

LA GLICOPROTEINA G DE LOS RABDOVIRUS. UN MODELO PARA EL ESTUDIO DE VIROLOGÍA COMPARADA Y DESARROLLO DE VACUNAS RECOMBINANTES

**G. LORENZO
A. ESTEPA
J. M. COLL**

Sanidad Animal. CISA - Valdeolmos - 28130 MADRID

RESUMEN

Los rabdovirus poseen una nucleocápsida que rodea a una molécula de ARN. El ARN está envuelto por una bicapa lipídica que está atravesada por trímeros formados por monómeros asociados de forma no covalente de la proteína G (pG). La pG tiene unos 500 aminoácidos (aa), 2-6 sitios potenciales de N-glicosilación, 12-16 residuos de cisteína altamente conservados, 2-3 regiones de heptadas repetidas de aa hidrofóbicos en las posiciones a y d, un péptido señal que se elimina después de la inserción en la membrana, un dominio transmembranal de 20 aa hidrofóbicos en la región carboxi-terminal y una región hidrofílica citoplasmática en la parte carboxi-terminal. La asociación-disociación entre monómeros y trímeros y el desplazamiento de los trímeros en la membrana lipídica se alteran por cambios conformacionales. Los trímeros de pG son responsables de la unión del virus a los receptores celulares, de la fusión de membranas inducida a bajo pH y de la reacción con los Ac neutralizantes. Las diferencias antigénicas entre monómeros y trímeros pueden tener influencia en el desarrollo de nuevas vacunas. La complejidad conformacional de la pG de rabdovirus obliga a utilizar vectores de expresión eucarióticos de cara a obtener posibles vacunas recombinantes.

PALABRAS CLAVE: Rabdovirus
Glicoproteína
Vacunas recombinantes

Recibido: 6-2-95

Aceptado para su publicación: 6-9-96

RABDOVIRUS

Morfología molecular

La morfología presenta forma de bala, con un extremo redondeado y otro plano. La presencia de viriones truncados (partículas defectivas d) interfieren en la replicación de los viriones infecciosos i (1/100-1/1000 i/d). Las partículas defectivas están especialmente presentes en infecciones persistentes y en pases de alta multiplicidad *in vitro* (Horodyski *et al.*, 1983).

Los rabdovirus están rodeados por una bicapa lipídica que procede de la célula huésped en la que se incluyen espículas de pG separadas 5 nm, sensibles a tripsina. La disrupción de la bicapa lipídica con detergentes, libera la ribonucleocápsida de unas 3,5 μ , enrollada (en ausencia de sales) o desenrollada (en alta fuerza iónica).

El ARN de los rabdovirus posee ~11000 bases que codifican para 5-6 proteínas (Tabla 1). La proteína G (pG) que forma un homotrímero (monómeros de 65 kDa), la proteína de matriz M², la polimerasa L (200 kDa), una proteína a veces fosforilada, M1, NS o P (24 kDa) y la nucleoproteína N fosforilada (38 kDa). Las proteínas internas, L, N, y el ARN viral forman la ribonucleocápsida.

TABLA 1
PROTEINAS DE RABDOVIRUS
Rhabdoviral proteins

Proteína	P.M (KDa)	moléculas/virion			
		VSV	Rabia	VNHI	VSHV
L	200 - 250	50	72	43	14
G	67	1205	1335	166	107
N	50	1258	1325	766	892
M1 (NS)	33	466	691	270	464
M2 (M)	23	1826	1148	1192	956

Vesicular stomatitis virus, **VSV**, (Wagner *et al.*, 1972); **Rabia**, (Flamand *et al.*, 1993); Necrosis hematopoiética infecciosa, **VNHI**, (Hsu *et al.*, 1985); Septicemia hemorrágica viral, **VSHV**, (Basurco, 1990).

La proteína M2 parece unir por un lado a la pG por la cara interna de la membrana y por el lado opuesto a la ribonucleocápsida (Chong, Rose, 1993; Kaptur *et al.*, 1991). Se ha propuesto un nuevo modelo para la estructura de los rabdovirus en el cual la proteína M² se encuentra dentro de la ribonucleocápsida. Este modelo predice el contacto entre la proteína M2 y la pG solamente en los extremos del

esqueleto (Fig. 1), lo que se ha confirmado con estudios de unión de liposomas (Barge *et al.*, 1993). La proteína M² es de carácter básico (pI = 9) y parece unirse a los residuos de fosfatidilserina de la superficie interna de la membrana (Benmansour *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1993; Zakowsky *et al.*, 1981).

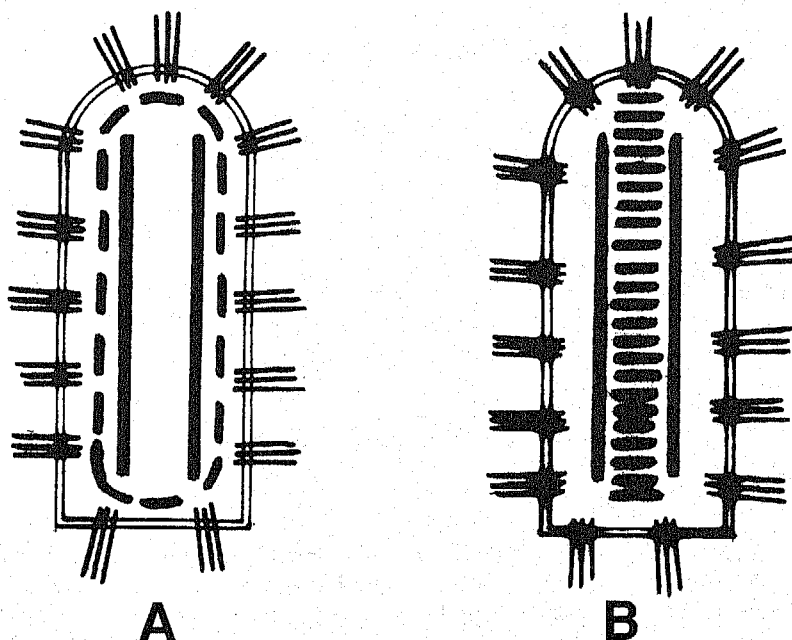


Fig. 1.- Los dos modelos propuestos para la morfología molecular de los rabdovirus

Los rabdovirus contienen una ribonucleocapsida interna (||) rodeada por una bicapa lipídica (==) a través de la cual atraviesan los homotrimeros de pG (|||). La proteína M (---) o bien cubre la superficie interna de la membrana vírica (modelo A) o está dentro de la nucleocapsida (modelo B, según Barge *et al.*, 1993)

The two proposed models for rhabdovirus molecular morphology

*Rhabdoviruses contain an internal ribonucleocapsid (||) surrounded by a lipid-bilayer (==) through which pG homotrimer spikes protrude (|||). The M protein (---) either covers all the internal side of the viral membrane (model A) or is inside the ribonucleocapsid (model B, according to Barge *et al.*, 1993)*

Tipos de rabdovirus

La familia Rabdoviridae está formada por el género *Lisavirus* (rabia) y el género *Vesiculovirus* (virus de la estomatitis vesicular, VSV) (Bourhy *et al.*, 1993; Who, 1984). Dentro de esta familia están también los virus que infectan peces, plantas e insectos (Wagner *et al.*, 1972). Algunos rabdovirus pueden infectar diferentes especies, por ejemplo, algunas cepas de VSV infectan vertebrados, insectos y plantas.

La rabia afecta a mamíferos de todo el mundo (Benmansour *et al.*, 1992; Tordo *et al.*, 1993). El VSV se agrupa en dos serotipos principales, New-Jersey

(NJ) e Indiana (Ind) (Bourhy *et al.*, 1993; Nichol *et al.*, 1989). Los vesiculovirus afectan principalmente al ganado vacuno, equino y porcino (Bilsel, Nichol, 1990; Nichol *et al.*, 1989). Los rabdovirus de peces incluyen aquellos que infectan a los de agua fría, como el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI) y el virus de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV) y a los de agua caliente como el virus de la viremia primaveral de la carpa.

Cinco ARNm codifican las proteínas estructurales L, G, M1, M2 y N mientras que un sexto ARNm (sólo detectable en rabdovirus de peces) codifica una proteína no viral (NV) de unos 23 kDa (Kurath *et al.*, 1985, 1995; Nichol *et al.*, 1995). El orden de los genes es 5'L-NV-G-M2-M1-N, que es idéntico a todos los rabdovirus excepto por la inserción del NV en los de peces (Basurco, 1994; Basurco, Benmansour, 1995).

Se han publicado numerosas secuencias de la pG de rabdovirus. Entre los rabdovirus de peces, sólo las secuencias del ADNc de la pG del VNHI (Koener *et al.*, 1987; Morzunov *et al.*, 1995; Oshima *et al.*, 1995; Schtze *et al.*, 1995) y del VSHV (Basurco *et al.*, 1995; Bearzotti *et al.*, 1995; Lorenzen *et al.*, 1993; Thiry *et al.*, 1991) se han publicado hasta hoy, pero quedan más de 100 rabdovirus sin caracterizar (Brun *et al.*, 1995).

LA GLICOPROTEINA G DE LOS RABDOVIRUS

Estructura molecular

Los rabdovirus poseen una única proteína integral de membrana homotrimérica (Dubovi, Wagner, 1990), la pG, que forma una espícula de 83 Å (Gaudin *et al.*, 1993). La pG es responsable de la unión del virus a los receptores celulares (Wunner *et al.*, 1984), contiene las propiedades de fusión del virus detectables a pH < 6 (Estepa, Coll, 1996a; Gaudin *et al.*, 1993; Konieczko *et al.*, 1994; Lecocq-Whonneux *et al.*, 1994; Lorenzen, Olesen, 1995) e induce Ac neutralizantes del huésped (Coll, Domínguez-Juncal, 1995; Dietzschold *et al.*, 1987a; Engelking, Leong, 1989; Kelley *et al.*, 1972; Lorenzen *et al.*, 1990).

La pG de los rabdovirus tiene unos 500 aminoácidos incluyendo el péptido señal, dos o más sitios de glicosilación (Rose, Gallione, 1981), un fragmento hidrofóbico transmembranal no glicosilado resistente a proteasas (500 KDa), 1 ó 2 sitios acilados, y una cola peptídica carboxi-terminal (Whitt *et al.*, 1989). En la pG de todos los rabdovirus estudiados esta estructura básica está altamente conservada pero con secuencias de aa distintas para cada género (Fig 2) (Coll, 1995a).

Los monómeros de pG sufren disociación (a concentraciones de nM ó 60 ng/ml)-asociación reversible (en concentraciones 1000 veces más altas) en presencia de octilglucosido, tal y como se demostró usando monómeros marcados con fluoresceína y rodamina (Lyles *et al.*, 1990). El intercambio entre monómeros de pG también ocurre *in vivo* como quedó demostrado por la utilización de monómeros genéticamente diferentes (Zagouras *et al.*, 1991). La interacción de los monómeros de la pG está estabilizada por la proteína M2 (Lyles *et al.*, 1992).

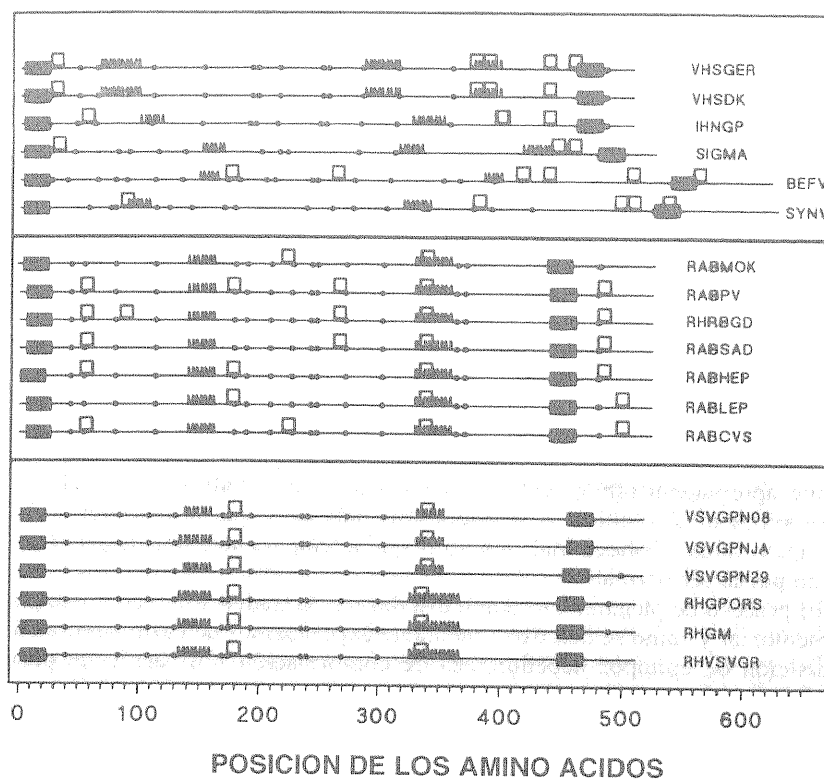


Fig. 2.- Posiciones relativas de los principales elementos estructurales de la PG de rhabdovirus

- , cisteínas; □, predicción de glicosilación NX (S, T); ■, péptido señal y segmento transmembrana; ||||| repeticiones de heptadas.
- Relative positions of main structural elements of the glycoprotein G of rhabdoviruses
- , cysteins; □, putative glycosilation NX (S, T); ■, predicted transmembrane and signal peptide; ||||| heptad repeats

La disociación-asociación del trímero-monómero de pG depende del pH. Por ejemplo, la pG en presencia de octilglucosido a pH 7,5 aparece como trímeros en el VSV-Ind (pI 6,1) y como monómeros en el VSV-NJ (pI 5,7). Sin embargo, los trímeros de la pG del VSV-NJ son más estables a pH 5,7 (Doms *et al.*, 1988).

Glicosilación

Los carbohidratos de la pG dan cuenta del 10 p. 100 de la proteína con ~4 KDa. La cadena de carbohidratos tiene una estructura con varias ramas unidas a un centro rico en manosas (Reading *et al.*, 1978). El grado de sialización (cargas negativas) produce heterogeneidad en los patrones de glicosilación dependiente del huésped ya que el virión depende de las células del huésped para la síntesis

de sus carbohidratos (Stanley *et al.*, 1984). La glicosilación de la pG de VHSV se está utilizando para poner a punto un método de aislamiento de trímeros de la pG por cromatografía de afinidad (en preparación).

Importancia de la glicosilación para el plegamiento y ensamblaje

Cuando el ARNm codificado por el gen de la pG se traduce *in vitro*, se sintetiza un precursor no glicosilado de 63 kDa. Con la adición de membranas microsomales, se obtiene una proteína sin péptido señal y glicosilada, de 67 kDa (Lodish *et al.*, 1981). Un precursor de manosas se transfiere después a la molécula de G. Más tarde en el Golgi se añaden la N-acetilglucosamina, galactosa, ácido siálico y fucosa y la pG se transporta a la membrana plasmática (Schlesinger *et al.*, 1984). La eliminación de las cisteínas (Machamer, Rose, 1988) y la inhibición de la N glicosilación ya sea por tunicamicina o por mutagénesis dirigida provoca la formación de agregados, de complejos entrelazados por puentes disulfuro y de virus sensibles a temperatura (Doms *et al.*, 1987; Gallione, Rose, 1985). La glicosilación se necesita para que la pG naciente se pliegue apropiadamente y probablemente para hacer a algunos intermediarios hidrofóbicos más solubles. A temperaturas más altas que la fisiológica, la pG poco glicosilada se pliega mal, mientras que a temperaturas más bajas el plegamiento puede ser normal.

El proceso de plegamiento comienza durante la traducción y continúa posteriormente, tal y como se demostró mediante experimentos de caza-captura con la adquisición de epítomos dependientes de conformación, formación de puentes disulfuro y resistencia a proteasas/glicosidasas (Doms *et al.*, 1988). Sólo cuando las moléculas de pG están correctamente plegadas se transportan fuera del retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi donde pueden permanecer hasta 20 minutos (Pilakova, Russ, 1992). El ensamblaje de los trímeros ocurre tras el correcto plegamiento de los monómeros. La coexpresión de monómeros normales y monómeros mutantes o fluorescincados de diferentes cepas de virus ha demostrado que los monómeros que forman los trímeros se seleccionan al azar entre todos los sintetizados (Lyles *et al.*, 1992). Es muy probable que existan diferencias antigénicas entre los monómeros aislados y los ya ensamblados en trímeros lo que tendría implicaciones para el desarrollo de nuevas vacunas (Doms *et al.*, 1993).

Modificación de la pG por adición de ácidos grasos

La incorporación de ácidos grasos a la pG se ha demostrado en rabia (Gaudin *et al.*, 1991) y en VSV-Indiana (Magee *et al.*, 1984). Sin embargo, la pG sin ácidos grasos se glicosila y se transporta normalmente en la membrana.

Proteína G soluble

Una forma soluble de la pG de VSV (Cheng, Huang, 1986), de rabia (Chatis, Morrison, 1983) y de VHSV (Estepa, Coll, 1996b) se acumula en el medio extra-

celular de células infectadas *in vitro*. En VSV, una de cada seis moléculas de pG se libera en el medio. La pG soluble purificada de sobrenadantes de cultivo infectados con viriones de rabia (Dietzschold *et al.*, 1983), o con VSV (Florkiewicz *et al.*, 1983) es 5,5 KDa más pequeña que la pG asociada al virus debido a la ausencia de la región carboxi terminal que contiene el dominio citoplasmático y el dominio hidrofóbico de anclaje a la membrana.

INTERACCION CELULA-RABDOVIRUS

El receptor celular de los rabdovirus

La interacción entre el virus y la célula huésped depende de la presencia de un receptor(es) (aún por identificar) en la membrana de dicha célula y de una molécula (pG) de unión a la célula en el virión.

La saturación de la adsorción de VSV a las células es completa con 4000 viriones de VSV por célula (Schlegel *et al.*, 1982). Las curvas de dosis-respuesta de unión viral muestran, al menos, dos interacciones entre células y VSV (Schlegel *et al.*, 1982). El VSV neutralizado por Ac también se une a células, lo que vuelve a indicar la existencia de dos sitios de unión a la célula (Schlegel, Wade, 1983). Por otra parte, la adsorción del VSV compite con la de la rabia, lo que sugiere la existencia de un receptor común para todos los rabdovirus.

La adsorción del VSV no se inhibe con el tratamiento de las células con tripsina, pero sí con el tratamiento con fosfolipasas. Receptores sensibles a fosfolipasas también existen para el virus de la rabia (Superti *et al.*, 1984; Wunner *et al.*, 1984). De todos los fosfolípidos ensayados, solamente la fosfatidilserina (PS) fue capaz de inhibir la unión del VSV al receptor celular de superficie y además inhibió el 90 p. 100 de la formación de placas (Schlegel, Wade, 1983). La unión de PS a la pG también se ha demostrado recientemente en VSHV (Coll, 1995,; Coll, 1995d). Tanto la cabeza polar como las porciones hidrofóbicas de los ácidos grasos de la PS son esenciales para la adsorción viral (Estepa, Coll, 1996b; Yamada, Ohnishi, 1986). La segregación de PS a la parte interna de las membranas biológicas (80-90 p. 100) podría explicar el número limitado de virus que se unen al exterior de la membrana celular. Sin embargo y a pesar del papel aparente del PS en la unión e infección del VSV también es posible que la PS constituya sólo una parte de un receptor formado por un complejo lipoproteico.

La secuencia de amino acidos del 170 al 255 de la pG de rabia posee homología con toxinas de serpientes que se unen al receptor de acetilcolina (AChR) (Tordo *et al.*, 1993) y consecuentemente, los péptidos sintéticos de esas regiones de la pG se unen al AChR y se comportan como antagonistas del AChR (Hanham *et al.*, 1993). Usando Ac policlonales (AcP) y Ac monoclonales (AcM) antiviral de la rabia se ha obtenido evidencia que confirma que el AChR es un receptor para este virus (Hanham *et al.*, 1993). Sin embargo, esto no explica todas las infecciones de rabdovirus y el receptor(es) de rabdovirus continúa siendo un misterio.

La molécula rabdoviral que interacciona con el receptor

La eliminación de los trímeros de la pG de la superficie de los rabdovirus por proteasas reduce la adsorción y la infectividad viral, la pG es por lo tanto la molécula viral que interacciona con el receptor celular. La adsorción de los rabdovirus a la membrana celular no requiere energía, por el contrario, la entrada posterior al interior de la célula por endocitosis sólo ocurre a temperatura fisiológica. La fusión entre la membrana celular y la viral ocurre más tarde, y se inhibe por las aminos lisosomotrópicas (etilendiamina, cloruro amónico, cloroquina, etc.) en VSV (Rigaut *et al.*, 1991; Schlegel, Wade, 1985) y en rabia (Superti *et al.*, 1984) lo que sugiere que se requiere el pH bajo existente en los lisosomas.

Consecuentemente, la exposición de células infectadas o células transfectadas (que expresan la pG en sus membranas) a pH ácido (~5,5) provocan la fusión célula-célula y la aparición de sincitios. En un principio pareció que los 25 aa amino terminales de la G del VSV, especialmente los primeros 6 aa (Schlegel, Wade, 1985), eran los responsables de la fusión ya que tenían actividad hemolítica dependiente del pH (Schlegel, Wade, 1984). Sin embargo, después se obtuvieron virus mutantes sin capacidad hemolítica pero con fusión dependiente de pH (Woodgett, Rose, 1986), por lo que la región responsable de fusión debería de estar en otra localización, tal y como se ha demostrado diez años más tarde.

La activación de los trímeros de la pG para la fusión requiere cambios conformacionales que exponen regiones hidrofóbicas de la proteína para interaccionar con la membrana diana. Este fenómeno se demostró en el virus de la rabia utilizando AcM antirregión II (aa 165 al 203, región de unión al AchR) y ensayos de fluorescencia (Bourhy *et al.*, 1993; Gaudin *et al.*, 1993). El modelo propuesto para el cambio conformacional fusogénico en el trímero de la hemaglutinina de gripe implica un péptido de fusión hidrofóbico. El péptido de fusión hidrofóbico situado en el interior del trímero sale hacia el exterior apuntando a la membrana de la célula diana tal y como se ha demostrado por rayos X (Bizebard *et al.*, 1995; Bullough *et al.*, 1994; Carr, Kim, 1993). Los trímeros de la pG de rabdovirus podrían mostrar ciertas semejanzas con el modelo antes mencionado (Gaudin *et al.*, 1995; Gaudin *et al.*, 1995; Haughson, 1995).

Analizando por ordenador la secuencia de aa derivada del ADNc de la pG de rabia, estomatitis vesicular, rabdovirus de peces y plantas, se han localizado dos o tres regiones que contienen tres o más heptadas consecutivas de repeticiones de aa hidrofóbicos (posiciones a-d) (Coll, 1995b) (Fig. 2).

Se desconocen todavía las funciones de las heptadas repetidas definidas en la pG de rabdovirus. Varias líneas de evidencia sugieren que las heptadas repetidas situadas en la región amino-terminal de la pG podrían estar de alguna manera relacionadas con fusión viral, neutralización y/o unión a fosfolípidos (Coll, 1995b). Por mutagénesis dirigida, se identificó la secuencia del aa 123 al 137 de la pG de VSV como un péptido fusogénico dependiente de bajo pH (Frederiksen, Whitt, 1995; Huang *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1993). Estos mutantes de VSV mapean inmediatamente antes de las heptadas hidrofóbicas repetidas, aa 134 a 161 para la mayoría de los VSV estudiados (Tabla 2). Estos datos se han confirmado recientemente por técnicas de fotomarcado hidrofóbico tanto en VSV como en rabia (Durrer *et al.*, 1995).

TABLA 2

**VIRUS RABDOVIRIDAE Y SECUENCIAS DE LA
GLICOPROTEINA SELECCIONADAS PARA ESTE ESTUDIO**
Rhabdoviridae virus and glycoprotein sequences selected for this study

Huésped	Descripción virus	#aA	Referencia
Peces	VHSGER VHSV 07,71	507	(Thiry et al., 1991)
	VHSDK VHSV DK	507	(Lorenzen et al., 1993)
	VHSMKAH VHSV-Makah	507	Benmansour (com. pers.)
	IHNGP IHNV Cedar	508	(Koener et al., 1987)
	VPC Carp	507	Lecompte (com. pers.)
Mamíferos	RABMOK rab Mokola	524	(Tordo et al., 1993)
	RABPV rab PV	524	(Tordo et al., 1986)
	RHRBGD rab ERA	524	(Anilionis et al., 1990)
	RABSAD rab SADB19	524	(Conzelmann et al., 1990)
	RABMEP rab MEP	524	(Morimoto et al., 1989)
	RABLEP rab LEP	524	(Tordo, 1991)
	RABCVS rab CVS	524	(Prehaud et al., 1989)
Ganado	VSVGPN08 VSV-NJ-I	517	(Nichol et al., 1989)
Caballo	VSVGPNJA VSV-NJ-II	517	(Nichol et al., 1989)
Cerdo	VSVGPN29 VSV-NJ-III	517	(Nichol et al., 1989)
	RHGPORS VSV Orsay	511	(Gallione, Rose, 1985)
	RHGM VSV San Juan	511	(Rose, Gallione, 1981)
	RHVSVGR VSV Indiana	511	(Vandepol et al., 1986)
Insecto	SIGMA Drosophila	526	(Teninges et al., 1993)
	BEFV Bov. eph. fev.	623	(Walker et al., 1992)
Planta	SYNVG ATCC-PV263	628	(Goldberg et al., 1991)

VSHV, septicemia hemorrágica viral; NHI, necrosis hematopoyética infecciosa; VPC, viremia primaveral de la carpa; RAB, rabia; VSV, virus de la estomatitis vesicular; BEFV, virus de la fiebre efímera bovina; SYNV, sonchus yellow net virus.

Por otra parte, algunos mutantes de rabia resistentes a anticuerpos monoclonales (MAR) mapean entre los aa 330-338 y aa 342-343, ambos dentro de las heptadas repetidas de rabia (aa 330-360) (Benmansour *et al.*, 1991; Lafon *et al.*, 1983; Seif *et al.*, 1985; Wunner *et al.*, 1985).

Finalmente, una región de unión a fosfolípidos (p2') de la pG de VHSV ha sido identificada mediante ensayos de unión a fosfolípidos en fase sólida por pepscan, péptidos sintéticos, pG purificada o recombinante (Estepa, Coll, 1996b; Estepa *et al.*, 1994). La región P2 (aa 82 al 109) se encontraba dentro de cinco heptadas repetidas de aa hidrofóbicos en a y d (aa 68 al 102) que tienen estructura proba-

ble de alfa-hélice. No se sabe todavía si las regiones inmediatas podrían estar relacionadas con la fusión de membranas (Chambers *et al.*, 1990) inducidas por la pG de VSHV. Sin embargo, existe una dependencia de pH similar en la unión a fosfolípidos por VSHV y en la fusión de membranas mediada por la pG de VSHV (Estepa, Coll, 1996b; Lecocq-Xhonneux *et al.*, 1994) y además péptidos similares en IHN, rabia y VSV también ligan PS (en preparación).

INTERACCION HUESPED-RABDOVIRUS

Antigenicidad de la pG de rabia

La importancia relativa de cada uno de los posibles mecanismos de defensa durante el curso de la infección natural o después de la vacunación (Brochier *et al.*, 1995) siguen siendo bastante desconocidos (Xiang *et al.*, 1995). Algunos estudios relacionan directamente la protección contra la rabia con el nivel de Ac neutralizantes (Wiktor *et al.*, 1973) aunque no ocurre en todos los estudios (Dietzschold *et al.*, 1988; 1987b). El uso de AcM y AcP ha demostrado diferencias antigénicas entre los distintos aislados de rabia para la pG (Flammand *et al.*, 1980). La mayoría de Ac anti-rabia obtenidos por inmunización con virus inactivado y seleccionados por inmunofluorescencia, reconocen epítopos conformacionales neutralizantes (Dietzschold *et al.*, 1988; 1987b; Flammand *et al.*, 1980; Wiktor, Koprowsky, 1980). Sin embargo, parece que el número de AcM anti-pG no conformacionales neutralizantes se va incrementado paulatinamente (Bunschoten *et al.*, 1989; Kontseikova *et al.*, 1992; Lafay *et al.*, 1996; Ni *et al.*, 1995; VanDeerHeijden *et al.*, 1993).

Se ha publicado una descripción completa de la antigenicidad de la pG de la rabia en ratones mediante el empleo de 266 AcM neutralizantes y mutantes resistentes a la neutralización (MAR). La mayoría de los AcM neutralizantes definen el sitio II (72,5 p.100) y el sitio III (24,8 p.100) (Benmansour *et al.*, 1991). Los mutantes MAR del sitio II tienen sustituciones simultáneas entre los aa 34-42 y aa 198-200. Si estas sustituciones de aa están en las regiones de unión a los AcM, el sitio II es un sitio antigénico conformacional discontinuo (Benmansour *et al.*, 1991). Mutantes MAR seleccionados a pH 5 se han descrito recientemente en posiciones distintas a las de los mutantes MAR seleccionados a pH 7 (Raux *et al.*, 1995).

También se ha definido un único epítipo neutralizante lineal (HDFRSDE). Sin embargo, la frecuencia de AcP contra este epítipo en suero de animales vacunados contra la rabia era muy bajo (VanderHeijden *et al.*, 1993). No obstante, este péptido se ha empleado sólo o en combinación con epítopos de células T para producir AcP anti-rabia y para inducir protección en ratones (Dietzschold *et al.*, 1990). Ahora bien, recientemente se ha encontrado que las regiones antigénicas mapeadas por mutantes MAR no coinciden con las lineales mapeadas por fragmentos recombinantes (Lafay *et al.*, 1996), lo que todavía no se ha podido interpretar correctamente.

Para localizar regiones de la pG de rabia-ERA importantes en neutralización

(Dietzschold *et al.*, 1982) y en linfoproliferación (MacFarlan *et al.*, 1984), se obtuvieron fragmentos peptídicos por digestión con bromuro de cianogeno (CNBr). El péptido 123-198 fue el único inmunoprecipitado con suero hiperinmune. Los títulos de AcP obtenidos contra los péptidos son más bajos que los obtenidos contra la pG nativa, de modo que la conformación que se pierde durante el aislamiento de los péptidos contribuye mucho a los sitios antigénicos. Esto está de acuerdo con la observación de que los AcM neutralizantes no se unen a estos fragmentos y a que después de la reducción, la pG pierde el 95 p.100 de su antigenicidad (Dietzschold *et al.*, 1982). La existencia de un bucle disulfuro entre la parte amino terminal y la parte interna de la pG está también de acuerdo con que el sitio II sea discontinuo y dependiente de conformación, como se ha demostrado con mutantes MAR.

Para neutralizar el virus de la rabia se estimó por microscopía electrónica que se necesita una media de 1-2 moléculas de IgG/3 espículas y 1 IgM/q espículas de la superficie del virus (Flamand *et al.*, 1993).

Antigenicidad de la pG de VSV

Sóamente la pG de VSV induce y reacciona con Ac neutralizantes (Kelley *et al.*, 1972; Portner *et al.*, 1980; Wiktor, Clark, 1973). La existencia de cuatro grupos de AcM neutralizantes *in vitro* (definen cuatro epítopos no solapantes) en la pG de VSV-Ind (Volk *et al.*, 1982) y en el VSV-NJ (LeFrancois, Lyles, 1982; Nagata *et al.*, 1992) se ha definido por producción de AcM y mapeo con mutantes MAR (Keil, Wagner, 1989; LeFrancois, 1984; Vandepol *et al.*, 1986). Como en el virus de la rabia, la reducción de los puentes disulfuro de la pG de VSV, inhibe la unión de la mayoría de los AcM neutralizantes. Dos AcM anti-pG reaccionan también con la proteína M de VSV (Volk *et al.*, 1982), lo que confirma la interacción pG-M2. Los AcM neutralizantes no inhiben la adsorción de VSV pero la mayor parte de los AcM neutralizantes también inhibe la fusión celular mediada por VSV.

La estabilización del equilibrio monómero/trímero en la pG de VSV por la proteína M2 (Lyles *et al.*, 1992; Zagouras *et al.*, 1991) y el cambio de estructura del trímero inducido por el bajo pH de la fusión (Gaudin *et al.*, 1992; 1993) sugieren la importancia de la estructura trimérica como una diana para los Ac neutralizantes (Benmansour *et al.*, 1991; Kontseikova *et al.*, 1992). Diferencias antigénicas entre monómeros y trímeros deben existir, puesto que es posible hacer un diagnóstico diferencial entre serotipos de VSV con el uso de la AcP obtenidos contra trímeros aislados (Allende *et al.*, 1992). Ahora bien, todavía no se han conseguido obtener AcM específicos de trímeros, probablemente debido a la inestabilidad de los trímeros (Lyles *et al.*, 1990).

Estimulación de la inmunología celular

Las células involucradas en las respuestas inmunes celulares primarias son linfocitos T. Las respuestas proliferativas de los clones de células T cooperadoras humanas específicos contra el virus de la rabia requieren para su inducción que

los antígenos víricos sean presentados por células presentadoras de antígeno autólogas en asociación con moléculas de histocompatibilidad de clase II. Algunos de los clones de células T que proporcionan ayuda en la elaboración de una respuesta de anticuerpos (que incluye anticuerpos neutralizantes) por linfocitos B, están estimulados por proteína N (Bunschoten *et al.*, 1989; Ertl *et al.*, 1989).

Para identificar los epítomos de linfoproliferación anamnésica, se investigó la capacidad de los péptidos-CNBr para inducir una respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos T derivados de ratones inmunizados con virus de la rabia (MacFarlan *et al.*, 1984). Diferentes preparaciones de la pG viral de rabia (purificada, nativa, soluble, rosetas, fragmentada-CNBr, virus inactivado-propiolactona) no mostraron diferencias en estimulación de linfoproliferación anamnésica en contraste con las respuestas de Ac.

Partículas defectivas de VSV, virus inactivado con luz UV, micelas de pG purificada y pG recombinante de vaccinia inyectadas en ratones defectivos de clase I indicaron que estos ratones poseen una respuesta citotóxica alternativa, mediada por clase II (Browning *et al.*, 1990; 1991; Forger *et al.*, 1991). La pG soluble fue la más eficiente para estimular las células que expresan moléculas de clase II (10 moléculas por célula o cerca de 0,3-3 µg de pG/ml). La extrapolación de estos resultados a las infecciones *in vivo* es posible, ya que la pG soluble se sintetiza durante las infecciones y es posible activar los genes de clase II en muchas células. La lisis de células no infectadas expuestas a la pG soluble por células citolíticas restringidas por clase II, podría explicar los síntomas hemorrágicos agudos que llevan a la muerte en algunas infecciones rabdovirales (Browning *et al.*, 1990).

Inmunología humoral y celular en rabdovirus de peces

La antigenicidad de la pG de los rabdovirus de peces, no está actualmente tan estudiada como las de la rabia o VSV (Coll, 1995; Leong *et al.*, 1995). Se han descrito unos pocos mutantes MAR de IHNV o VHSV (Bearzotti *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1994) y algunos mapeos de antigenicidad de VNHI utilizando fragmentos recombinantes (Huang, 1993; Leong *et al.*, 1995; Mourich, Leong, 1991; Xu *et al.*, 1991). Los mutantes MAR de VHSV atenuados a 25° C y el variante avirulento Makah contienen mutaciones en los aa 135-139 y en 431 (Bearzotti *et al.*, 1995). Además, se han descrito mutaciones en las regiones 257-259 y 283-288 en variantes no neutralizables de este virus (Jorgensen *et al.*, 1995). En nuestro laboratorio se está actualmente mapeando la antigenicidad de la pG de VHSV por medio de pepsan.

Pocos estudios han abordado la patogenicidad del VNHI o del VHSV. Se sabe, sin embargo, que afecta a los leucocitos entre otras células (Chilmonczyk *et al.*, 1995; Estepa, Coll, 1991a; 1991b; Helmick *et al.*, 1995). Los estudios de la inducción de inmunidad protectora en rabdovirus de peces se han enfocado hacia la respuesta de la pG, ya que los Ac que neutralizan a VSHV y VNHI muestran especificidad exclusiva por esta proteína (Bernard *et al.*, 1983; Engelking, Leong, 1989; Lorenzen *et al.*, 1990). Además la pG de VSHV estimula linfoproliferación

anamnésica en truchas inmunizadas y supervivientes a VSHV (Estepa *et al.*, 1991). Por otra parte, fragmentos recombinantes de la pG expresados en *E.coli*, *Y.ruckeri* (una bacteria patógena de trucha) y *S.cerevisiae* estimularon respuestas anamnélicas *in vitro* en cultivos de leucocitos de truchas supervivientes a la infección, pero no de truchas no infectadas (Estepa *et al.*, 1994) y péptidos sintéticos de la pG, han demostrado que cada trucha individual reacciona contra una zona(s) distinta de la pG (Lorenzo *et al.*, 1995). Recientemente, ha sido posible aislar las primeras células dependientes de antígeno (ADC) de peces utilizando un fragmento recombinante de la pG y células adherentes de trucha (Diago *et al.*, 1991) como presentadoras (Estepa *et al.*, 1996).

Algunas evidencias preliminares muestran correlación entre el reconocimiento de AcM neutralizantes *in vitro* con la capacidad de protección *in vivo* de los fragmentos clonados en VNHI (Xu *et al.*, 1991) y en VSHV (Estepa *et al.*, 1994; Lorenzen *et al.*, 1993). Sin embargo, quedan por hacer muchos estudios todavía, a causa de la escasez existente de AcM neutralizantes (Estepa *et al.*, 1993; Lorenzo *et al.*, 1996) y de los pocos estudios de antigenicidad de la pG de rhabdovirus de peces.

La nucleoproteína N aumenta la inmunidad protectora inducida por la vacuna de la pG de VNHI en peces (Oberg *et al.*, 1991), pero no en VSHV (Estepa *et al.*, 1994).

CONCLUSIONES

La complejidad estructural de la pG de rhabdovirus se debe no sólo a la conformación altamente dependiente de puentes disulfuro y glicosilación, sino a la organización en trímeros. Los trímeros de pG no son estructuras estáticas, sino altamente dinámicas. Tienen movilidad en el plano de la membrana, están en equilibrio trímero/monómero y, por último, sufren cambios conformacionales dramáticos con el pH durante el proceso de fusión. Con esta panorámica, se comprende que la expresión de pG en vectores procarióticos (no controlan la formación correcta de puentes disulfuro, ni la glicosilación) no pueda contribuir a la obtención de las cantidades suficientes de esta proteína que se necesitarían para producir vacunas recombinantes. Aunque quizá algún fragmento concreto de la pG (por ejemplo, el fragmento implicado en la fusión) pueda utilizarse según estos métodos, es más probable que la proteína haya de expresarse en vectores eucarióticos, si se quieren desarrollar vacunas recombinantes efectivas, tal y como ya se han conseguido en la rabia con vaccinia (Brochier *et al.*, 1995).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con los proyectos: CT94-1334 del programa AIR2 de la CEE, SC94-102 del programa sectorial INIA y AGF95-910, del programa nacional de la CICYT. G.L. es becario predoctoral del INIA.

SUMMARY

The glycoprotein G of rhabdoviruses. A model to study comparative virology and recombinant vaccines

Rhabdoviruses show an RNA-containing nucleocapsid either enclosed by or enclosing a membrane M protein, surrounded by a lipid bilayer through which dynamic protein trimers made up of non-covalently associated monomers of glycoprotein G (G) project outside. Monomeric rhabdoviral G has more than 500 aa, 2-6 potential glycosylation sites, 12-16 highly conserved cysteine residues, 2-3 stretches of a-d hydrophobic heptad-repeats, a removed amino terminal hydrophobic transmembrane sequence and a carboxy terminal short hydrophilic cytoplasmic domain. Association-dissociation between monomers-trimers and displacement of the trimers along the plane of the lipid membrane, are induced by changes in the external conditions (pH, temperature, detergents, etc.). Throughout conformational changes the G trimers are responsible for the virus attachment to cell receptors, for low-pH membrane fusion and for reacting with host neutralizing monoclonal antibodies (MAbs). Antigenic differences could exist between monomers and trimers, which may have implications for further vaccine developments. The conformational complexity of the protein G of rhabdovirus requires the use of enkaryotic expression vectors to develop possible new recombinant vaccines.

KEY WORDS: Rhabdoviruses
Glycoprotein
Recombinant vaccines

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALLENDE R., SEPULVEDA L., MENDES DA SILVA A., MARTINS M., SÖNDAHL M.S., ALONSO A., 1992. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antibodies. *Prevision Veterinary Medicine*, 14: 293-301.
- ANILIONIS A., WUNNER W.H., CURTIS P.J., 1981. Structure of the glycoprotein gene in rabies virus. *Nature*, 294: 275-278.
- BARGE A., GAUDIN Y., COULON P., RUIGROK R.W.H., 1993. Vesicular stomatitis virus M2 protein may be inside the ribonucleocapsid coil. *Journal Virology*, 67: 7246-7253.
- BASURCO B., 1990. Estudio, identificación y caracterización del virus de la septicemia hemorrágica vírica en España. Universidad Complutense de Madrid. PhD Tesis, 178.
- BASURCO B., 1994. Comunicación personal.
- BASURCO B., BENMANSOUR A., 1995. Distant strains of the fish rhabdovirus VHSV maintain a sixth functional cistron which codes for a nonstructural protein of unknown function. *Virology*, 212: 741-745.
- BASURCO B., VENDE P., MONNIER A.F., WINTON J., DeKINKELIN P., BENMANSOUR A., 1995. Genetic diversity and phylogenetic classification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Veterinary Research*, 26: 460-463.
- BEARZOTTI M., MONNIER A.F., VENDE P., GROSCLAUDE J., DeKINKELIN P., BENMANSOUR A., 1995. The glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV): antigenicity and role in virulence. *Veterinary Research*, 26:413-422.
- BENMANSOUR A., BRAHIMI M., TUFFEREAU C., COULON P., LAFAY F., FLAMAND A., 1992. Rapid sequence evolution of streer rabies glycoprotein is related to the highly heterogeneous nature of the viral population. *Virology*, 187: 33-45.
- BENMANSOUR A., PAUBERT G., BERNARD J., DeKINKELIN P., 1994. The polymerase associated protein (M1) and the matrix protein (M2) from a virulent and avirulent strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. *Virology*, 198: 602-612.
- BENMANSOUR H., LEBLOIS H., COULON P., TUFFEREAU C., GAUDIN Y., FLAMAND A., LAFAY F., 1991. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *Journal Virology*, 65: 4198-4203.
- BERNARD J., LeBERRE MB., DeKINKELIN P., 1983. Viral haemorrhagic septicemia of rainbow trout: relation between the G polypeptide and antibody production of fish after infection with the

- F25 attenuated variant. *Infection Immunity*, 39: 7-14.
- BISEL P.A., NICHOL S.T., 1990. Polymerase errors accumulating during natural evolution of the glycoprotein gene of vesicular stomatitis virus indiana serotype isolates. *Journal Virology*, 64:4873-4883.
- BIZEBARD T., GIGANT B., RIGOLET P., RASMUSSEN B., DIAT O., BOSECKE P., WHARTON S.A., SKEHEL J.J., KNOSSOW M., 1995. Structure of influenza virus haemagglutinin complexed with a neutralizing antibody. *Nature*, 376: 92-94.
- BOURHY H., KISSI B., TORDO N., 1993. Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology*, 194: 70-81.
- BROCHIER B., COSTY F., PASTORET P.P., 1995. Elimination of fox rabies from Belgium using a recombinant vaccinia-rabies vaccine: an update. *Veterinary Microbiology*, 46: 269-279.
- BROWNING M., REISS C.S., HUANG A.S., 1990. The soluble viral glycoprotein of vesicular stomatitis virus efficiently sensitizes target cells for lysis by CD4+T lymphocytes. *Journal Virology*, 64: 3810-3816.
- BROWNING M.J., HUNEYCUTT B.S., HUANG A.S., REISS C.S., 1991. Replication-defective viruses modulate immune responses. *Journal Immunology*, 147: 2685-2691.
- BRUN G., BAO X., PROVEC L., 1995. The relationship of Piry virus to other vesiculoviruses: a re-evaluation based on the glycoprotein gene sequence. *Intervirology*, 38: 274-282.
- 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.
- BUNSCHOTEN H., KLAPMUT R.L.J., CLAASSEN I., REYNEVELD S.D., OSTERHANS A.D.M.E., UYTDEHAAG F.G.C.M., 1989. Rabies virus-specific human T cells clones provide help for an in vitro antibody response against neutralizing antibody-inducing determinants of the viral glycoprotein. *Journal General Virology*, 70: 1513-1521.
- CARR C.M., KIM P.S., 1993. A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell*, 73: 823-832.
- CHAMBERS P., PRINGLE C.R., EASTON A.J., 1990. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *Journal General Virology*, 71:3075-3080.
- CHATIS P.A., MORRISON T.G., 1983. Characterization of the soluble glycoprotein released from vesicular stomatitis virus-infected cells. *Journal Virology*, 45: 80.
- CHENG S.S.L., HUANG A.S., 1986. Further characterization of the vesicular stomatitis virus temperature-sensitive 045 mutant: intracellular conversion of the glycoprotein to a soluble form. *Journal Virology*, 59: 210.
- CHILMONZCYK S., VOCCIA I., MONGE D., 1995. Pathogenesis of viral haemorrhagic septicemia virus: cellular aspects. *Veterinary Research*, 26: 505-511.
- CHONG L.D., ROSE J.K., 1993. Membrane association of functional vesicular stomatitis virus matrix protein in vivo. *Journal Virology*, 67: 407-414.
- COLL J., 1995. Mapeo de epítomos neutralizantes contra el rhabdovirus de la septicemia hemorrágica vírica (SHV) de salmonidos utilizando mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales. Aplicaciones en la prevención y diagnóstico de la enfermedad. *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* Vol. 10 (1), 45-52.
- COLL J.M., 1995a. The glycoprotein G of rhabdoviruses. *Archives Virology*, 140: 827-851.
- COLL J.M., 1995b. Heptad-repeat sequences in the glycoprotein of rhabdoviruses. *Virus Genes*, 10: 107-114.
- COLL J.M., 1995c. Low-pH increases the binding of haemorrhagic septicemia rhabdovirus to membrane phospholipids. *Journal Fish Diseases*, 18: 519-527.
- COLL J.M., 1995d. Synthetic peptides reveal a phospholipid binding domain in the glycoprotein of VHSV, a salmonid rhabdovirus. *Veterinary Research*, 26: 399-407.
- COLL J.M., DOMINGUEZ-JUNCAL J., 1995. Applications of monoclonal antibodies in Aquaculture. *Biotechnology Advances*, 13: 45-73.
- CONZELMANN K.K., COX J.H., SCHNEIDER L.G., THIEL H.J., 1990. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology*, 175: 485-489.
- DIAGO M.L., LOPEZ-FIERRO M.P., RAZQUIN B., ZAPATA A., VILLENA A., 1991. Cell cultures of stromal cells from the thymus and pronephros of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Phenotypical characterization and hematopoietic capacities. *Developmental Comparative*

- Immunology, 15:S1-S61.*
- DIETZSCHOLD B., GORE M., MARCHADIER D., NIU H.S., BUNSCHOTEN H.M., OTVOS L., WUNNER W.H., ERTL H.C.J., OSTERBAUS A.D.M.E., KOPROWSKI H., 1990. Structural and immunological characterization of a linear virus neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. *Journal Virology*, 64:3804-3809.
- DIETZSCHOLD B., RUPPRECHT C.E., TOLLIS M., LAFON M., MATTEI J., WIKTOR T.J., KOPROWSKY H., 1988. Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid of rabies and rabies related viruses: implications for epidemiology and control of rabies. *Reviews Infectious Diseases*, 10: 785-798.
- DIETZSCHOLD B., TOLLIS M., RUPPRECHT C.E., CELIS E., KOPROWSKI H., 1987a. Antigenic variation in rabies and rabies-related virus cross-protection independent of glycoprotein mediated virus-neutralizing antibody. *Journal Infectious Diseases*, 156: 815-822.
- DIETZSCHOLD B., WANG H., RUPPRECHT H.E., CELIS E., TOLLIS M., ERT H., HEBER-KATZ E., KOPROWSKI H., 1987b. Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein (L,N,NS,RNA). *Journal Immunology*, 9165-9170.
- DIETZSCHOLD B., WIKTOR T.J., MACFARLAN R., VARRICHIO A., 1982. Antigenic structure of rabies virus glycoprotein: Ordering and immunological characterization of the large CNBr cleavage fragments. *Journal Virology*, 44: 595-602.
- DIETZSCHOLD B., WIKTOR T.J., WUNNER W.H., VARRICHIO A., 1983. Chemical and immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein. *Virology*, 124: 330-337.
- DOMS R.W., KELLER D.S., HELENIUS A., BALCH W.E., 1987. Role for adenosine triphosphate in regulating the assembly and transport of vesicular stomatitis virus G protein trimers. *Journal Cell Virology*, 105: 1957-1969.
- DOMS R.W., LAMB R.A., ROSE J.K., HELENIUS A., 1993. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology*, 193: 545-562.
- DOMS R.W., RUUSALA A., NACHANER C., HELENIUS J., ROSE J.K., 1988. Differential effects of mutations in three domains on folding, quaternary structure, and intracellular transport of vesicular stomatitis virus G protein. *Journal Cell Virology*, 107:89-99.
- DUBOVI E.J., WAGNER R.R., 1990. Spatial relationships of the proteins of vesicular stomatitis virus: induction of reversible oligomers by cleavable protein cross-linkers and oxidation. *Journal virology*, 22: 500-509.
- DURRER P., GAUDIN Y., RUIGROK R.W.H., GRAF R., BRUNNER J., 1995. Photolabeling identifies a putative fusion domain in the envelope glycoprotein of rabies and vesicular stomatitis viruses. *Journal Biological Chemistry*, 270: 17575-17581.
- ENGELKING H., LEONG J.C., 1989. The glycoprotein of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus eluciting antibody and protective responses. *Virus Research*, 13: 213-230.
- ERTL H.C.J., DIETZSCHOLD B., GORE M., OTVOS L., LARSON J.K., WUNNER W.H., KOPROWSKI H., 1989. Induction of rabies virus-specific T-Helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-Helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein. *Journal Virology*, 63: 2885-2892.
- ESTEPA A., BASURCO B., SANZ F., COLL J.M., 1991. Stimulation of adherent cells by the addition of purified proteins of viral haemorrhagic septicaemia virus to trout kidney cell cultures. *Viral. Immunol.*, 4: 43-52.
- ESTEPA A., COLL J.M., 1991a. In vitro infection of trout kidney cells with infectious pancreatic necrosis and viral haemorrhagic septicaemia viruses. *Bulletin European Associated Fish Diseases*, 11: 101-104.
- ESTEPA A., COLL J.M., 1991b. Infection of mitogen stimulated colonies from trout kidney cell cultures with salmonid viruses. *Journal Fish Diseases*, 14: 555-562.
- ESTEPA A., COLL J.M., 1996a. Pepsan mapping and fusion related properties of the major phosphatidylserine-binding domain of the glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus, a salmonid rhabdovirus. *Virology*, 216: 60-70.
- ESTEPA A., COLL J.M., 1996b. Phosphatidylserine binding to solid-phase rhabdoviral peptides. A new method to study phospholipid/viral protein interactions. *journal Virological Methods*. In press.
- ESTEPA A., EZQUERRA A., COLL J.M., 1996. Antigen dependent cells from survivors of fish rhabdoviral infections express beta chain T-cell receptor genes. *Journal Immunology*

- ESTÉPA A., THIRY M., COLL J.M., 1993. Respuestas in vitro de los linfocitos de trucha a proteínas purificadas y recombinantes del virus de la septicemia hemorrágica viral. *Immunología*. (En preparación).
- ESTÉPA A., THIRY M., COLL J.M., 1994. Recombinant protein fragments from haemorrhagic septicemia rhabdovirus stimulate trout leucocyte anamnestic in vitro responses. *Journal General Virology*, 75: 1339-1338.
- FLAMAND A., RAUX H., GAUDIN Y., RUIGROK R.W.H., 1993. Mechanisms of rabies virus neutralization. *Virology*, 194: 302-313.
- FLAMAND A., WIKTOR T.J., KOPROWSKY H., 1980. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. I. The nucleocapsid protein. *Journal General Virology*, 48:97-104.
- FLORKIEWICZ R.Z., SMITH A., BERGMANN J.E., ROSE J.K., 1983. Isolation of stable mouse cell lines that express cell surface and secreted forms of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Journal Cell Biology*, 97: 1381-1388.
- FORGER J.M., BRONSON R.T., HUANG A.S., REISS C.S., 1991. Murine infection by vesicular stomatitis virus: Initial characterization of the H-2d system. *Journal Virology*, 65: 4950-4958.
- FREDERIKSEN B.L., WHITT M.A., 1995. Vesicular stomatitis virus glycoprotein mutations that affect membrane fusion activity and abolish virus infectivity. *Journal Virology*, 69: 1435-1443.
- GALLIONE C.J., ROSE J.C., 1985. A single amino acid substitution in a hydrophobic domain causes temperature-sensitive cell-surface transport of a mutant viral glycoprotein. *Journal Virology*, 54: 374-382.
- GAUDIN Y., RUIGROK R.W.H., BRUNNER J., 1995. Low-pH induced conformational changes in viral fusion proteins: implications for the fusion mechanism. *Journal General Virology*, 76: 1541-1556.
- GAUDIN Y., RUIGROK R.W.H., KNOSSOW M., FLAMAND A., 1993. Low-pH conformational changes of rabies virus glycoprotein and their role in membrane fusion. *Journal Virology*, 67: 1365-1372.
- GAUDIN Y., RUIGROK R.W.H., TUFFEREAU C., KNOSSOW M., FLAMAND A., 1992. Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology*, 187: 627-732.
- GAUDIN Y., TUFFEREAU C., BENMANSOUR A., FLAMAND A., 1991. Fatty acylation of rabies virus proteins. *Virology*, 184: 441-444.
- GAUDIN Y., TUFFEREAU C., DURRER P., FLAMAND A., RUIGROK R.W.H., 1995. Biological function of the low-pH, fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein (G): G is transported in a fusion-inactive state-like conformation. *Journal Virology*, 69: 5528-5534.
- GOLDBERG B.K., MODRELL B., HILLMAN B.I., HEATON A.L., CHOI T., JACKSON O.A., 1991. Structure of the Glycoprotein Gene of Sonchus yellow net virus, a plant Rhabdovirus. *Virology*, 185: 32-38.
- HANHAM C.A., ZHAO F., TIGNOR G.H., 1993. Evidence from the anti-idiotypic network that the acetylcholine receptor is a rabies virus receptor. *Journal Virology*, 67: 530-542.
- HELMICK C.M., BAILEY J.F., LAPATRA S., RISTOW S., 1995. The esophagus/cardiac stomach region: site of attachment and internalization of infectious hematopoietic necrosis virus in challenged juvenile rainbow trout *Onchorynchus mykiss* and coho salmon *O.kisutch*. *Diseases Aquatic Organisms*, 23: 189-199.
- HORODYSKI F.M., NICHOL S.T., SPINDLER K.R., HOLLAND J.J., 1983. Properties of DI particle resistant mutants of vesicular stomatitis virus isolated from persistent infections and from undiluted passages. *Cell*, 33: 801-810.
- HSU Y.L., ENGELKING H.M., LEONG J.C., 1985. Analysis of the quantity and synthesis of the virion proteins of infectious hematopoietic necrosis virus. *Journal Fish Pathology*, 30: 331-338.
- HUANG C., 1993. Ph D. Thesis. University of Washington, Seattle.
- HUANG C., CHIEN M.S., LANDOLT M., WINTON J., 1994. Characterization of the infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein using neutralizing monoclonal antibodies. *Diseases Aquatic Organisms*, 18: 29-35.
- HUGHSON F.M., 1995. Structural characterization of viral fusion proteins. *Current Biology*, 5: 265-274.
- JORGENSEN P.E.V., EINER-JENSEN K., HIGMAN K.H., WINTON J.R., 1995. Sequence comparison of the central region of the glycoprotein gene of neutralizable, non-neutralizable, and

- serially passed isolates of viral haemorrhagic septicemia virus. *Diseases Aquatic Organisms*, 23: 77-82.
- KAPTUR P.E., RHODES R.B., LYLES D.S., 1991. Sequences of the vesicular stomatitis virus matrix protein involved in binding to nucleocapsids. *Journal Virology*, 65: 1057-1065.
- KEIL W., WAGNER R.R., 1989. Epitope mapping by deletion mutants and chimeras of two vesicular stomatitis virus glycoprotein genes expressed by a vaccinia virus vector. *Virology*, 170: 392-407.
- KELLEY J.M., EMERSOM S.U., WAGNER R.R., 1972. The glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus in the antigen that gives rise to and react with neutralizing antibodies. *Journal Virology*, 10: 1231-1236.
- KIM C.H., WINTON J.R., LEONG J.C., 1994. Neutralization-resistant variants of infectious hematopoietic virus have altered virulence and tissue tropism. *Journal Virology*, 68: 8447-8453.
- KOENER J.F., PASSAVANT C.W., KURATH G., LEONG J., 1987. Nucleotide sequence of a cDNA clone carrying the glycoprotein gene of Infectious Haematopoietic Necrosis virus, a fish rhabdovirus. *Journal Virology*, 61: 1342-1349.
- KONIECZKO E.M., WHITAKER-DOWLING P.A., WIDNELL C.C., 1994. Membrane fusion as a determinant of the infectibility of cells by vesicular stomatitis virus. *Virology*, 199: 200-211.
- KONTSEKOVA E., MACIKOVA I., NOVAK M., DEDEK L., VRZAL V., KONTSEK P., 1992. Conformation-dependent accessibility of the linear epitopes located on the rabies virus glycoprotein. *Viral Immunology*, 5: 213-220.
- KURATH G., AHERN K.G., PEARSON G.D., LEONG J.C., 1985. Molecular cloning of the six mRNA species of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus, and gene order determination by R-loop mapping. *Journal Virology*, 53: 469-476.
- KURATH G., HIGMAN K.H., BJORKLUND H.V., 1995. The NV genes of fish rhabdoviruses: development of RNase protection assays for rapid assesment of genetic variation. *Veterinary Research*, 26: 477-485.
- LAFAY F., BENMANSOUR A., CHEBLI K., FLAMAND A., 1996. Immunodominant epitopes defined by a yeast-expressed library of random fragments of the rabies virus glycoprotein map outside major antigenic sites. *Journal General Virology*, 77: 339-346.
- LAFON M., WIKTOR T.J., MacFARLAN R.I., 1983. Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies. *Journal General Virology*, 64: 843-851.
- LECOCQ-XHONNEUX F., THIRY M., DHEUR I., ROSSIUS M., VanDerHEIJDEN N., MARTIAL J., DeKINKELIN P., 1994. A recombinant viral haemorrhagic septicaemia virus glycoprotein expressed in insect cells induces protective immunity in rainbow trout. *Journal General Virology*, 75: 1579-1587.
- LeFRANCOIS L., 1984. Protection against lethal viral infection by neutralizing and mononeutralizing monoclonal antibodies: a distinct mechanisms action in vivo. *Journal Virology*, 51: 208-214.
- LeFRANCOIS L., LYLES D.S., 1982. The interaction of antibody with the major surface glycoprotein of vesicular stomatitis virus. II. Monoclonal antibody to nonneutralizing and crossreactive epitopes of Indiana and New Hersey serotypes. *Virology*, 121: 168-174.
- LEONG J.C., BOOTLAND L., ANDERSON E., CHIOUS P.W., DROLET B., KIM C., LORZ H., MOURICH D., ORMONDE P., PEREZ L., TROBRIDGE G., 1995. Viral vaccines for aquaculture. *Journal Marine Biotechnology*, 3: 16-23.
- LI Y., DRONE C., SAT E., GHOSH H.P., 1993. Mutational analysis of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G for membrane fusion domains. *Journal Virology*, 67: 4040-4077.
- LODISH H.F., ZILVERSTEIN A., PORTER M., 1981. Synthesis and assembly of transmembrane viral and cellular glycoproteins. *Methods Cell Biology*, 23: 5.
- LORENZEN N., OLESEN N.J., 1995. Multiplication of VHS virus in insect cells. *Veterinary Research*, 26: 428-432.
- LORENZEN N., OLESEN N.J., VESTERGAARD-JORGENSEN P.E., 1990. Neutralization of Egtved virus pathogenicity to cell cultures and fish by monoclonal antibodies to the viral G protein. *Journal General Virology*, 71: 561-567.
- LORENZEN N., OLESEN N.J., VESTERGAARD-JORGENSEN P.E., ETZERODT M., HOLTET T.L., THORGERSEN M.C., 1993. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the glycoprotein gene of VHS virus and immunization of rainbow trout with the recombinant protein. *Journal General Virology*, 74: 623-630.

- LORENZO G., ESTEPA A., CHILMONCZYK S., COLL J.M., 1995. Mapping of the G and N regions of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) inducing lymphoproliferation by pepsin. *Veterinary Research*, 26: 521-525.
- LORENZO G., ESTEPA A., COLL J.M., 1996. A fast neutralization assay for fish rhabdoviruses. *Journal Virological Methods*. Submitted.
- LORENZO G.A., ESTEPA A., CHILMONCZYK S., COLL J.M., 1995. Different peptides from haemorrhagic septicaemia rhabdoviral proteins stimulate leucocyte proliferation with individual fish variation. *Virology*, 212, 348-355.
- LYLES D.S., MCKENZIE M., PARCE J.W., 1992. Subunit interactions of vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein stabilized by binding to viral matrix protein. *Journal Virology*, 66: 349-358.
- LYLES D.S., VARELA V.A., PARCE J.V., 1990. Dynamic nature of the quaternary structure of the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein. *Biochemistry*, 29: 2442-2449.
- MacFARLAN R.I., DIETZSCHOLD B., WIKTOR T.J., KIEL M., HOUGHTEN R., LERNER R.A., SUTCLIFFE J.G., KOPROWSKI H., 1984. T cell responses to cleaved rabies virus glycoprotein and to synthetic peptides. *Journal Immunology*, 133: 2748-2752.
- MACHAMER C.E., ROSE J.K., 1988. Vesicular stomatitis virus G proteins with altered glycosylation sites display temperature-sensitive intracellular transport and are subject to aberrant intermolecular disulfide bonding. *Journal Biological Chemistry*, 263: 5955-5960.
- MAGEE A.I., KOYAMA A.H., MALFER C., WEN D., SCHLESNIGER M.J., 1984. Release of fatty acids from virus glycoproteins by hydroxylamine. *Biochemical Biophysical Acta*, 798: 156-166.
- MORIMOTO K., OHKUBO A., KAWAI A., 1989. Structure and transcription of the glycoprotein gene of attenuated HEP-Flury strain of rabies virus. *Virology*, 173: 465-477.
- MORZUNOV S.P., WINTON J.R., NICHOL S.T., 1995. The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Research*, 38: 175-192.
- MOURICH D.V., LEONG J.C., 1991. Mapping of the immunogenic regions of the IHNV glycoprotein in rainbow trout and mice. In: *Proceedings of the second International symposium of viruses of lower vertebrates*. Oregon Agriculture Experiment Station. Corvallis, 93-100.
- NAGATA S., OKAMOTO Y., INOUE T., UENO Y., KURATA, CHIBA J., 1992. Identification of epitopes associated with different biological activities on the glycoprotein of vesicular stomatitis virus by use of monoclonal antibodies. *Archives Virology*, 127: 153-168.
- NI Y., TOMINAGA Y., HONDA Y., MORIMOTO K., SAKAMOTO S., KAWAI A., 1995. Mapping and characterization of a sequential epitope on the rabies virus glycoprotein which is recognized by a neutralizing monoclonal antibody, RG719. *Microbiological Immunology*, 39:693-702.
- NICHOL S.T., ROWE J.E., FITCH W.M., 1989. Glycoprotein evolution of vesicular stomatitis virus New Jersey. *Virology*, 168: 281-291.
- NICHOL S.T., ROWE J.E., WINTON J.R., 1995. Molecular epizootiology and evolution of the glycoprotein and non-virion protein genes of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. *Virus Research*, 38: 159-173.
- OVERG L.A., WIRKKULA J., MOURICH D., LEONG J.C., 1991. Bacterially expressed nucleoprotein of infectious haematopoietic necrosis virus augments protective immunity induced by the glycoprotein vaccine in fish. *Journal Virology*, 65: 4486-4489.
- OSHIMA K.H., ARAKAWA C.K., HIGMAN K.H., LANDOLT M.L., NICHOL S.T., WINTON J.R., 1995. The genetic diversity and epizootiology of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Research*, 35: 123-141.
- POLAKOVA K., RUSS G., 1992. Use of brefeldin A to localize block in intracellular transport of vesicular stomatitis virus G protein interferon-treated cells. *Archives Virology*, 124: 171-179.
- PORTNER A., WEBSTER R.G., BEAN W., 1980. Similar frequency of antigenic variants in Sendai Vesicular Stomatitis Virus, and Influenza A viruses. *Virology*, 104: 235-238.
- PREHAUD C., TAKEHARA K., FLAMAND A., BISHOP D.H., 1989. Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. *Virology*, 173: 390-399.
- RAUX H., COULON P., LAFAY F., FLAMAND A., 1995. Monoclonal antibodies which recognize the acidic configuration of the rabies glycoprotein at the surface of the virion can be neutralizing. *Virology*, 210: 400-408.
- READING C.L., PENHOET E.E., BALLOU C.E., 1978. Carbohydrate structure of vesicular stoma-

- titis virus glycoprotein. *Journal Biological Chemistry*, 253: 5600-5612.
- RIGAUT K.D., BIRK D.E., LENARD J., 1991. Intracellular distribution of input vesicular stomatitis virus proteins after uncoating. *Journal Virology*, 65: 2622-2628.
- ROSE J.K., ADAMS G.A., GALLIONE C.J., 1984. The presence of cysteine in the cytoplasmic domain of the vesicular stomatitis virus glycoprotein is required for palmitate addition. *Proceedings National Academy Sciences*, 81: 2050-2054.
- ROSE J.K., GALLIONE C.J., 1981. Stomatitis virus G and M proteins determined from cDNA clones containing the complete coding regions. *Journal Virology*, 39: 519-528.
- SCHLEGEL R., WADE M., 1983. Neutralized vesicular stomatitis virus binds to host cells by a different receptor. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 114: 774-779.
- SCHLEGEL R., WADE M., 1984. A synthetic peptide corresponding to the NH2 terminus of vesicular stomatitis virus glycoprotein is a pH-dependent hemolysin. *Journal Biological Chemistry*, 259: 4691-4694.
- SCHLEGEL R., WADE M., 1985. Biologically active peptides of the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Journal Virology*, 53: 319-323.
- SCHLEGEL R., WILLIGAN M.C., H. PASTAN I.H., 1982. Saturable binding sites for vesicular stomatitis virus on the surface of Vero cells. *Journal Virology*, 43: 871-875.
- SCHLESINGER S., MALFER C., SCHLESINGER M.J., 1984. The formation of vesicular stomatitis virus (San Juan strain) becomes temperature-sensitive when glucose residues are retained on the oligosaccharides of the glycoprotein. *Journal Biological Chemistry*, 259: 7597-7601.
- SCHTZE H., ENZMANN P.J., KUCHLING R., MUNDT E., NIEMANN N., METTENLEITER T.C., 1995. Complete genomic sequence of the fish rhabdovirus infectious hematopoietic necrosis virus. *Journal General Virology*, 76: 2519-2527.
- STANLEY P., VIVONA G., ATKINSON P.H., 1984. H NMR spectroscopy of carbohydrates from the G glycoprotein of vesicular stomatitis virus grown in parental and lec4 chinese hamster ovary cell. *Archives Biochemistry Biophysical*, 230: 363.
- SUPERTI J., SEGANTI L., TSIANG H., ORSI N., 1984. Role of phospholipids in rhabdovirus attachment to Cer cells: Brief report. *Archives Virology*, 81: 321-328.
- TENINGES D., BRAS F., DEZELEE S., 1993. Genome organization of the sigma rhabdovirus: Six genes and Gene overlap. *Virology*, 193: 1018-1023.
- TENINGES D., BRAS-HERRENG F., 1987. Rhabdovirus sigma, the hereditary CO₂ sensitivity agent of drosophila: nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the glycoprotein. *Journal General Virology*, 68: 2625-2638.
- THIRY M., LECOQ-HXONNEUX F., DHEUR I., RENARD A., KINKELIN D., 1991. Sequence of a cDNA carrying the glycoprotein gene and part of the matrix protein M2 gene of viral haemorrhagic septicaemia virus, a fish rhabdovirus. *Biochimica Biophysica Acta*, 1090: 345-347.
- TORDO N., 1991. Contribution of molecular biology to biology to vaccine development and molecular epidemiology of rabies disease. *Memories Institute Butantan*, 53: 31-51.
- TORDO N., BOURHY H., SATHER S., OLLO R., 1993. Structure and expression in baculovirus of the Mokola virus glycoprotein: an efficient recombinant vaccine. *Virology*, 194: 59-69.
- TORDO N., POCH O., ERMINE A., KEITH G., ROUGEON F., 1986. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proceedings National Academy Sciences USA*, 83: 3914-3918.
- VANDEERHEIJDEN M.H.T., TANK M.W.T., BOOMS G.H.R., BAKUWELL P., BOON J.H., 1993. In vivo lymphocyte stimulation test in european eel (*anguilla anguilla*, L). *Bulletin European Association Fish Pathologists*, 13: 213-215.
- VANDEPOL S.B., LEFRANCOIS L., HOLLAND J.J., 1986. Sequences of the major antibody binding epitopes of the Indiana serotype of VSV. *Virology*, 148: 312-225.
- VANDERHEIJDEN R.W.J., LANGEDIJK J.P.M., GROEN J., UYTDEHAAG F.G.C.M., MELOEN R.H., OSTERHAUS A.D.M.E., 1993. Structural and functional studies on a unique linear neutralizing antigenic site (G5) of the rabies virus glycoprotein. *Journal General Virology*, 74: 1539-1545.
- VOLK W.A., SNYDER R.M., BENJAMIN D.C., WAGNER R., 1982. Monoclonal antibodies to the glycoprotein of Vesicular Stomatitis Virus: Comparative neutralizing activity. *Journal Virology*, 42: 220-227.
- WAGNER R.R., PREVEC L., BRAWN F., SUMMERS D.F., SOKOL F., MCLEOD, 1972.

- Classification of rhabdovirus proteins: a proposal. *Journal Virology*, 10: 1228-1230.
- WALKER P.J., BYRNE K.A., RIDING G.A., COWLEY J.A., WANG Y., McWILLIAM S., 1992. The genome of bovine ephemeral fever rhabdovirus contains two related glycoprotein genes. *Virology*, 191: 49-61.
- WHITT M.A., CHONG L., ROSE J.K., 1989. Glycoprotein cytoplasmic domain sequences required for rescue of a vesicular stomatitis virus glycoprotein mutant. *Journal Virology*, 63: 3569-3578.
- WHO, 1984. Expert committee on rabies. WHO Technical report ser, 709: 9.
- WIKTOR T.J., CLARK H.F., 1973. Comparison of rabies virus strain by means of the plaque reduction test. *Annals Microbiology (Institute Pasteur)*, 124: 283-288.
- WIKTOR T.J., GYORGY E., SCHLUMBERGER H.D., SOKOL F., KOPROWSKI H., 1973. Antigenic properties of rabies virus components. *Journal Immunology*, 110: 269-276.
- WIKTOR T.J., KOPROWSKY H., 1980. Antigenic variants of rabies virus. *Journal Experimental Medicine*, 12: 99-112.
- WOODGETT C., ROSE J.K., 1986. Amino-terminal mutation of the vesicular stomatitis virus glycoprotein does not affect its fusion activity. *Journal Virology*, 59: 486-489.
- WUNNER W.H., DIETZSCHOLD B., SMITH C.L., LAFON M., 1985. Antigenic variants of CVS rabies virus with altered glycosylation sites. *Virology*, 140: 1-2.
- WUNNER W.H., REAGAN K.J., KOPROWSKI H., 1984. Characterization of saturable binding sites for rabies virus. *Journal Virology*, 50: 691-697.
- XIANG Z.Q., KNOWLES B.B., McCARRICK J.W., ERTL H.C.J., 1995. Immune effector mechanisms required for protection to rabies virus. *Virology*, 214: 398-404.
- XU L., MOURICH D.V., ENGELKING H.M., RISTOW S., ARNZEN J., LEONG J.C., 1991. Epitope mapping and characterization of the infectious hematopoietic necrosis virus glycoprotein, using fusion proteins synthesized in *Escherichia coli*. *Journal Virology*, 65: 1611-1615.
- YAMADA S., OHNISHI S., 1986. Vesicular stomatitis virus binds and fuses with phospholipid domain in target cell membranes. *Biochemistry*, 25: 3703-3708.
- ZAGOURAS P., RUUSALA A., ROSE J.K., 1991. Dissociation and reassociation of oligomeric viral glycoprotein subunits in the endoplasmic reticulum. *Journal Virology*, 65: 1976-1984.
- ZAKOWSKY J.J., PETRI W.A., WAGNER R.R., 1981. Role of matrix protein in assembling the membrane of vesicular stomatitis virus: Reconstitution of matrix protein with negatively charged phospholipid vesicles. *Biochemistry*, 20: 3902-3906.