254**, 147-159.
- **Dutch, R. E., Hagglung, R. N., Nagel M. A., Paterson R. G., Lamb, R. A.** (2001). Paramyxovirus Fusion (F) Protein: A conformational Change on Cleavage Activation. *Virology* **281**, 138-150.
- **Earl, P. L., Doms, R. W., Moss, B.** (1990). Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *PNAS* **87**, 648-652.
- **Einfeld, D., Hunter, E.** (1988). Oligomeric structure of a prototype retrovirus glycoprotein. *PNAS* **85**, 8688-8692.
- **Elango, N., Satake, M., Coligan, J. E., Norrby, E., Camargo, E., Venkatesan, S.** (1985). Respiratory syncytial virus fusion glycoprotein: nucleotide sequence of

Bibliografía

- mRNA, identification of cleavage activation site and amino acid sequence of the N-terminus of F₁ subunit. *Nucleic Acids Res.* **13**, 1559-1574.
- **Elliott, G. D., Afzal, M. A., Martin, S. J., Rima, B.K.** (1989). Nucleotide sequence of the matrix, fusion and putative SH protein genes of mumps virus and their deduced amino acid sequences. *Virus Res.* **12**, 61-75.
 - **Evans, J. E., Cane, P. A., Pringle, C. R.** (1996). Expression and characterisation of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus. *Virus Res.* **43**, 155-161.
 - **Falsey, A. R., Cunningham, C. K., Barker, W. H., Kouides, R. W., Yuen, J. B., Menegus, M., Weiner, L. B., Bonville, C. A., Betts, R. F.** (1995). Respiratory syncytial virus and influenza A infections in the hospitalized elderly. *J. Infect. Dis.* **172**, 389-94.
 - **Fass, D., Harrison, S. C., Kim, G. P.** (1996). Retrovirus envelope domain at 1.7 Å resolution. *Nat. Structure Biol.* **3**, 276-279.
 - **Fearns, R., Collins, P. L.** (1999a). Model for polymerase access to the overlapped L gene of respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **73**, 388-397.
 - **Fearns, R., Collins, P. L.** (1999b). Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J. Virol.* **73**, 5852-5864.
 - **Fernie, B. F., Dapolito, G., Cote, P. J., Jr., Gerin, J. L.** (1985). Kinetics of synthesis of respiratory syncytial virus glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **66**, 1983-1990.
 - **Fouillot-Coriou N., Roux, L.** (2000). Structure-function analysis of the Sendai virus F and HN cytoplasmic domain: different role for the two proteins in the production of virus particle. *Virology* **270**, 464-475.
 - **Fransen, H., Sterner, G., Forsgren, M., Heigl, Z., Wolontis, S., Svedmyr, A., Tunevall, G.** (1967). Acute lower respiratory illness in elderly patients with respiratory syncytial virus infection. *Acta Med. Scand.* **182**, 323-330.
 - **Freed, E. O., Delwart, E. L., Buchsacher, G. J., Panganiban, A. T.** (1992). A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity. *PNAS* **89**, 70-74.
 - **Freed, E. O., Myers, D. J., Risser, R.** (1990). Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *PNAS* **87**, 4650-4654.
 - **Furuta, R. A., Wild, C. T., Weng, Y., Weiss, C. D.** (1998). Capture of an early fusion- active conformation of HIV-1 gp41. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 276-279.
 - **Gallaher, W. R.** (1987). Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* **50**, 327-328.
 - **García, J., García-Barreno, B., Vivo, A., Melero, J. A.** (1993). Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology* **195**, 243-247.

Bibliografía

- **García, O., Martín, M., Dopazo, J., Arbiza, J., Frabasile, S., Russi, J., Hortal, M., Pérez-Breña, P., Martínez, I., García-Barreno, B. y col.** (1994). Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenetic changes in the G glycoprotein. *J. Virol.* **68**, 5448-5459.
- **García-Barreno, B., Delgado, T., Melero, J. A.** (1996). Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. *J. Virol.* **70**, 801-808.
- **García-Barreno, B., Jorcano, J. L., Aukenbauer, T., López-Galíndez, C., Melero, J. A.** (1988). Participation of cytoskeletal intermediate filaments in the infectious cycle of human respiratory syncytial virus (RSV). *Virus Res.* **9**, 307-322.
- **García-Barreno, B., Palomo, C., Peñas, C., Delgado, T., Pérez-Breña, P., Melero, J. A.** (1989). Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J. Virol.* **63**, 925-932.
- **Garoff, H., Frischauf, A. -M., Simons, K., Lehrach, H., Delius, H.** (1980). Nucleotide sequence of cDNA coding for Semliki Forest virus membrane glycoproteins. *Nature* **288**, 236-241.
- **Garten, W., Klenk, H. D.** (1983). Characterization of the carboxypeptidase involved in the proteolytic cleavage of the influenza haemagglutinin. *J. Gen. Virol.* **64**, 2127-2137.
- **Garvie, D. G., Gray, J.** (1980). Outbreak of respiratory syncytial virus infections in the elderly. *Br. Med. J.* **281**, 1253-1254.
- **Gaudin, Y., Moreira, S., Bénéjean, J., Blondel, D., Flamand, A., Tuffereau, C.** (1999). 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. *J. Gen. Virol.* **80**, 1647-1656.
- **Gaudin, Y., Ruigrok, R. W., Brunner, J.** (1995). Low-pH induced conformational changes in viral fusion proteins: implications for the fusion mechanism. *J. Gen. Virol.* **76**, 1541-1556.
- **Gething, M. J., Doms, R. W., York, D., White, J.** (1986). Studies on the mechanism of membrane fusion: site-specific mutagenesis of the hemagglutinin of influenza virus. *J. Cell Biol.* **102**, 11-23.
- **Gething, M. -J., Sambrook, J.** (1992). Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45.
- **Ghosh, J. K., Ovadia, M., Shai, Y.** (1997). A leucine zipper motif in the ectodomain of Sendai virus fusion protein assembles in solution and in membranes and specifically binds biologically-active peptides and the virus. *Biochemistry* **36**, 15451-15462.
- **Ghosh, J. K., Peisajovich, S. G., Ovadia, M., Shai, Y.** (1998). Structure-function study of a heptad repeat positioned near the transmembrane domain of Sendai virus fusion protein which blocks virus-cell fusion. *J. Biol. Chemistry* **273**, 27182-27190.

Bibliografía

- **Ghosh, J. K., Peisajovich, S. G., Shai, Y.** (2000). Sendai virus internal fusion peptide: structural and functional characterization and a plausible mode of viral entry inhibition. *Biochemistry* **39**, 11581-11592.
- **Ghosh J. K., Shai, Y.** (1998). A peptide derived from a conserved domain of Sendai virus fusion protein inhibits virus-cell fusion. A plausible mode of action. *J. Biol. Chem.* **273**, 7252-7259.
- **Ghosh J. K., Shai, Y.** (1999). Direct evidence that the N-terminal heptad repeat of Sendai virus fusion protein participates in membrane fusion. *J. Mol. Biol.* **292**, 531-546.
- **Gibson, S., Bruno-Morita, K., Porter, A., Lenard, J.** (1988). Fusion of a Sendai mutant deficient in HN protein (ts271) with cardiolipin liposomes. *Virology* **163**, 226-229.
- **Glickman, R. L., Syddal, R. J., Iorio, R. M., Sheehan, J. P., Bratt, M. A.** (1988). Quantitative basic residue requirements in the cleavage activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence of Newcastle disease virus. *J. Virol.* **62**, 354-356.
- **González, I. M., Karron, R. A., Eichelberger, M., Walsh, E. E., Delagarza, V. W., Bennett, R., Chanock, R. M., Murphy, B. R., Clements-Mann, M. L., Falsey, A. R.** (2000). Evaluation of the live attenuated cpts 248/404 RSV vaccine in combination with a subunit RSV vaccine (PF2-2) in healthy young and older adults. *Vaccine* **18**, 1763-1772.
- **Gotoh, B., Ohnishi, Y., Inocencio, N. M., Esaki, E., Nakayama, K., Barr, P. J., Thomas, G., Nagai, Y.** (1992a). Mammalian subtilisin-related proteinases in cleavage activation of the paramyxovirus fusion glycoprotein: superiority of furin/PACE to PC2 or PC1/PC3. *J. Virol.* **66**, 6391-6397.
- **Gotoh, B., Yamauchi, F., Ogasawara, T., Nagai, Y.** (1992b). Isolation of factor Xa from chick embryo as the amniotic endoprotease responsible for paramyxovirus activation. *FEBS Lett.* **296**, 274-278.
- **Gruber, C., Levine, S.** (1985a). Respiratory syncytial virus polypeptides. IV. The oligosaccharides of the glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **66**, 417-432.
- **Gruber, C., Levine, S.** (1985b). Respiratory syncytial virus polypeptides. V. The kinetics of glycoproteins synthesis. *J. Gen. Virol.* **66**, 1241-1247.
- **Hall, C. B.** (1979). Respiratory syncytial virus and sudden infant death. *N. Engl. J. Med.* **300**, 1440-1441.
- **Hall, C. B., Douglas, R. G., Jr.** (1981). Modes of transmission of respiratory syncytial virus. *J. Pediatr.* **99**, 28-32.
- **Hall, C., B., Hall, W. J., Speers, D. M.** (1979a). Clinical and physiological manifestations of bronchiolitis and pneumonia. Outcome of respiratory syncytial virus. *Am. J. Dis. Child* **133**, 798-802.
- **Hall, C. B., Kopelman, A. E., Douglas, R. G., Jr., Geiman, J. M., Meagher, M. P.** (1979b). Neonatal respiratory syncytial virus infection. *N. Engl. J. Med.* **300**, 393-396.

Bibliografía

- **Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H. -D., Garten, W.** (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**, 358-361.
- **Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- **Hardy, R. W., Harmon, S. B., Wertz, G. W.** (1999). Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. *J. Virol.* **73**, 170-176.
- **Heikkinen, T., Thint, M., Chonmaitree, T.** (1999). Prevalence of various respiratory viruses in the middle ear during acute otitis media. *N. Engl. J. Med.* **340**, 260-264.
- **Heminway, B. R., Yu, Y., Tanaka, Y., Perrine, K. G., Gustafson, E., Bernstein, J. M., Galinski, M. S.** (1994a). Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology* **200**, 801-805.
- **Heminway, B. R., Yu, Y., Galinski, M. S.** (1994b). Paramyxovirus mediated cell fusion requires co-expression of both the fusion and the hemagglutinin-neuroaminidase glycoproteins. *Virus Res.* **31**, 1-16.
- **Hemming, V. G., Prince, G. A., Horswood, R. L., London, W. J., Murphy, B. R., Walsh, E. E., Fischer, G. W., Weisman, L. E., Baron, P. A., Chanock, R. M.** (1985). Studies of passive immunotherapy for infections of respiratory syncytial virus in the respiratory tract of a primate model. *J. Infect. Dis.* **152**, 1083-1087.
- **Hendricks, D. A., McIntosh, K., Patterson, J. L.** (1988). Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **62**, 2228-2233.
- **Hendry, R. M., Pierik, L. T., McIntosh, K.** (1989). Prevalence of respiratory syncytial virus subgroups over six consecutive outbreaks: 1981-1987. *J. Infect. Dis.* **160**, 185-190.
- **Hendry, R. M., Tails, A. L., Godfrey, E., Anderson, L. J., Fernie, B. F., McIntosh, K.** (1986). Current circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks. *J. Infect. Dis.* **153**, 291-297.
- **Henis, Y. I., Hernan-Barhom, B., Aroeti, B., Gutman, O.** (1989). Lateral mobility of both envelope protein (F and HN) of Sendai virus in the cell membrane is essential for cell-cell fusion. *J. Biol. Chem.* **264**, 17119-17125.
- **Hernández, L., D., Hoffman, L. R., Wolfsberg, T. G., White, J. M.** (1996). Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 627-661.
- **Hernández, L., Peters, R. J., Delos, S. E., Young, J. A. T., Agard, D. A., White, J. M.** (1997). Activation of a retroviral membrane fusion protein: soluble receptor-induced liposome binding of the ALSV envelope glycoprotein. *J. Cell. Biol.* **139**, 1455-1464.

Bibliografia

- **Horth, M., Lambrecht, B., Khim, M. C., Bex, F., Thiriart, C., Ruyschaert, J. M., Burny, A., Brasseur, R.** (1991). Theoretical and functional analysis of the SIV fusion peptide. *EMBO J.* **10**, 2747-2755.
- **Horvarth, C. M., Lamb, R. A.** (1992). Studies on the fusion peptide of a paramyxovirus fusion glycoprotein: roles of conserved residues in cell fusion. *J. Virol.* **66**, 2443-2455.
- **Horvath, C. M. Paterson, R. G., Shaughnessy M. A., Wood, R., Lamb, R. A.** (1992). Biological activity of paramyxovirus fusion proteins: factors influencing formation of syncytia. *J. Virol.* **66**, 4564-4569.
- **Hosaka, M., Nagahami, M., Kim, W., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K., Nakayama, K.** (1991). Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **266**, 12127-12130.
- **Hosaka, Y., Shimizu, Y.** (1972). Artificial assembly of envelope particles of HVJ (Sendai virus). I. Assembly of hemolytic and fusion factors from envelopes solubilised by Nonidet P40. *Virology.* **49**, 627-639.
- **Hruska, J. F., Bernstein, J. M., Douglas, R. G., Jr., Hall, C. B.** (1980). Effects of ribavirin on respiratory syncytial virus in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **17**, 770-775.
- **Hsu, M. -C., Scheid, A., Choppin, P., W.** (1981). Activation of the Sendai virus fusion protein (F) involves a conformational change with exposure of a new hydrophobic region. *J. Biological Chem.* **256**, 3557-3563.
- **Hsu, M. -C., Scheid, A., Choppin, P. W.** (1982). Enhancement of membrane-fusing activity of Sendai virus by exposure of the virus to basic pH is correlated with a conformational change in the fusion protein. *PNAS* **79**, 5862-5866.
- **Hsu, M. -C., Scheid, A., Choppin, P. W.** (1987). Protease activation mutants of Sendai virus: sequence analysis of the mRNA of the fusion protein (F) gene and direct identification of the cleavage-activation site. *Virology* **156**, 84-90.
- **Hu, X. L., Ray, R., Compans, R. W.** (1992). Functional interactions between the fusion protein and hemagglutinin-neuroaminidase of human parainfluenza viruses. *J. Virol.* **66**, 1528-1534.
- **Huang, Y. T., Collins, P. L., Wertz, G. W.** (1985). Characterisation of the 10 proteins of human respiratory syncytial virus: identification of a fourth envelope-associated protein. *Virus Res.* **2**, 157-173.
- **Huang, Y. T., Wertz, G. W.** (1982). The genome of respiratory syncytial virus is a negative-stranded RNA that codes for at least seven mRNA species. *J. Virol.* **43**, 150-157.
- **Huang, Y. T., Wertz, G. W.** (1983). Respiratory syncytial virus mRNA coding assignments. *J. Virol.* **46**, 667-672.
- **Hunter, E., Swanstrom, R.** (1990). Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol.* **157**, 187-253.

Bibliografía

- **Hurtley, S. M., Helenius, A.** (1989). Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5**, 277-307.
- **Ishiguro, R., Kimura, N., Takahashi, S.** (1993) Orientation of fusion-active synthetic peptides in phospholipid bilayers: determination by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* **32**, 9792-9797.
- **Ito, M., Nishio, M., Kawano, M., Kusagawa, S., Komada, H., Ito, Y., Tsurudome, M.** (1997). Role of a single amino acid at the amino terminus of the simian virus 5 F2 subunit in syncytium formation. *J. Virol.* **71**, 9855-9858.
- **Iwata, S., Schmidt, A. C., Titani, K., Suzuki, M., Kido, H., Gotoh, B., Hamaguchi, M., Nagai, Y.** (1994). Assignment of disulfide bridges in the fusion glycoprotein of Sendai virus. *J. Virol.* **68**, 3200-3206.
- **Jacoby, W. B., Pastan, A.** (1979). Cell culture. *Meth.enzymol.* **53**, 345.
- **Jairath, S., Vargas, P. B., Hamlin, H. A., Field, A. K., Kilkuskie, R. E.** (1997). Inhibition of respiratory syncytial virus replication by antisense oligodeoxynucleotides. *Antiviral Res.* **33**, 201-213.
- **Ji, H., Bracken, C., Lu, M.** (2000). Buried polar interactions and conformational stability in the simian immunodeficiency virus (SIV) gp41 core. *Biochemistry* **39**, 676-685.
- **Jiang, S., Lin, K., Strick, N., Neurath, A. R.** (1993a). HIV-1 inhibition by a peptide. *Nature* **365**, 113.
- **Jiang, S., Lin, K., Strick, N., Neurath, A. R.** (1993b). Inhibition of HIV-1 infection by a fusion domain binding peptide from the HIV-1 envelope glycoprotein GP41. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 533-538.
- **Johnson, P. R., Collins, P. L.** (1988a). The fusion glycoproteins of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B: sequence conservation provides a structural basis for antigenic relatedness. *J. Gen. Virol.* **69**, 2623-2628.
- **Johnson, P. R., Collins, P. L.** (1988b). The A and B subgroups of human respiratory syncytial virus: comparison of intergenic and gene-overlap sequences. *J. Gen. Virol.* **69**, 2901-2906.
- **Johnson, P. R., Spriggs, M. K., Olmsted, R. A., Collins, P. L.** (1987). The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *PNAS* **84**, 5625-5629.
- **Johnson, S., Oliver, C., Prince, G. A., Hemming, V. G., Pfarr, D. S., Wang, S. – C., Dormitzer, M., O’Grady, J., Koenig, S., Tamura, J. K., Woods, R., Bansal, G., Couchenour, D., Tsao, E., Hall, W. C., Young, J. F.** (1997). Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J. Inf. Dis.* **176**, 1215-1224.
- **Joshi, S. B., Dutch, R. E., Lamb, R. A.** (1998). A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: Parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV-1 gp41. *Virology* **248**, 20-34.
- **Kahn, J. S., Schnell, M. J., Buonocore, L., Rose, J. K.** (1999). Recombinant

Bibliografía

- vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins: RSV fusion protein can mediate infection and cell fusion. *Virology* **254**, 81-91.
- **Kapikian, A. Z., Mitchell, R. H., Chanock, R. A., Stewart, C. E.** (1969). An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am. J. Epidemiol.* **89**, 405-421.
 - **Karger, A., Schmidt, U., Buchholz, U.** (2001). Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of G or SH genes: G and F proteins bind heparin. *J. Gen. Virol.* **82**, 631-640.
 - **Karron, R. A., Buonagurio, D. A., Georgiu, A. F., Whitehead, S. S., Adamus, J. E., Clements-Mann, M. L., Harris, D. O., Randolph, V. B., Udem, S. A., Murphy, B. R., Sidhu, M. S.** (1997). Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *PNAS* **94**, 13961-13966.
 - **Kawahara, N., Yang, X. Z., Sakaguchi, T., Kiyotani, K., Nagai, Y., Yoshida, T.** (1992). Distribution and substrate specificity of intracellular proteolytic processing enzyme(s) for paramyxovirus fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **73**, 583-590.
 - **Kemble, G. W., Danieli, T., White, J. M.** (1994). Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion. *Cell* **76**, 383-391.
 - **Khatchikian, D., Orlich, M., Rott, R.** (1989). Increased viral pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into the haemagglutinin gene of an influenza virus. *Nature* **340**, 156-157.
 - **Kim, H. W., Canchola, J. G., Brandt, C. D., Pyles, G., Chanock, R. M., Jensen, K., Parrott, R. H.** (1969). Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am. J. Epidemiol.* **89**, 422-434.
 - **Kingsbury, D. W.** (1990). Paramyxoviridae and their replication. En: *Virology* (Fields, B.N., Knipe, D.M. y col. ed.) Raven Press, Nueva York, pp. 945-962.
 - **Kiyotani, K., Sakaguchi, T., Fijii, Y., Yoshida, T.** (1993). F₀-containing noninfectious Sendai virus can initiate replication in mouse lungs but requires a relatively long incubation period. *J. Virol.* **67**, 7618-7622.
 - **Klenk, H. -D., Garten, W.** (1994a). Activation cleavage of viral spike proteins by host proteases. En: *Cellular Receptors for Animal Viruses* (Wimmer, E. ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, pp. 241-280.
 - **Klenk, H., -D., Garten, W.** (1994b). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol.* **2**, 39-43.
 - **Kobe, B. Center, R. J., Kemp, B. E., Pountourios, P.** (1999). Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins. *PNAS* **96**, 4319-4324.

Bibliografía

- **Kohama.T., Garten W., Klenk, H. -D.** (1981). Changes in conformation and charge paralleling proteolytic activation of Newcastle disease virus glycoproteins. *Virology* **111**, 364-376.
- **Kuo, L., Grosfeld, H., Cristina, J., Hill, M. G., Collins, P. L.** (1996). Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **70**, 6892-6901.
- **Kuo, L., Fearn, R., Collins, P. L.** (1997). Analysis of the gene start and gene end signals of human respiratory syncytial virus: quasi-templated initiation at position 1 of the encoded mRNA. *J. Virol.* **71**, 4944-4953.
- **Lamb, R. A.** (1993). Paramyxovirus fusion: A hypothesis for changes. *Virology* **197**, 1-11.
- **Lamb, R. A., Kolakofsky D.** (1996). Paramyxoviridae: the viruses and their replication,. En: *Fields virology* (Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. ed.), 3^o edición, vol 1, Lippincott-Raven, Filadelfia pp 1177-1206.
- **Lamb, R. A., Jashi, S. B., Dutch, R. E.** (1999). The paramixovirus fusion protein forms an extremely stable core trimer: structural parallels to influenza haemagglutinin and HIV-1 gp41. *Mol. Membrane Biol.* **16**, 11-19.
- **Lambert, D. M.,** (1988). Role of oligosaccharides in the structure and function of respiratory syncytial virus glycoproteins. *Virology* **164**, 458-466.
- **Lambert, D. M., Barney, S., Lambert, A. L., Guthrie, K., Medinas, R., Davis, D. E., Bucy, T., Erickson, J., Merutka, G., Petteway Jr., S., R.** (1996). Peptides from conserved regions of paramixovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *PNAS* **93**, 2186-2191.
- **Lambert, D. M., Pons, M. W., Mbuy, G. N., Dorsch-Hasler, K.** (1980). Nucleic acids of respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **36**, 837-846.
- **Lawless-Delmedico, M. K., Sista, P., Sen, R., Moore, N. C., Antczak, J. B., White, J. M., Green, R. J., Leanza, K. C., Matthews, T. J., Lambert, D. M.** (2000). Heptad-repeat regions of respiratory syncytial virus F₁ protein form a six-membered coiled-coil complex. *Biochemistry* **39**, 11684-11695.
- **Lear, J. D., Degrado, W. F.** (1987). Membrane binding and conformational properties of peptides representing the NH₂ terminus of influenza HA-2. *J. Biol. Chem.* **262**, 6500-6505.
- **Levine, S., Klaiber-Franco, R., Paradiso, P. R.** (1987). Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **68**, 2521-2524.
- **Li, Z., Sergel, T., Razvi, E., Morrison, T.** (1998a). Effect of cleavage mutants on syncytium formation directed by wild-type fusion protein of Newcastle disease virus. *J. Virol.* **72**, 3789-3795.
- **Li, X., Sambhara, S., Li, C. X., Ewasyshyn, M., Parrington, M., Caterini, J., James, O., Cates, G., Du, R. P., Klein, M.** (1998b). Protection against respiratory syncytial virus infection by DNA immunization. *J. Exp. Med.* **188**, 681-688.

Bibliografía

- **Ling, R., Easton, A. J., Pringle, C. R.** (1992). Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. *J. Gen. Virol.* **73**, 1709-1715.
- **Lombardi, S., Massi, C., Indino, E., La Rosa, C., Mazzetti, P., Falcone, M. L., Rovero, P., Fissi, A., Pieroni, O., Bandecchi, P., Esposito, F., Tozzini, F., Bendinelli, M., Garzelli, C.** (1996). Inhibition of feline immunodeficiency virus infection in vitro by envelope glycoprotein synthetic peptides. *Virology* **220**, 274-284.
- **López, J. A., Andreu, D., Carreño, C., Whyte, P., Taylor, G., Melero, J. A.** (1993). Conformational constraints of conserved neutralising epitopes from a major antigenic area of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J. Gen. Virol.* **74**, 2567-2577.
- **López, J. A., Bustos, R., Örvell, C., Berois, M., Arbiza, J., García-Barreno, B., Melero, J. A.** (1998). Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J. Virol.* **72**, 6922-6928.
- **López, J. A., Peñas, C., García-Barreno, B., Melero, J. A., Portela, A.** (1990). Location of a highly conserved neutralizing epitope in the F glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **64**, 927-930.
- **López, J. A., Villanueva, N., Melero, J. A., Portela, A.** (1988). Nucleotide sequence of the fusion and phosphoprotein genes of human respiratory syncytial (RS) virus Long strain: evidence of subtype genetic heterogeneity. *Virus Res.* **10**, 249-261.
- **Lu, M., Blacklow, S. C., Kim, P. S.** (1995). A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat. Struct. Biol.* **93**, 1075-1082.
- **Maisner, A., Mrkic, B., Herrler, G., Moll, M., Billeter, M. A., Cattaneo, R., Klenk, H. D.** (2000). Recombinant measles virus requiring an exogenous protease for activation of infectivity. *J. Gen. Virol.* **81**, 441-449.
- **Malashkevich, V. N., Chan, D. C., Chutkowaski, C. T., Kim, P. S.** (1998). Crystal structure of the simian immunodeficiency virus (SIV) gp41 core trimer: conserved helical interactions underlie the broad inhibitory activity of gp41 peptides. *PNAS* **95**, 9134-9139.
- **Malashkevich, V. N., Schneider, B. J., McNally, M. L., Milhollen, M. A., Pang, J. X., Kim, P. S.** (1999). Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9 Å resolution. *PNAS* **96**, 2662-2667.
- **Martin, I., Defrise, Q. F., Mandieau, V., Nielsen, N. M., Saermark, T., Burny, A., Brasseur, R., Ruyschaert, J. M., Vandenbranden, M.** (1991). Fusogenic activity of SIV (simian immunodeficiency virus) peptides located in the GP32 NH2 terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 872-879.
- **Martin, I., Schaal, A., Ruyschaert, J. M.** (1996). Lipid membrane fusion induced by the human immunodeficiency virus type 1 gp41 N-terminal extremity is determined by its orientation in the lipid bilayer. *J. Virol.* **70**, 298-304.

Bibliografía

- **Martin, I., Ruyschaert, J. –M., Epand, R. M.** (1999). Role of the N-terminal peptides of viral envelope proteins in membrane fusion. *Adv. Drug Delivery* **38**, 233-255.
- **Martín-Gallardo, A., Flen, K. A., Hu, B. T., Farly, J. F., Collins, P. L., Hildreth, S. W., Paradiso, P. R.** (1991). Expression of the F glycoprotein gene from human respiratory syncytial virus in *Escherichia coli*: mapping of a fusion inhibiting epitope. *Virology* **184**, 428-432.
- **Martínez, X., Li, X., Kovarik, J., Klein, M., Lambert, P. H., Siegrist, C. A.** (1999). Combining DNA and protein vaccines for early life immunization against respiratory syncytial virus in mice. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3390-3400.
- **Martínez, I., Melero, J. A.** (2000). Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J. Gen. Virol.* **81**, 2715-2722.
- **Matthews, J. M., Young, T. F., Tucker, S. P., Mackay, J. P.** (2000). The core of the respiratory syncytial virus fusion protein is a trimeric coiled coil. *J. Virol.* **74**, 5911-5920.
- **Mazumder, B., Barik, S.** (1994). Requirement of casein kinase II-mediated phosphorylation for the transcriptional activity of human respiratory syncytial viral phosphoprotein P: transdominant negative phenotype of phosphorylation-defective P mutants. *Virology* **205**, 104-111.
- **McAlear, B., Rima, B.** (2000). Cloning and Secreted Expression of the Extracellular Domain of the Mumps Virus Fusion Protein in *Pichia pastoris*. *Virus Genes* **20**, 127-133.
- **McCune, J. M., Rabin, L. B., Feinberg, M. B., Lieberman, M., Kosek, J. C., Reyes, G. R., Weissman, I. L.** (1988). Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **53**, 55-67.
- **McGinnes, L. W., Morrison, T. G.** (1986). Nucleotide sequence of the gene encoding the Newcastle disease virus fusion protein and comparisons of paramyxovirus fusion protein sequences. *Virus Res.* **5**, 343-356.
- **McGinnes, L. W., Semerjian, A., Morrison, T. G.** (1985). Conformational changes in Newcastle disease virus fusion glycoprotein during intracellular transport. *J. Virol.* **56**, 341-348.
- **McIntosh, K., Chanock, R. M.** (1990). Respiratory syncytial virus. En: *Virology* (Fields, B. N., Knipe, D. M. y col. ed.), Raven Press, Nueva York, pp. 1045-1072.
- **Merson, J. R., Hull, R. A., Estes, M. K., Kasel, J. A.** (1988). Molecular cloning and sequence determination of the fusion protein gene of human parainfluenza virus type 1. *Virology* **167**, 97-105.
- **Miller, J. H.** (1972). En: *Experiments in Molecular Genetic*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- **Mills, J.** (1999). Prevention and treatment of respiratory syncytial virus infections. *Adv. Exp. Med. Biol.* **458**, 39-53.
- **Mink, M. A., Stec, D. S., Collins, P. L.** (1991). Nucleotide sequences of the 3'

Bibliografía

- leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* **185**, 615-624.
- **Molloy, S. S., Bresnahan, P. A., Leppla, S. H., Klimel, K. R., Thomas, G.** (1992). Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J. Biol. Chem.* **267**, 16396-16402.
 - **Monto, A. S., Ohmit, S.** (1990). Respiratory syncytial virus in a community population: circulation of subgroups A and B since 1965. *J. Infect. Dis.* **161**, 781-783.
 - **Moore, J. P., McKeating, J. A., Weiss, R. A. Sattentau, Q. J.** (1990). Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4. *Science* **250**, 1130-1142.
 - **Morris, J. A. Jr., Blount, R. E., Savage, R. E.** (1956). Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**, 544-550.
 - **Morrison, T. G.** (1988). Structure, function, and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Research* **10**, 113-136.
 - **Morrison, T. G., McQuain, C., McGinnes, L.** (1991). Complementation between avirulent Newcastle disease virus and a fusion protein gene expressed from a retrovirus vector: requirements for membrane fusion. *J. Virol.* **65**, 813-822.
 - **Morrison, T. G., Peeples, M. E., McGinnes, L.** (1987). Conformational change in a viral glycoprotein during maturation due to disulfide band disruption. *PNAS* **84**, 1020-1024.
 - **Morrison, T. G., Portner, A.** (1991). Structure, function and intracellular processing of the glycoproteins of *Paramyxoviridae*. En *The Paramyxovirus* (Kingsbury, D. W. ed.), Plenum, Nueva York, 347-382.
 - **Moscona, A., Peluso, R. W.** (1992). Fusion properties of cells infected with human parainfluenza virus type 3: Receptor requirements for viral spread and virus-mediated membrane fusion. *J. Virol.* **66**, 6280-6287.
 - **Mufson, M. A., Belshe, R. B., Orvell, C., Norrby, E.** (1987). Subgroup characteristics of respiratory syncytial virus strains recovered from children with two consecutive infections. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 1535-9.
 - **Mufson, M. A. Örvell, C., Rafnar, B., Norrby, E.** (1985). Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **66**, 2111-2124.
 - **Nagai, Y.** (1993). Protease-dependent virus tropism and pathogenicity. *Trends Microbiol.* **1**, 81-87.
 - **Nagai, Y., Shimokata, K., Yoshida, T., Hamaguchi, M., Iinuma, M., Maeno, K., Matsumoto, T., Klenk, H., -D, Rott, R.** (1979). The spread of a pathogenic and an apathogenic strain of Newcastle disease virus in the chick embryo as depending on the protease sensitivity of the virus glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **45**, 263-272.
 - **Naval, J., Piñol, J., Rebordosa, X., Serra-Hartmann, X., Pérez-Pons, J. A., Querol, E.** (1997). Expression in *Echerichia coli* and purification of soluble forms

Bibliografía

- of the F protein of bovine respiratory syncytial virus. *Protein Expr. Purif.* **9**, 288-294.
- **Navarro, J., Lopez-Otin, C., Villanueva, N.** (1991). Location of phosphorylated residues in human respiratory syncytial virus phosphoprotein. *J. Gen. Virol.* **72**, 1455-1459.
 - **Naylor, C. J., Britton, P., Cavanagh, D.** (1998). The ectodomains but not the transmembrane domains of the fusion proteins of subtypes A and B avian pneumovirus are conserved to a similar extent as those of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **79**, 1393-1398.
 - **Ng, D. T. W., Hiebert, S. W., Lamb, R. A.** (1990). Different roles of individual N-linked oligosaccharide chains in folding, assembly, and transport of the simian virus 5 hemagglutinin-neuroaminidase. *Mol. Cell Biol.* **10**, 1989-2001.
 - **Nieva, J. L., Nir, S., Muga, A., Goñi, F. M., Wilschunt, J.** (1994). Interaction of the HIV-1 fusion peptide with phospholipid vesicles: different structural requirements for fusion and leakage. *Biochemistry* **33**, 3201-3209.
 - **Novick, S. L., Hoekstra, D.** (1988). Membrane penetration of Sendai virus glycoproteins during the early stages of fusion with liposomes as determined by hydrophobic photoaffinity labeling. *PNAS* **85**, 7433-7437.
 - **Norrby, E., Marusyk, H., Örvell, C.** (1970). Morphogenesis of respiratory syncytial virus in a green monkey kidney cell line (Vero). *J. Virol.* **6**, 237-242.
 - **Norrby, E., Mufson, M. A., Sheshberadanran, H.** (1986). Structural differences between subtype A and B strains of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **67**, 2721-2729.
 - **Ogasawara, T., Gotoh, B., Suzuki, H., Asaka, J., Shimokata, K., Rott, R., Nagai, Y.** (1992). Expression of factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. *EMBO J.* **11**, 467-472.
 - **Olmsted, R. A., Collins, P. L.** (1989). The 1^a protein of respiratory syncytial virus is an integral membrane protein present as multiples, structurally distinct species. *J. Virol.* **63**, 2019-2029.
 - **Olmsted, R. A., Elango, N., Prince, G. A., Murphy, B. R., Johnson, P. R., Moss, B., Chanock, R. M., Collins, P. L.** (1986). Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity. *PNAS* **83**, 7462-7466.
 - **Orstavik, I., Grandien, M., Halonen, P., Arstila, P., Mordhorst, C. H., Hornsleth, A., Popow-Kraupp, T., Mcquillin, J., Gardner, P. S.** (1980). Rapid immunofluorescence diagnosis of respiratory syncytial virus infections among children in European countries. *Lancet* **2**,32.
 - **Ortmann, D., Ohuchi, M., Angliker, H., Shaw, E., Garten, W., Klenk, H., -D.** (1994). Proteolytic cleavage of wild type and mutants of the F protein of human parainfluenza virus type 3 by two subtilisin-like endoproteases, furin and Kex2. *J. Virol.* **68**, 2772-2776.

Bibliografía

- **Örvell, C., Norrby, E., Mufson, M.** (1987). Preparation and characterisation of monoclonal antibodies directed against five structural components of human respiratory syncytial virus subgroup B. *J. Gen. Virol.* **68**, 3125-3135.
- **Owen, R. J., Burke, C., Rose, J. K.** (1994). Mutations in the membrane-spanning domain of HIV envelope glycoprotein that affect fusion activity. *J. Virol.* **68**, 570-574.
- **Pastey, M. K., Samal, S. K.** (1997). Analysis of bovine respiratory syncytial virus envelope glycoproteins in cell fusion. *J. Gen. Virol.* **78**, 1885-1889.
- **Paterson, R. G., Harris, T. J., Lamb, R. A.** (1984) Fusion protein of the paramyxovirus simian virus 5: nucleotide sequence of mRNA predicts a highly hydrophobic glycoprotein. *PNAS* **81**, 6706-6710.
- **Paterson, R. G., Hiebert, S. W., Lamb, R. A.** (1985). Expression at the cell surface of biologically active fusion and hemagglutinin/neuraminidase proteins of the paramyxovirus simian virus 5 from cloned cDNA. *PNAS* **82**, 7520-7524.
- **Paterson, R. G., Lamb, R. A.** (1987). Ability of the hydrophobic fusion-related external domain of a paramyxovirus F protein to act as a membrane anchor. *Cell* **48**, 441-452.
- **Paterson, R. G., Russell, C. J., Lamb, R. A.** (2000). Fusion protein of the paramyxovirus SV5: destabilizing and stabilizing mutants of fusion activation. *Virology* **270**, 17-30.
- **Paterson, R. G., Shaughnessy, M. A., Lamb, R. A.** (1989). Analysis of the relationship between cleavability of a paramyxovirus fusion protein and length of the connecting peptide. *J. Virol.* **63**, 1293-1301.
- **Peebles, M., Levine, S.** (1979). Respiratory syncytial virus polypeptides: their location in the virion. *J. Virol.* **95**, 137-145.
- **Peeters, B. P., de Leeuw, O. S., Koch, G., Gielkens, A. L.** (1999). Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.* **73**, 5001-5009.
- **Peisajovich, S. G., Samuel, O. Shai, Y.** (2000). Paramyxovirus F1 protein has two fusion peptides: implications for the mechanism of membrane fusion. *J. Mol. Biol.* **296**, 1353-1365.
- **Perdue, M., García, M., Senne, D., Fraire, M.** (1997). Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses. *Virus Res.* **49**, 173-186.
- **Pérez, L., Hunter, E.** (1987). Mutations within the proteolytic cleavage site of the Rous sarcoma virus glycoprotein that block processing to gp85 and gp37. *J. Virol.* **61**, 1609-1614.
- **Pérez, M., García-Barreno, B., Melero, J. A., Carrasco, L., Guinea, R.** (1997). Membrane permeability changes induced in *Escherichia coli* by the SH protein of human respiratory syncytial virus. *Virology* **235**, 342-351.
- **Plotnicky-Gilquin, H., Goetsch, L., Huss, T., Champion, T., Beck, A., Haeuw, J. F., Nguyen, T. N., Bonnefoy, J. Y., Corvaia, N., Power, U. F.** (1999).

Bibliografía

- Identification of multiple protective epitopes (protectopes) in the central conserved domain of a prototype human respiratory syncytial virus G protein. *J. Virol.* **73**, 5637-5645.
- **Prince, G. A., Hemming, V. G., Horswood, R. L., Baron, P. A., Chanock, R. M.** (1987). Effectiveness of topically administered neutralizing antibodies in experimental immunotherapy of respiratory syncytial virus infection in cotton rats. *J. Virol.* **61**, 1851-1854.
 - **Pringle, C. R.** (1987). Paramyxovirus and disease. En: *Molecular basis of virus diseases* (Russell, W. C., Almand, J. W. ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp 51-81.
 - **Pritzer, E., Kuroda, K., Garten, W., Nagai, Y., Klenk, H. -D.** (1990). A host range mutant of Newcastle disease virus with an altered cleavage site for proteolytic activation of the F protein. *Virus Res.* **15**, 237-242.
 - **Prober, C. G., Wang, E. E.** (1997). Reducing the morbidity of lower respiratory tract infections cause by respiratory syncytial virus: still no answer. *Pediatrics* **99**, 472-475.
 - **Puri, A., Booy, F. P., Doms, R. W., White, J. M., Blumenthal, R.** (1990). Conformation and fusion activity of influenza virus hemagglutinin of the H2 and H3 subtypes: effects of acid pretreatment. *J. Virol.* **64**, 3824-3832.
 - **Rafalski, M., Lear, J. D., DeGrado, W. F.** (1990). Phospholipid interactions of synthetic peptides representing the N-terminus of HIV gp41. *Biochemistry* **29**, 7917-7922.
 - **Rapaport, D., Ovadia, M., 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 J.* **14**, 5524-5531.
 - **Rapaport, D., Shai, Y.** (1994). Interaction of fluorescently labeled analogues of the amino-terminal fusion peptide of Sendai virus with phospholipid membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 15124-15131.
 - **Reitter, J., Sergel, T., Morrison, T.** (1995). Mutational analysis of the leucine zipper motif in the Newcastle disease virus fusion protein. *J. Virol.* **69**, 5995-6004.
 - **Rimensberger, P. C., Burek-Kozłowska, A., Morell, A., Germann, D., Esenmann, A. K., Steiner, F., Buerger, R., Kuenzli, M., Schaad, U. B.** (1996). Aerosolized immunoglobulin treatment of respiratory syncytial virus infection in infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **15**, 209-216.
 - **Roberts, S. R., Compans, R. W., Wertz, G. W.** (1995). Respiratory syncytial virus matures at the apical surfaces of polarized epithelial cells. *J. Virol.* **69**, 2667-2673.
 - **Rodríguez, W. J., Gruber, W. C., Welliver, R. C., Groothuis, J. R., Simoes, E. A., Messner, H. C., Hemming, V. G., Hall, C. B., Lepow, M. L., Rosas, A. J., Robertsen, C., Kramer, A. A.** (1997). Respiratory syncytial virus (RSV) immune globulin intravenous therapy for RSV lower respiratory tract infections in infants and young children at high risk for severe RSV infections: Respiratory Syncytial Virus Immune Globulin Study Group. *Pediatrics* **99**, 454-461.

Bibliografía

- **Rodríguez-Crespo, I., Nuñez, E., Gómez-Gutiérrez, J., Yelamos, B., Albar, J. P., Peteron, D. L., Gavilanes, F.** (1995). Phospholipid interactions of the putative fusion peptide of hepatitis B virus surface antigen S protein. *J. Gen. Virol.* **76**, 301-308.
- **Rose, J. K., Bergmann, J. E.** (1983). Altered cytoplasmic domains affect intracellular transport of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Cell* **34**, 513-524.
- **Rose, J. K., Doms, R. W.** (1988). Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 257-288.
- **Rosenthal, P. B., Zhang, X., Formanowski, F., Fitz, W., Wong, C. H., Meier-Ewert, H., Skehel, J. J., Wiley, D. C.** (1998). Structure of the haemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein of influenza C virus. *Nature* **396**, 92-96.
- **Routledge, E. G., Willcocks, M. M., Morgan, L., Samson, A. C., Scott, R., Toms, G. L.** (1987). Expression of the respiratory syncytial virus 22K protein on the surface of infected HeLa cells. *J. Gen. Virol.* **68**, 1217-1222.
- **Ruigrok, R. W., Wrigley, N. G., Calder, L. J., Cusack, S., Wharton, S. A., Brown, E. B., Skehel, J. J.** (1986). Electron microscopy of the low pH structure of influenza virus haemagglutinin. *EMBO* **5**, 41-49.
- **Ruiz-Argüello, M. B., Goñi, F. M., Pereira, F. B., Nieva, J. L.** (1998). Phosphatidylinositol-dependent membrane fusion induced by a putative fusogenic sequence of Ebola virus. *J. Virol.* **72**, 1775-1781.
- **Russell, R., Paterson, R. G., Lamb, R. A.** (1994). Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein. *Virology.* **199**, 160-168.
- **Russi, J. C., Chiparelli, H., Montano, A., Etorena, P., Hortal, M.** (1989). Respiratory syncytial virus subgroups and pneumonia in children. *Lancet* **2**, 1039-1040.
- **Sakaguchi, T., Fujii, Y., Kiyotani, K., Yoshida, T.** (1994). Correlation of proteolytic cleavage of F protein precursors in paramyxoviruses with expression of the *fur*, *PACE4* and *PC6* genes in mammalian cells. *J. Gen. Virol.* **75**, 2821-2827.
- **Sakai, Y., Shibuta, H.** (1989). Syncytium formation by recombinant vaccinia viruses carrying bovine parainfluenza 3 virus envelope protein genes. *J. Virol.* **63**, 3661-3668.
- **Sambrook, J., Fritsh, E. F., Maniatis, T.** (1989). En: *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, pp. 21-69.
- **Sánchez-Seco, M. P., Navarro, J., Martínez, R., Villanueva, N.** (1995). C-terminal phosphorylation of human respiratory syncytial virus P protein occurs mainly at serine residue 232. *J. Gen. Virol.* **76**, 425-430.
- **San Román, K., Villar, E., Muñoz-Barroso, I.** (1999). Acidic pH enhancement of the fusion of Newcastle disease virus with cultured cells. *Virology* **260**, 329-341.

Bibliografía

- **Satake, M., Colingan, J. E., Elango, N., Norrby, E., Venkatesan, S.** (1985). Respiratory syncytial virus envelope glycoprotein (G) has a novel structure. *Nucleic Acids. Res.* **13**, 7795-7812.
- **Satake, M., Venkatesan, S.** (1984). Nucleotide sequence of the gene encoding respiratory syncytial virus matrix protein. *J. Virol.* **50**, 92-99.
- **Scheid, A., Choppin, P. W.** (1977). Two disulfide-linked polypeptide chains constitute the active F protein of paramyxoviruses. *Virology* **80**, 54-66.
- **Scheid, A., Choppin, P. W.** (1974). Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity of proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology* **57**, 475-490.
- **Schmidt, A. C., McAuliffe, J. M., Murphy, B. R., Collins, P.** (2001). Recombinant bovine/human parainfluenza virus type 3 (B/HPIV3) expressing the respiratory syncytial virus (RSV) G and F proteins can be used to achieve simultaneous mucosal immunization against RSV and HPIV3. *J. Virol.* **75**, 4594-4603.
- **Scopes, G. E., Watt, P. J., Lmabden, P. R.** (1990). Identification of a linear epitope on the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **71**, 53-59.
- **Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M.** (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850-858.
- **Sediah, N. G., Chrétien, M.** (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generation diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* **848**, 45-62.
- **Segawa, H., Yamashita, T., Kawakita, M., Taira, H.** (2000). Functional analysis of the individual oligosaccharide chains of Sendai virus fusion protein. *J. Biochem.* **128**, 65-72.
- **Sergel, T., McGinnes, L. W., Peeples, M. E., Morrison, T. G.** (1993). The attachment function of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein can be separated from fusion promotion by mutation. *Virology* **193**, 717-726.
- **Sergel, T., Morrison, T. G.** (1995). Mutations in the cytoplasmic domain of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus depress syncytia formation. *Virology* **210**, 264-272.
- **Server, A. C., Smith, J. A., Waxham, M. N., Wolinsky, J. S., Godman, H. M.** (1985). Purification and amino-terminal protein sequence analysis of the mumps virus fusion protein. *Virology* **144**, 373-383.
- **Sheid, J. J., Caliguri, L. A., Compans, R. W., Choppin, P. N.** (1972). Isolation of paramyxovirus glycoproteins. Association of both hemagglutinin and neuraminidase activities with the larger SV5 glycoprotein. *Virology* **50**, 640-652.
- **Shioda, T., Iwasaki, K., Shibuta, H.** (1986). Determination of the complete nucleotide sequence of the Sendai virus genome RNA and the predicted amino acid sequences of the F,HN and L proteins. *Nucleic Acids Res.* **14**, 1545-1563.

Bibliografía

- **Shinnick, T. M., Lerner, R. A., Sutcliffe, J. G.** (1981). Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus. *Nature* **293**, 543-548.
- **Shoichi, I., Schmidt, A. C., Titani, K., Suzuki, M., Kido, H., Gotoh, B., Hamaguchi, M., Nagai, Y.** (1994). Assignment of disulfide bridges in the fusion glycoprotein of Sendai virus. *J. Virol.* **68**, 3200-3206.
- **Singh, I., Doms, R. W., Wagner, K. R., Helenius, A.** (1990). Intracellular transport of soluble and membrane-bound glycoproteins: Folding, assembly and secretion of anchor-free influenza hemagglutinin. *EMBO J.* **9**, 631-639.
- **Skehel, J. J., Wiley, D. C.** (1998). Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell* **95**, 871-874.
- **Skehel, J. J., Wiley, D. C.** (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Ann. Rev. Biochem.* **69**, 531-569.
- **Smith, D. W., Frankel, L. R., Mathers, L. M., Tang, A. T., Ariagno, R. L., Prober, C. G.** (1991). A controlled trial of aerosolized ribavirin in infants receiving mechanical ventilation for severe respiratory syncytial virus infection. *N. Engl. J. Med.* **325**, 24-29.
- **Spence, L., Barratt, N.** (1986). Respiratory syncytial virus associated with acute respiratory infections in Trinidadian patients. *Am. J. Epidemiol.* **88**, 257-266.
- **Spies, C. P., Ritter, G. D. Jr., Mulligan, M. J., Compans, R. W.** (1994). Truncation of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein alters the conformation of the external domain. *J. Virol.* **68**, 585-591.
- **Spriggs, M. K., Murphy, B. R., Prince, G. A., Olmsted, R. A., Collins P. L.** (1987). Expression of the F and HN glycoproteins of human parainfluenza virus type 3 by recombinant vaccinia viruses: contributions of the individual proteins to the host immunity. *J. Virol.* **61**, 3416-3423.
- **Srinivasakumar, N., Ogra, P. L., Flanagan, T. D.** (1991). Characteristics of fusion of respiratory syncytial virus with HEp-2 cells as measured by R18 fluorescence dequenching assay. *J. Virol.* **65**, 4063-4069.
- **Stec, D. S., Hill, M. G. d., Collins, P. L.** (1991). Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology* **183**, 273-287.
- **Stegmann, T., Doms, R. W., Helenius, A.** (1989). Protein-mediated membrane fusion. *Annu. Rev. Biophys Biophys Chem.* **18**, 187-211.
- **Steiner, D. F.** (1998). The proprotein convertases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **839**, 9-24.
- **Steinhauer, D. A.** (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* **258**, 1-20.
- **Storch, G. A., Park, C. S.** (1987). Monoclonal antibodies demonstrate heterogeneity in the G glycoprotein of prototype strains and clinical isolates of respirator syncytial virus. *J. Med. Virol.* **22**, 345-356.

Bibliografía

- **Studier, F. W.** (1972). Bacteriophage T7. *Science* **176**, 367-376.
- **Sullender, W. M., Mufson, M. A., Anderson, L. J., Wertz, G. W.** (1991). Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J. Virol.* **65**, 5425-5434.
- **Suzu, S., Sakai, Y., Shioda, T., Shibuta, H.** (1987). Nucleotide sequence of the bovine parainfluenza 3 virus genome: the genes of the F and HN glycoproteins. *Nucleic Acids Res.* **15**, 2945-2958.
- **Takahashi, S.** (1990). Conformation of membrane fusion-active 20 residues peptides with of without lipid bilayers. Implication of α -helix formation for membrane fusion. *Biochemistry* **29**, 6257-6264.
- **Tan, K., Liu, J. -H., Wang, J. -H., Shen, S., Lu, M.** (1997). Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *PNAS* **94**, 12303-12308.
- **Tanabayashi, K., Takuchi, K., Okazaki, K., Hishiyama, M., Yamada, A.** (1992). Expression of mumps virus glycoproteins in mammalian cells from cloned cDNAs: both F and HN proteins are required for cell fusion. *Virology* **187**, 801-804.
- **Tashiro, M., Takeda, M., Tanaka, S., Nishimura, N., Takenaka, M., Kido, H.** (1993). Antibody against the carboxyl terminus of the F2 subunit of Sendai virus fusion glycoprotein inhibits proteolytic activation. *Virology* **194**, 882-885.
- **Taylor, G., Stott, E. J., Furze, J., Ford, J., Sopp, P.** (1992). Protective epitopes of the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* **73**, 2217-2223.
- **Tebbey, P. W., Unczur, C. A., LaPierre, N. A., Hancock, G. E.** (1999). A novel and effective intranasal immunization strategy for respiratory syncytial virus. *Viral. Immunol.* **12**, 41-45.
- **Teng, M. N., Collins, P. L.** (1998). Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles. *J. Virol.* **72**, 5707-57016.
- **Teng, M. N., Collins, P. L.** (1999). Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein. *J. Virol.* **73**, 466-473.
- **Tomasi, M., Baiocchi, M., Moscufo, N., Parolini, I., Squatriti, T., Bellini, T., Dallochio, F.** (1998). Mild proteolysis induces a ready-to-fuse state on Senai virus envelope. *FEBS Lett.* **423**, 286-290.
- **Tong, S., Compans, R. W.** (2000). Oligomerization, secretion, and biological function of an anchor-free parainfluenza virus type 2 (PI2) fusion protein. *Virology* **270**, 368-76.
- **Torion, C., López, J. A., Rivas, G., Andreu, D., Melero, J. A., Bruix, M.** (1995). Conformational studies of a short linear peptide corresponding to a major conserved neutralizing epitope of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *Biopolymers* **39**, 537-548.

Bibliografía

- **Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* **76**, 4350-4354.
- **Toyoda, T., Sakaguchi, T., Hirota, H., Gotoh, B., Kuma, K., Miyata, T., Nagai, Y.** (1989). Newcastle disease virus evolution. II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains. *Virology* **169**, 273-282.
- **Toyoda, T., Sakaguchi, T., Imai, K., Inocencio, N. M., Gotoh, B., Hamaguchi, M., Nagai, Y.** (1987). Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus. *Virology* **157**, 242-247.
- **Trudel, M., Nadon, F., Seguin, C., Dionne, C., Lacroix, M.** (1997). Identification of a synthetic peptide as part of a major neutralisation epitope of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **74**, 171-177.
- **Tsukiyama, K., Yoshikawa, Y., Yamanouchi, K.** (1988). Fusion glycoprotein (F) of rinderpest virus: entire nucleotide sequence of the F mRNA, and several features of the F protein. *Virology* **164**, 523-530.
- **Tsutsumi, H., Onuma, M., Suga, K., Honjo, T., Chiba, Y., Chiba, S., Ogra, P. L.** (1988). Occurrence of respiratory syncytial virus subgroup A and B strains in Japan, 1980 to 1987. *J Clin. Microbiol.* **26**, 1171-1174.
- **Umino, Y., Kohama, T., Sato, T. A., Sugiura, A., Klenk, H., -D., Rott, R.** (1990). Monoclonal antibodies to three structural proteins of Newcastle disease virus: biological characterization with particular reference to the conformational change of envelope glycoproteins associated with proteolytic cleavage. *J. Gen. Virol.* **71**, 1189-1197.
- **Varsanyi, T. M., Utter, G., Norrby, E.** (1984). Purification, morphology and antigenic characterization of measles virus envelope components. *J. Gen. Virol.* **65**, 355-366.
- **Venkatesan, S., Elango, N., Chanock, R. M.** (1983). Construction and characterization of cDNA clones for four respiratory syncytial viral genes. *PNAS* **80**, 1280-1284.
- **Vey, M., Orlich, M., Adler, S., Klenk, H. -D., Rott, R., Garten, W.** (1992). Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. *Virology* **188**, 408-413.
- **Vidal, S., Mottet, G., Kolakofsky, D., Roux, L.** (1989). Addition of high-mannose sugars must precede disulfide bond formation for proper folding of Sendai virus glycoproteins. *J. Virol.* **63**, 892-900.
- **Vikerfors, T., Grandien, M., Olcen, P.** (1987). Respiratory syncytial virus infections in adults. *Am. Rev. Respir. Dis.* **136**, 561-564.
- **Villanueva, N., Navarro, J., Mendez, E., García-Albert, I.** (1994). Identification of a protein kinase involved in the phosphorylation of the C-terminal region of human respiratory syncytial virus P protein. *J. Gen. Virol.* **75**, 555-565.

Bibliografía

- **Volchokov, V. E., Feldmann, H., Volchkova, V. A., Klenk, H. D.** (1998). Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *PNAS* **95**, 5762-5767.
- **Volkman, L. E., Goldsmith, P. A.** (1984). Budded *Atographa californica* NPV 64 K protein: further biochemical analysis and effects of postimmunoprecipitation sample preparations conditions. *Virology* **139**, 295-302.
- **Walker, J. A., Molloy, S. S., Thomas, G., Sakaguchi, T., Yoshida, T., Chambers, T. M., Kawaoka, Y.** (1994). Sequence specificity of furin, a proprotein-processing endoprotease, for the hemagglutinin of a virulent avian influenza virus. *J. Virol.* **68**, 1213-1218.
- **Walravens, K., Kettmann, R., Collard, A., Coppe, P., Burny, A.** (1990). Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses. *J. Gen. Virol.* **71**, 3009-3014.
- **Wang, C., Raghu, G., Morrison, T., Peeples, M. E.** (1992). Intracellular processing of the paramyxovirus F protein: critical role of the predicted amphipathic alpha helix adjacent to the fusion domain. *J. Virol.* **66** 4161-4169.
- **Walsh, E. E., Brandriss, M., W., Schlesinger, J. J.** (1985). Purification and characterization of the respiratory syncytial virus fusion protein. *J. Gen. Virol.* **66**, 409-415.
- **Walsh, E. E., Hruska, J.** (1983). Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J. Virol.* **47**, 171-177.
- **Ward, C. D., Paterson, R. G., Lamb, R. A.** (1995). Mutants of the paramyxovirus SV5 fusion protein: regulated and extensive syncytium formation. *Virology* **209**, 242-249.
- **Watanabe, T., Murakami, K., Nakayama, K.** (1993). Positional and additive effects of basic amino acids on processing of precursor proteins within the constitutive secretory pathway. *FEBS Lett.* **320**, 215-218.
- **Watanabe, M., Wang, A., Sheng, J., Gombart, A. F., Ayata, M., Ueda, S., Hirano, A., Wong, T. C.** (1995). Delayed activation of altered fusion glycoprotein in a chronic measles virus variant that causes subacute sclerosing panencephalitis. *J. Neurovirol.* **2**, 177-188.
- **Weber, E., Humbert, B., Streckert, H. J., Werchau, H.** (1995). Nonstructural protein 2 (NS2) of respiratory syncytial virus (RSV) detected by an antipeptide serum. *Respiration* **62**, 27-33.
- **Weissenhorn, W., Carfi, A., Lee, K.-H., Skehel, J. J., Wiley, D. C.** (1998). Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion sub-unit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Mol. Cell.* **2**, 605-616.
- **Weissenhorn, W., Dessen, A., Calder, L. J., Harrison S. C., Skehel, J. J., Wiley, D. C.** (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**, 426-430.

Bibliografía

- **Weissenhorn, W., Dessen, A., Calder, L. J., Harrison, S. C., Skehel, J. J., Wiley, D. C.** (1999). Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol. Membrane Biol.* **16**, 3-9.
- **Wertz, G. W., Stott, E. J., Young, K. K.-Y., Anderson, K., Ball, L. A.** (1987). Expression of the fusion protein of human respiratory syncytial virus from recombinant vaccinia virus vectors and protection of vaccinated mice. *J. Virol.* **64**, 927-301.
- **Wharton, S. A., Martin, S. R., Ruigrok, R. W., Skehel, J. J., Wiley D. C.** (1988). Membrane fusion by peptide analogues of influenza virus haemagglutinin. *J. Gen. Virol.* **69**, 1847-1857.
- **Wharton, S. A., Skehel, J. J., Wiley, D. C.** (2000). Temperature dependence of fusion by Sendai virus. *Virology* **271**, 71-78.
- **Whimbey, E., Champlin, R. E., Englund, J. A., Mirza, N. Q., Piedra, P. A., Goodrich, J. M., Przepiorka, E., Luna, M. A., Morcine, R. C., Neumann, J. L.** (1995). Combination therapy with aerosolized ribavirin and intravenous immunoglobulin form respiratory syncytial virus disease in adults bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* **73**, 393-399.
- **White, J. M.** (1990). Viral and cellular membrane fusion proteins. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 675-97.
- **Whitehead, S. S., Bukreyev, A., Teng, M. N., Firestone, C. Y., St Claire, M., Elkins, W. R., Collins, P. L., Murphy, B. R.** (1999). Recombinante respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. *J. Virol.* **73**, 3438-3442.
- **Wild, T. F., Buckland, R.** (1997). Inhibition of measles virus infection and fusion with peptides corresponding to the leucine zipper region of the fusion protein. *J. Gen. Virol.* **78**, 107-111.
- **Wild, C., Greenwell, T., Matthews, T.** (1993). A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**, 1051-1053.
- **Wild, C., Oas, T., McDanal, C., Bolognesi, D., Matthews, T.** (1992). A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *PNAS* **89**, 10537-10541.
- **Wild, C. T., Shugars, D. C., Greenwell, T. K., McDanal, C. B., Matthews, T. J.** (1994). Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *PNAS* **91**, 9770-9774.
- **Wrigley, N. G., Brown, E. B., Skehel, J. J.** (1983). Electron microscopic evidence for the axial rotation and inter-domain flexibility of the Fab regions of immunoglobulin G. *J. Mol. Biol.* **169**, 771-774.
- **Wrigley, N. G., Brown, E. B., Skehel, J. J.** (1986). Electron microscopy of influenza virus. En: *Electron microscopy of proteins* (Harris, J. R., Hornee, R. W. ed.), vol. 5 (Viral Structure), Academic Press, Londres pp. 103-163.

Bibliografía

- **Wyatt, L. S., Whitehead, S. S., Venanzi, K. A., Murphy, B. R., Moss, B.** (1999). Priming and boosting immunity to respiratory syncytial virus by recombinant replication-defective vaccinia virus MVA. *Vaccine* **18**, 392-397.
- **Yang, Z. -N., Mueser, T. C., Kaufman, J., Stahl, S. J., Wingfield, P. T., Hyde, C. C.** (1999). The crystal structure of the SIV gp41 ectodomain at 1.47 Å resolution. *J. Struct. Biol.* **126**, 131-144.
- **Yao, Q., Compans, R. W.** (1995). Differences in the role of the cytoplasmic domain of human parainfluenza virus fusion glycoprotein. *J. Virol.* **69**, 7045-7053.
- **Yao, Q., 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.
- **Yeagle, P. L., Epand, R. M., Richardson, C. D., Flanagan, T. D.** (1991). Effects of the 'fusion peptide' from measles virus on the structure of N-methyl dioleoylphosphatidylethanolamine membranes and their fusion with Sendai virus. *Biochim. Biophys Acta* **1065**, 49-53.
- **Young, J. K., Hicks, R. P., Wright, G. E., Morrison, T. G.** (1997). Analysis of a peptide inhibitor of paramyxovirus (NDV) fusion using biological assays, NMR, and molecular modeling. *Virology* **238**, 291-304.
- **Young, J. K., Hicks, R. P., Wright, G. E., Morrison, T. G.** (1998). The role of leucine residues in the structure and function of a leucine zipper peptide inhibitor of paramyxovirus (NDV) fusion. *Virology* **243**, 21-31.
- **Young, J. K., Li, D., Abramowitz, M. C., Morrison, T. G.** (1999). Interaction of peptides with sequences from the Newcastle disease virus fusion protein heptad repeat regions. *J. Virol.* **73**, 5945-5956.
- **Zhao, X., Singh, M., Malashkevich, V. N., Kim, P. S.** (2000). Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *PNAS* **97**, 14172-14177.
- **Zhou, J., Dutch, R. E., Lamb, R. A.** (1997). Proper spacing between heptad repeat B and the transmembrane domain boundary of the paramyxovirus SV5 protein is critical for biological activity. *Virology* **239**, 327-339.
- **Zimmer, G., Trotz, I., Herrler, G.** (2001). N-Glycans of F protein differentially affect fusion activity of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* **75**, 4744-4751.