# TESIS DOCTORAL


## UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

### FACULTAD DE BIOLOGIA


# CARACTERÍSTICAS Y LOCALIZACIÓN DE LA REGION DE FUSIÓN DEL RABDOVIRUS DE LA SEPTICEMIA HEMORRÁGICA DE LA TRUCHA

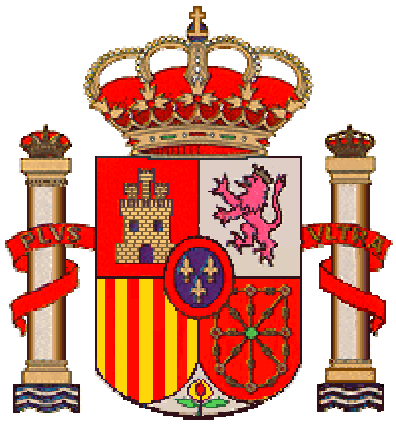

**Ana Rocha Roso**


**Madrid 2003**


**Directores:**

**Julio Coll Morales**
Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Complutense Madrid)
Ph.D. in Biology (Massachusetts Institute Technology)
**Departamento de Biotecnología**
**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA)**

**Amparo Estepa Perez**
Doctor en Ciencias Biológicas (Universidad Complutense Madrid)
Profesor titular de Bioquímica
**Centro de Biología Molecular y Celular**
**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ (UMH)**




**Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Biotecnología (INIA) bajo la dirección del Dr. Julio Coll Morales y de la Dra. Amparo Estepa Perez, financiado por los proyectos SC0046, ACU01-003, RTA03-217 y el Proyecto Europeo CT984398.**

JULIO COLL MORALES, Dr. EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID) Y Ph.D. BIOLOGY (MASSACHUSETTS INSTITUTE TECHNOLOGY) DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGRARIA Y ALIMENTARIA (INIA) DEL MINISTERIO DE INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y TECNOLOGÍA

**CERTIFICA:**

Que el trabajo titulado "CARACTERÍSTICAS Y LOCALIZACIÓN DE LA REGIÓN DE FUSIÓN DEL RABDOVIRUS DE LA SEPTICEMIA HEMORRÁGICA DE LA TRUCHA ", del que es autora la Licenciada Dª Ana Rosa Roso, ha sido realizado bajo mi dirección y que cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor.

Y para que conste a efectos oportunos, firmo el presente informe, en Madrid .

Fdo. Julio Coll Morales

AMPARO ESTEPA PEREZ, Dr. EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID) Y PROFESOR TITULAR DE BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ DE ELCHE

**CERTIFICA:**

Que el trabajo titulado "CARACTERÍSTICAS Y LOCALIZACIÓN DE LA REGIÓN DE FUSIÓN DEL RABDOVIRUS DE LA SEPTICEMIA HEMORRÁGICA DE LA TRUCHA ", del que es autora la Licenciada Dª Ana Rosa Roso, ha sido realizado bajo mi dirección y que cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor.

Y para que conste a efectos oportunos, firmo el presente informe, en Elche .

Fdo. Amparo Estepa Perez

EL Dr. FRANCISCO GAVILANES PROFESOR ADJUNTO DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**CERTIFICA:**

Que como Profesor Ponente, designado por la Facultad de Biológicas, para la revisión del trabajo titulado "CARACTERÍSTICAS Y LOCALIZACIÓN DE LA REGION DE FUSIÓN DEL RABDOVIRUS DE LA SEPTICEMIA HEMORRAGICA DE LA TRUCHA ", del que es autora la Licenciada Dª Ana Rocha Roso, considera que puede ser defendido para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste a efectos oportunos, firmo el presente informe, en Madrid.

Fdo. Francisco Gavilanes

A .....

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

**LISTA DE ABREVIATURAS**..... 10

**1. INTRODUCCIÓN**..... 12

**1.1. LAS RABDOVIROSIS EN LA ACUICULTURA**..... 13
**1.2. LOS RABDOVIRUS DE PECES**..... 17
1.2.1. Los rabdovirus más importantes: VSHV e VNHI..... 17
1.2.2. Estructura molecular..... 17
**1.3. ESTRUCTURA DE LA GLICOPROTEÍNA G** ..... 19
1.3.1. Función general y estructura..... 19
1.3.2. Heptadas hidrofóbicas repetidas..... 20
1.3.3. Puentes disulfuro..... 22
**1.4. INTERACCIÓN DE RABDOVIRUS Y CÉLULAS** ..... 24
1.4.1. Importancia del estudio de las fases tempranas de la infección..... 24
1.4.2. Receptores celulares..... 24
1.4.3. Mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales (MAR)..... 26
**1.5. FUSION ENTRE LAS MEMBRANAS RABDOVIRALES Y CELULARES**..... 26
1.5.1. Influencia del pH ..... 26
1.5.2. Cambios conformacionales inducidos en la pG por la bajada de pH..... 26
1.5.3. Interacciones con fosfolípidos..... 26
1.5.4. Mutantes MAR a bajo pH..... 27
1.5.5. Mutantes deficientes en fusión..... 28
1.5.6. Peptidos inhibidores de la fusión..... 28
1.5.7. Ensayos de fusión en rabdovirus..... 29
**1.6. ANALISIS COMPARATIVO DE MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN**..... 31
1.6.1. La transfección de células eucariontes..... 31
1.6.2. Ruta del ADN foráneo dentro de la célula..... 32
1.6.3. Utilización de liposomas catiónicos para transfección de ADN..... 33
1.6.4. Modificaciones en el ADN para aumentar la eficiencia de transfección ..... 33
1.6.5. Ultrasonidos para translocar la membrana plasmática..... 34
1.6.6. Electroporación para translocar la membrana plasmática..... 35
1.6.7. Bombardeo para translocar la membrana plasmática..... 36
1.6.8. Control de pH en la ruta endosoma/lisosoma..... 36
1.6.9. Adición de calcio..... 37
1.6.10. Influencia de la mitosis: ausencia de membrana nuclear..... 38
1.6.11. Señales de localización nuclear (NLS) en peptidos y en ADN..... 39
1.6.12. Peptidos quiméricos..... 40
1.6.13. Resumen de métodos para aumentar la eficiencia de la transfección..... 42

**2. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA**..... 45

**3. MATERIAL Y MÉTODOS**..... 47

**3.1. CULTIVOS CELULARES** ..... 48
3.1.1. Línea celular EPC..... 48
3.1.2. Transfección de células EPC..... 48
3.1.3. Detección de la expresión de GFP..... 49
3.1.4. Detección de la expresión de ßgalactosidasa (ßgal)..... 50
3.1.5. Tinción histológica de ßgal..... 50
3.1.6. Ensayos de luciferasa..... 50
3.1.7. Ensayos de fusión basados en fluorescencia..... 50
3.1.8. Ensayos de fusión basados en la activación de la transcripción por T7..... 51
3.1.9. Ensayos de formación de sincitios..... 51
**3.2 INMUNOENSAYOS**..... 52
3.2.1. Enzimoinmunoensayos (ELISA)..... 52
3.2.2. Transferencia de geles SDS-PAGE a nitrocelulosa e inmunodetección..... 54
3.2.3. Microensayos de neutralización de VSHV..... 54
3.2.4. Ensayos por citometría de flujo (FACS)..... 55
3.2.5. Obtención de anticuerpos policlonales (AcP) en ascitis de ratón..... 56
3.2.6. Obtención de AcP en trucha..... 57
**3.3. BIOLOGÍA MOLECULAR**..... 58
3.3.1. Virus de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV)..... 58
3.3.2. Plásmidos utilizados..... 59
3.3.3. Mutagenesis dirigida en la construcción pGEMTeasy-G..... 62
3.3.4. Subclonajes del plásmido pGEMTeasy-G al pMCV1.4..... 62
3.3.5. Clonaje del frg#11..... 64
3.3.6. Expresión del frg#11 recombinante..... 64
3.3.7. Caracterización por PCR y secuenciación..... 65

3.3.8. Purificación de plásmidos....66
3.3.9. Análisis de secuencias de la pG de rabdovirus.... 67
3.3.10. Síntesis de peptidos y pepscan.... 67
3.3.11. Ensayo de ligamiento de fosfolípidos en fase sólida.... 68

**4. RESULTADOS**.... 69

**4.1. ESTUDIOS COMPARATIVOS DE SECUENCIAS**.... 72
4.1.1. Comparación de las secuencias implicadas en fusión entre rabdovirus.... 72
4.1.2. Perfiles de hidrofilicidad/hidrofobicidad.... 74
4.1.3. Comparación entre cepas de VSHV.... 75
4.1.4. Selección de segmentos en la región 56-144 de la pG para su estudio.... 76
4.1.5. Selección de mutantes para su estudio....77
**4.2. PROPIEDADES DE LA REGIÓN 56-144** .... 85
4.2.1. Ligamiento de fosfolípidos marcados al pepscan de la pG....85
4.2.2. Inducción de sincitios por frg#11.... 85
4.2.3. Conformaciones del frg#11 dependientes de pH.... 86
4.2.4. Inhibición de la fusión con anti-p2 y segmentos adyacentes.... 87
4.2.5. Respuestas inmunológicas de las truchas al dominio del frg#11 .... 87
**4.3 PUESTA A PUNTO DEL ENSAYO DE FUSIÓN EN CÉLULAS EPC**....93
4.3.1. Agentes de transfección y concentración óptima de plásmido.... 93
4.3.2. Transfección a varias concentraciones celulares y tiempos....94
4.3.3. Influencia de la mitosis en la transfección....95
4.3.4. Influencia de la adición de agentes lisosomotrópicos....95
4.3.5. Uso de promotores de CMV de varias longitudes.... 95
4.3.6. Transfección con diferentes promotores y tratamientos celulares.... 96
4.3.7. Expresión de pG en las membranas de las células transfectadas.... 104
4.3.8. Puesta apunto de posibles ensayos de fusión....104
4.3.9. Formación de sincitios....106
4.3.10. Inhibición de los sincitios con Acs anti-VSHV .... 107
**4.4. ANALISIS DE MUTANTES** .... 114
4.4.1. Peptidos mutantes en la secuencia del p2.... 114
4.4.2. Selección de los mutantes de la pG de VSHV....117
4.4.3. Expresión en la membrana de mutantes pG....117
4.4.4. Dependencia de pH en la fusión de mutantes pG.... 118

**5. DISCUSIÓN**.... 124
**5.1. PUESTA A PUNTO DE UN ENSAYO DE FUSIÓN**.... 124
5.1.1. Selección de células, agente transfectante y variables de transfección....124
5.1.2. Mejora de las eficiencias de transfección.... 123
5.1.3. Mejora del promotor en los plásmidos utilizados.... 123
5.1.4. Métodos ensayados....128
5.1.5. Optimización de la formación de sincitios.... 129
5.1.6. Aplicación a la detección de Ac anti-VSHV en ausencia de VSHV.... 130
**5.3 SELECCIÓN DE LOS SEGMENTOS Y MUTANTES**.... 131
**5.4 PROPIEDADES DE LOS SEGMENTOS**.... 133
5.4.2. Evidencias anteriores de las relaciones de los segmentos con la fusión.... 133
5.4.1. Participación del frg#11/p2 en la fusión del VSHV.... 134
5.4.2. Respuesta inmunológica de la trucha al frg#11.... 137
**5.5 ANÁLISIS DE LOS MUTANTES**.... 138
**5.6 MODELO PROPUESTO**.... 140

**6. CONCLUSIONES**.... 146

**7. BIBLIOGRAFÍA**.... 138

**8. TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS**.... 159

**LISTA DE ABREVIATURAS**

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

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

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. LAS RABDOVIROSIS EN LA ACUICULTURA

Todos los cultivos intensivos de peces, como por ejemplo, la producción de trucha en Europa y EE.UU., de salmón del Pacífico en EE.UU., de salmón del Atlántico en Noruega, de la carpa en Europa central, de anguilas en Japón, etc., tienen como principal problema, las patologías infecciosas. Entre estas patologías cabe destacar las de origen vírico. De todos los virus de peces actualmente conocidos, los rabdovirus [Leong, 1995 #938] junto con los birnavirus [McAllister, 1991 #747] constituyen los grupos más numerosos Los rabdovirus tienen mayor incidencia económica que los birnavirus porque causan elevada mortalidad en adultos. Se han descrito más de 20 tipos de rabdovirus de peces [Frerichs, 1989 #2381] (Tabla 1).

Para estas enfermedades víricas actualmente no existen vacunas [DeKinkelin, 1995 #882; Leong, 1995 #938; Fernandez-Alonso, 2001 #2039; LaPatra, 2001 #2387; Lorenzen, 2002 #2386; Lorenzen, 2000 #2009; Boudinot, 2001 #2400; Lorenzen, 2002 #2390], ni métodos terapeúticos eficaces y además no es posible la detección de portadores asintomáticos [Leong, 1993 #696]. A pesar de los esfuerzos por desarrollar vacunas ADN [Fernandez-Alonso, 2001 #2039; LaPatra, 2001 #2387; Lorenzen, 2002 #2386; Lorenzen, 2000 #2009; Boudinot, 2001 #2400; Lorenzen, 2002 #2390] o métodos terapeúticos que impidan la entrada del virus, todavía no se han conseguido resultados positivos.

En 1991 en Estados Unidos, el 52% de la producción (30,8 millones de dólares) se perdió como resultado de enfermedades, la mayoría de origen vírico [Leong, 1995 #938] y en Europa se calculan pérdidas de 50 millones de € anuales por septicemia hemorrágica vírica (VHS) [Olesen, 1997 #1435] y otras patologías similares como la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI). En Japón las pérdidas económicas producidas por rabdovirosis alcanzan el mismo orden de magnitud.

En la UE existen unas 1.700 piscifactorías dedicadas al cultivo de salmónidos con una producción total superior a las 200.000 Tm/año. Sólo en Francia la SHV causa un 30-50% de pérdidas anuales en tonelaje en las áreas infectadas. La amenaza de los rabdovirus sobre la producción europea es tal que la UE puso en marcha un programa de erradicación (Doc. 90/495/EF) [Hattenberg-Baudoy, 1995 #890], cuyo resultado se muestra en la Figura 1A [Olesen, 1998 #1550].

El mercado potencial de una posible vacuna y/o método terapeútico para la enfermedad producida por el VSHV en Europa está estimado en unos 5 millones de €/año (se supone que serían necesarias ~ $7x10^8$ dosis, con un coste unitario de 7 €). Una repercusión similar tendría una posible vacuna y/o método terapeútico frente a la enfermedad producida por el VNHI.

La producción actual anual de la Acuicultura en España está concentrada fundamentalmente entre la piscicultura de la trucha (20.000 Tm/año) y el cultivo del mejillón (200.000 Tm/año) [Coll, 1988 #639]. El resto de la producción se reparte entre la Acuicultura marina: cultivo de peces (lubina, dorada, rodaballo y salmón), otros moluscos (ostra) y crustáceos (langostino) y la repoblación de ríos y lagos con especies como la tenca, la carpa o el cangrejo de río [Coll, 2001 #2225]. El potencial futuro de la producción de la Acuicultura en España se estima en unas 865.000 Tm/año. En España la producción anual de salmónidos supone ~ 100 millones de truchas y una importación anual de 200-400 millones de huevos que entran en España procedentes de otros países sin apenas controles sanitarios. Lo que supone una grave amenaza, ya que en nuestro país no se han detectado brotes de rabdovirus en los últimos 10 años.

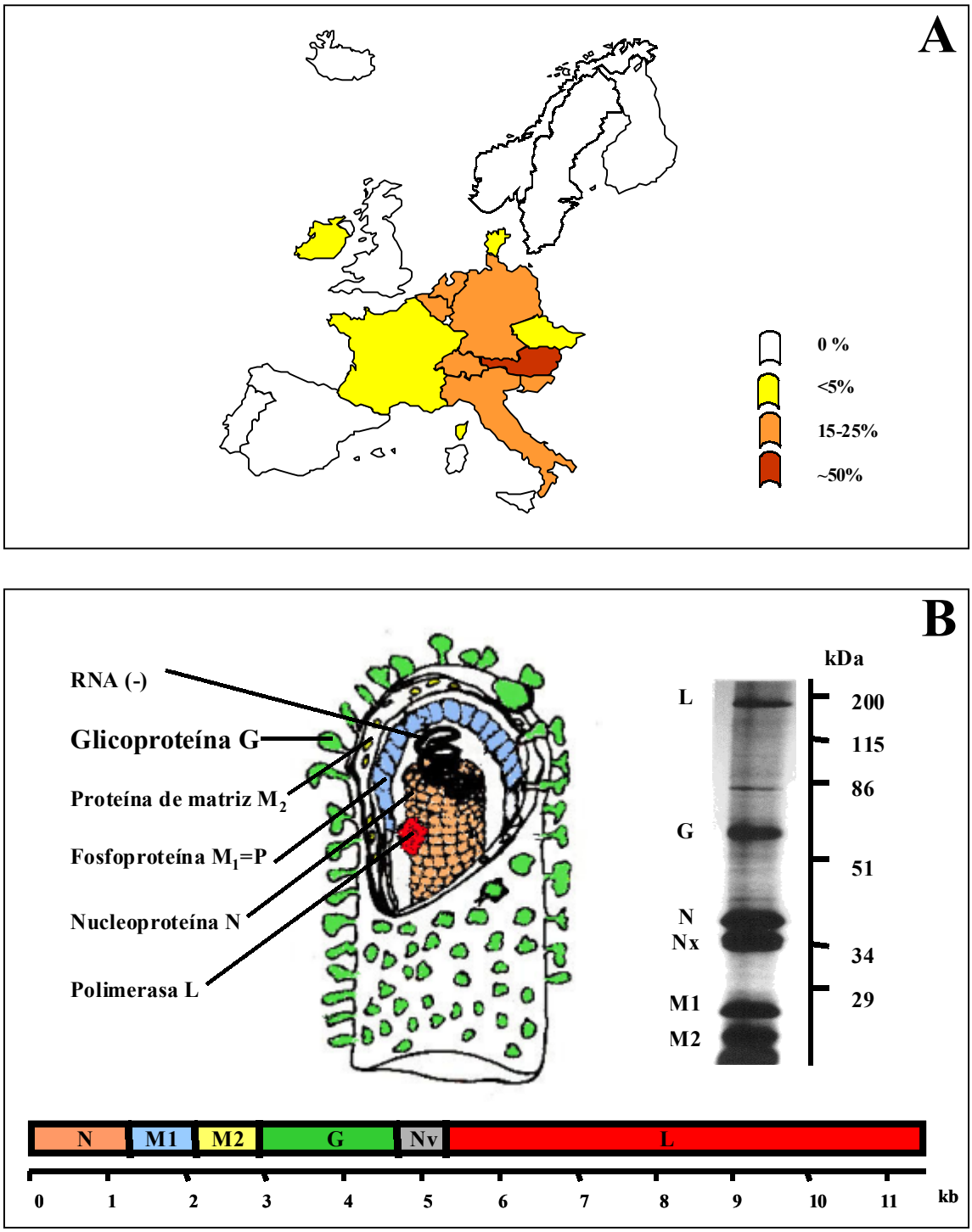



**Figura 1. Grado de infección por rabdovirus de los Estados Europeos participantes en el informe de situación de las enfermedades víricas en Europa de 1998 [Coll, 1999 #1560; Olesen, 1998 #1550]. A) y estructura y genoma de VSHV (B). A,** Se han clasificado los países según el porcentaje de granjas positivas para rabdovirus (VSHV + VNHI + SVCV + EVX) en cuatro colores: blanco (0%), amarillo (<5%), naranja (15-25%) y rojo (~50%). **B)** Izquierda, esquema de la morfología de VSHV. Derecha, perfil de proteínas de VSHV en gel de poliacrilamida, con sus pesos moleculares en KDa. Nx, variante génica de N [Basurco, 1991 #35]. Abajo, disposición de los genes en el ARN viral y tamaño aproximado. Nv, proteína no estructural.

## TABLA 1.

## Cepas y aislados de rabdovirus de peces.

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

[a], Los tamaños se dan como medias de varios autores según datos recopilados por Frerichs [Frerichs, 1989 #2381].
[b], Rango de temperaturas de replicación e infección viral.
[c], Líneas celulares susceptibles (sin paréntesis) y refractarias (con paréntesis). R=RTG-2, E=EPC, F=FHM, C=CHSE, B=BF2.

## 1.2. **LOS RABDOVIRUS DE PECES**.

**1.2.1. Los rabdovirus más importantes: VSHV e VNHI**. El VSHV y el VNHI pertenecen al género *Novirhabdovirus* (caracterizado por la presencia de la proteina no estructural Nv), dentro de la familia *rabdoviridae*, compuesta por virus con ARN monocatenario no segmentado y de polaridad negativa [Walker, 1999 #2010; Biacchesi, 2000 #2002]. la familia *Rabdoviridae* comprende cinco géneros, en base al rango del hospedador, presencia de genes suplementarios y lugar de replicación del virus dentro de la célula. están más ampliamente distribuidos en la naturaleza que otras familias (infectan tanto vertebrados como invertebrados y plantas).

El virus VSHV es endémico en Europa y afecta a varias especies cultivables tales como la trucha, el salmón coho, el salmón chinook, el rodaballo y la anguila y a otras con potencial de cultivo como el bacalao y el arenque [Schlotfeldt, 1991 #436]. Experimentalmente, se han demostrado infecciones en lubina y rodaballo [Brañas, 1994 #840] y se ha aislado en cultivos de rodaballo [Schlotfeldt, 1991 #436], anguila, lenguado y langostino [Liu, 1995 #1024]. Además en la década de los 80 se detectaron brotes de VSHV en Norteamérica. Concretamente el VSHV se ha aislado a partir de salmón, bacalao y arenque [Brunson, 1989 #836; Hopper, 1989 #835; Snow , 1999 #1969; Winton, 1991 #1216; King, 2001 #2388]. Uno de los últimos brotes de VHS se detectó en el 2001 en Japón, afectando a las poblaciones acuicultivadas de platija japonesa [Isshiki, 2001 #2389]. Con este brote ya son tres los continentes afectados: Europa, Norte América y Japón.

Se han podido definir varios serotipos de referencia (F1, F2 y 23.75) de VSHV por seroneutralización con anticuerpos policlonales (AcP) [DeKinkelin, 1977 #150; Hattenberg-Baudoy, 1995 #890; Olesen, 1993 #868; Vestergaard-Jorgensen, 1972 #488].

En España se aislaron y estudiaron cinco brotes de VSHV F1 [Basurco, 1989 #30; Basurco, 1992 #937].

**1.2.2. Estructura molecular.** La partícula viral tiene un tamaño de ~ 170x80 nm (Figura 1B). Se compone de una nucleocápsida interna con simetría helicoidal que encierra una molécula de ARN monocatenario de polaridad negativa y una envuelta exterior formada por una membrana lipídica procedente de la célula huésped. La membrana contiene espículas trímericas de naturaleza proteica que se proyectan hacia el exterior de ésta (Figura 1B). En su conjunto la partícula viral posee una morfología en forma de bala compuesta por 5 proteinas, L, pG, N, M1 y M2. La proteína L (190 kDa), asociada al ARN vírico, tiene actividad transcriptasa y replicasa, es una ARN polimerasa ARN dependiente. La proteina G (pG, 65 kDa) es una glicoproteína que forma las espículas triméricas de la membrana del virus, responsables de la producción de anticuerpos (Ac) neutralizantes. La nucleoproteína N (40 kDa) forma la nucleocápsida y es la proteína mayoritaria. En VSHV se ha descrito además una proteína Nx relacionada antigénicamente con la proteína N, cuya función se desconoce [Basurco, 1991 #36]. La fosfoproteína M1 o P (19 kDa) está asociada a la polimerasa L. La proteína M2 o M (25 kDa) puede estar situada o alrededor de la membrana lipídica o en el interior de la nucleocápsida [Barge, 1993 #734]. En VSHV e VNHI existe además una proteína no estructural Nv (12 kDa) no descrita en otros rabdovirus [Basurco, 1995 #886; Basurco, 1993 #954; Kurath, 1995 #888] y que da nombre al género *Novirhabdovirus*.

Como ya se ha mencionado antes, el genoma está constituido por una molécula de ARN monocatenario de polaridad negativa, que en el caso del VSHV tiene ~11.000 bases [Hill, 1975 #269] y un peso molecular de 5-6,4x$10^6$ KDa [Enzmann, 1981 #207]. El orden de los genes en el ARN es 3' N-$M_1$-$M_2$-G-NV-L 5'. Se ha secuenciado el genoma completo tanto del VSHV [Heike, 1999 #2382; Nishizawa, 2002 #2392] como del VNHI [Jorgensen, 1995 #877; Morzunov, 1995 #848; Nichol, 1995 #847; Oshima, 1995 #867; Schuetze, 1995 #846] y partes importantes del VVPC y del HRV [Bjorklund, 1996 #1212]. Además ya se han publicado varios

estudios comparativos de secuencias [Kurath, 1995 #888; Morzunov, 1995 #848; Nichol, 1995 #847] y se han obtenido recientemente virus infectivos ADN de VNHI a partir de cADN mediante tecnologías de genética reversa, lo que permite su manipulación genética e introducción de mutantes [Biacchesi, 2000 #1956; Biacchesi, 2000 #2002; Biacchesi, 2002 #2324; Estepa, 1999 #1903; Biacchesi, 2002 #2393].

La infección de un rabdovirus comienza por la unión de la glicoproteina G de la envuelta del virus a receptores específicos en la membrana plasmática de la célula huésped que induce un proceso de endocitosis. A continuación tiene lugar una fusión de las membranas virales y las del endosoma dependiente de una bajada de pH que permitirá a la nucleocápsida liberar el ARN en el citoplasma celular [Coll, 1999 #1905]. Se replican en el citoplasma de las células que infectan y los viriones maduran y brotan por gemación en la superficie celular llegando a lisar la célula.

## 1.3 ESTRUCTURA DE LA PROTEINA G

**1.3.1. Función general y estructura**. Una partícula de rabdovirus contiene unos 450 trímeros de pG [Gaudin, 1999 #2327], cada uno de los cuales forma una espícula que sobresale 84 Å [Gaudin, 1993 #545; Gaudin, 1992 #766] del virión. La pG inicia el reconocimiento del rabdovirus a su receptor(es) celulares [Wunner, 1984 #543] y contiene las propiedades de fusión del virus detectables a pH < 6 en el virus de la estomatitis vesicular, VSV [Konieczko, 1994; Whitt, 1990 #575; Whitt, 1991 #853], en el virus de la rabia, RV [Gaudin, 1993 #545] y en el virus VSHV [Lecocq-Xhonneux, 1994 #777; Estepa, 1996 #892]. La pG es la diana de los anticuerpos neutralizantes inducidos en el huésped en VSV [Kelley, 1972], VSHV [Lorenzen, 1990 #329; Cupit, 2001 #2394], el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, VNHI [Engelking, 1989 #202] y el RV [Dietzschold, 1987 #172; Benmansour, 1991 #578].

La secuencia de la pG de los rabdovirus de mamíferos y peces está formada por ~ 500 amino acidos (aa). La pG contiene 2-6 sitios de glicosilación, 6-8 puentes disulfuro altamente conservados [Walker, 1999 #2010; Einer-Jensen, 1998 #1507], 2-3 heptadas hidrofóbicas repetidas

[Coll, 1995 #775], una región transmembranal carboxi-terminal, un dominio citoplasmático carboxi-terminal y un peptido señal [Coll, 1995 #803].

Un alineamiento reciente que incluye las secuencias de pG de varios rabdovirus, VSV, RV, VSHV, hirame rabdovirus (HRV), VNHI y el virus de la viremia primaveral de la carpa (SVCV) mostró una homología de secuencias de tan solo 18-26% y una identidad de secuencia de únicamente del 5% [Einer-Jensen, 1998 #1507]. La pG del Sonchus Yellow Net Virus y del Rice Transitory Yellowing Virus, 2 de los rabdovirus de plantas más estudiados (números de acceso de secuencias en GenBank L32603 y ABO11257), tampoco tenían mucha homología de secuencias con los rabdovirus animales. Mientras que todavía se espera la resolución de la estructura de la pG de rabdovirus por rayos X, los continuos avances en la estructura de la pG son relevantes a la hora de estudiar las etapas tempranas de la infección rabdoviral.

**1.3.2. Heptadas hidrofóbicas repetidas.** Muchos virus con envuelta tienen heptadas hidrofóbicas repetidas en sus pG. Dichas heptadas están relacionadas con la fusión [Skehel, 1998 #1551] y forman hélices superenrolladas, tal y como se demuestra por rayos X su estructura. Las heptadas encontradas en estas estructuras tienen 3-4 secuencias contiguas de 7 aa (**a**bc**d**efg) en las cuales los aa situados en cada posición de la heptada se pueden determinar por una matriz de probabilidades según los criterios establecidos por Lupas [Lupas, 1991]. Los aa que se encuentran con más frecuencia en las posiciones a-d son F, Y, I, L, V, M, o A [Lupas, 1991]. Sin embargo, las heptadas definidas por Lupas no están presentes en las pG de los rabdovirus. Sólo después de considerar en a-d todos los aa hidrofóbicos (los arriba mencionados y además W, H, T) [Schulz, 1984], se pueden encontrar heptadas hidrofóbicas repetidas en la pG de los rabdovirus de mamíferos (VSV y RV), de peces (VSHV, VNHI, SVCV) y de plantas [Coll, 1995 #775].

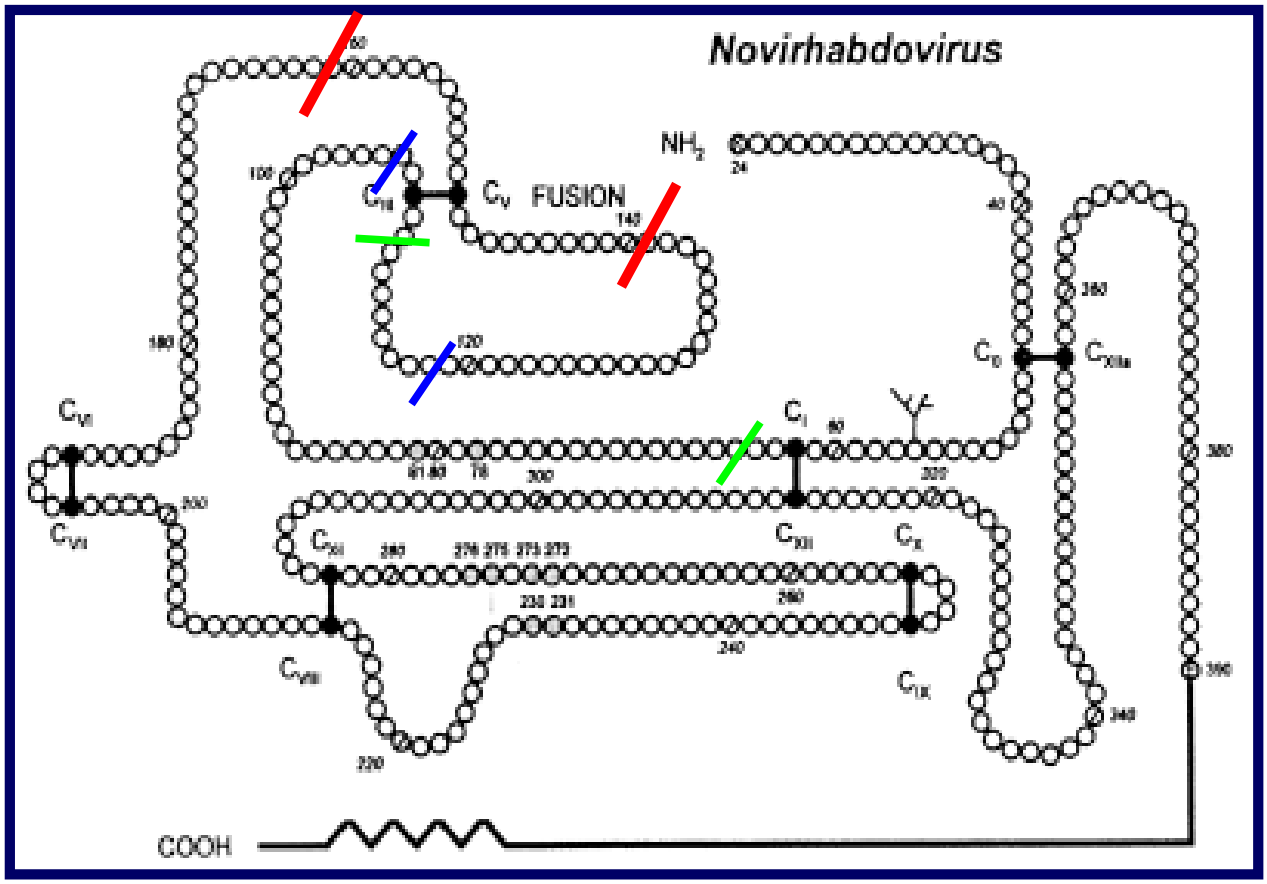



**Figura 2. Esquema de la estructura tridimensional de la pG de rabdovirus propuesta por Walker** [Walker, 1999 #2010]. Del estudio de mutantes deficientes en fusión se ha localizado la región entre los aa 140 a 160 del VSV como directamente implicados en la fusión [Shokralla, 1998 #1426; Zhang, 1994 ]. Se ha comprobado que esta región aparece en todos los rabdovirus incluidos los rabdovirus de peces o Novirhabdovirus [Walker, 1999 #2010].Aquí se esquematiza entre las líneas rojas. El análisis de la dependencia de pH en los mutantes resistentes a neutralización de VSHV indica que en este rabdovirus la región de fusión está constituida por al menos dos dominios (110-118 y 144-154) unidos por un puente disulfuro entre las cisteinas 110 y 152 (líneas azules) [Gaudin, 1999 #1914]. Entre las líneas verdes se ha esquematizado la posición aproximada del frg#11 según se ha definido en este trabajo.

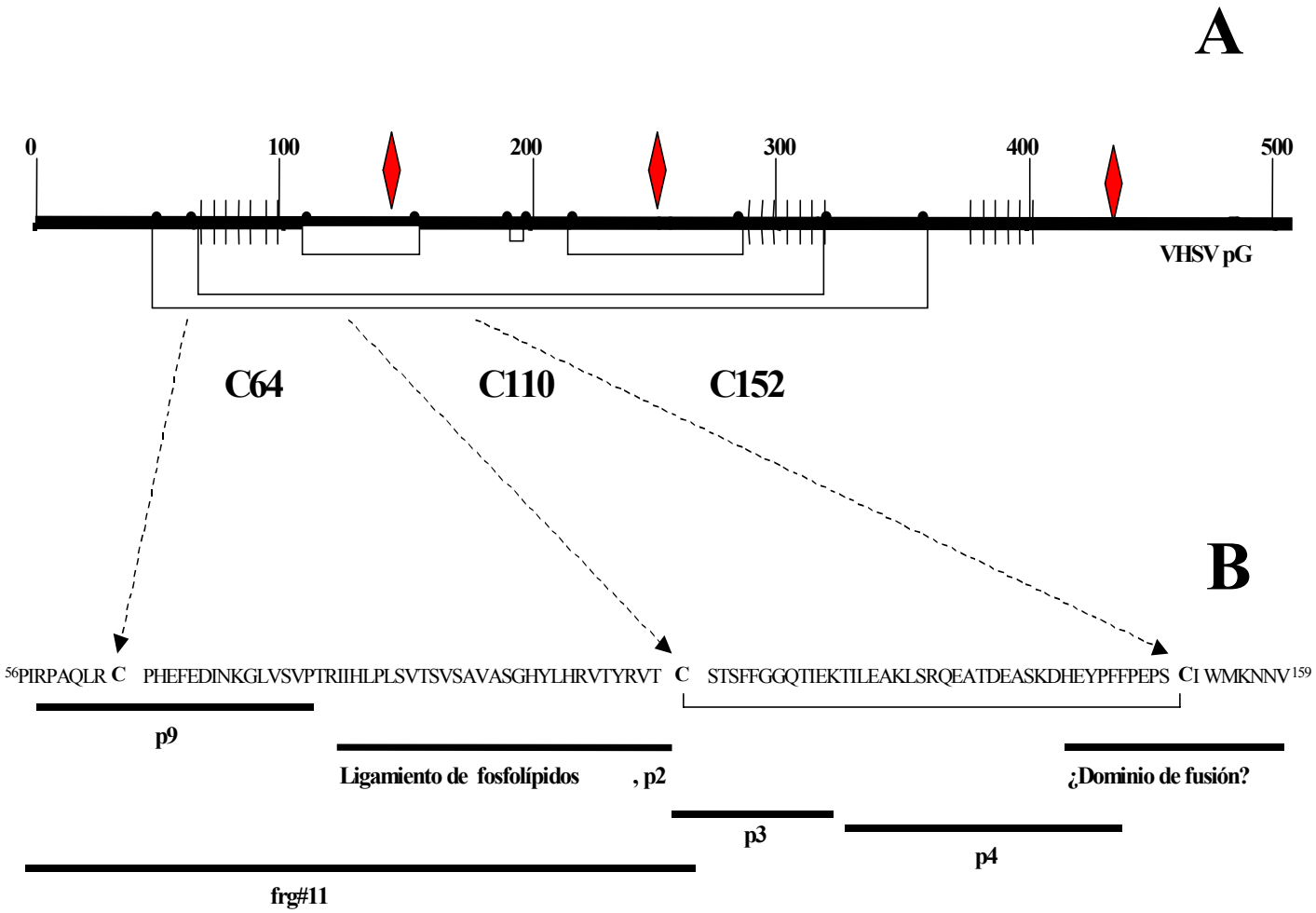



**Figura 3. Localización de puentes disulfuro, heptadas hidrofóbicas repetidas, posiciones mutadas en los mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales neutralizantes y localización de p9, p2, p3, p4 y frg#11 en la pG de VSHV. A) ━**, secuencia de la pG de VSHV; ●, Cisteinas conectadas por líneas horizontales que esquematizan los puentes disulfuro [Einer-Jensen, 1998 #1507]. Las cisteinas alrededor del dominio de ligamiento a fosfolípidos son C64, C110 y C152; la C110 está ligada a la C152 (línea horizontal). ▏▏▏▏, heptadas repetidas hidrofóbicas de acuerdo con Coll [Coll, 1995 #775]. ◆, mutantes resistentes al AcM neutralizante C10 que mapean en posiciones 140 y 433 y mutantes resistentes al AcM 3F1A12 que mapean en posición 253 [Cupit, 2001 #2394]. **B)** p9, secuencia y localización de p9 (aa 58-80); p2, dominio principal de ligamiento de fosfolípidos (aa 82-109); p3, secuencia conservada en los rabdovirus de peces de aguas frías (aa 110-122); p4, bucle altamente hidrofílico (aa 123-144); frg#11, heptadas hidrofóbicas repetidas (aa 56-110) y peptido hipotético de fusión (aa 142-159) [Walker, 1999 #2010].

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

**1.3.3. Puentes disulfuro**. La pG de los rabdovirus posee 12-16 cisteinas (C) dependiendo de los géneros [Coll, 1995 #803], pero a pesar de las diferencias de secuencias entre géneros, las posiciones relativas de la mayoría de las C están conservadas.

Solo existe un trabajo en el que se ha dilucidado la estructura de los puentes disulfuro de la pG de rabdovirus y es precisamente el del VSHV [Einer-Jensen, 1998 #1507]. Para la pG de VSHV se han asignado los 6 puentes disulfuro a sus 12 C; 2 puentes disulfuro forman bucles entre aa situados a gran distancia en la secuencia de pG (C29-C339 y C44-C295). Entre los dos doblan la estructura de la pG poniendo juntas la región amino-terminal y la central (Figura 2 y 3). Otros dos puentes disulfuro forman bucles pequeños situados dentro de los bucles mayores. El bucle C90-C132 contiene la región donde se sitúan algunos mutantes resistentes al AcM neutralizante C10 [Bearzotti, 1995 #883] y el bucle C195-C265 contiene la región donde mapea el AcM neutralizante 3F1A12 [Lorenzen, 1998 #1549; Cupit, 2001 #2394]. Los otros dos puentes disulfuro (C172-C177 y C231-C236) son muy estables debido a que unen dos C localizadas muy cerca una de la otra en la estructura de la pG.

La existencia de al menos un gran bucle formado por un puente disulfuro se ha propuesto para la pG de VSV [Grigera, 1992 #1285]. Además para la pG de RV, se han propuesto 3 puentes disulfuro

[Dietzschold, 1982 #171], corroborando la estructura propuesta para VSHV (Figura 3). También el alineamiento de la secuencia de pG de VSHV con las de otros rabdovirus (incluyendo RV, VSV y VNHI) [Einer-Jensen, 1998 #1507], indican una estructura de puentes disulfuro común (Figuras 2 y 3).

## 1.4. INTERACCIÓN DE RABDOVIRUS Y CÉLULAS

**1.4.1. Importancia del estudio de las fases tempranas de la infección.** La importancia del estudio de las fases tempranas de la infección de VSHV se basa en las posibilidades que ofrece de desarrollo de métodos terapeúticos y/o de vacunas. El conocimiento del mecanismo de procesos tales como la fusión permitiría desarrollar agentes químicos que podrían ser utilizados para interferir en el proceso, es decir que se pudieran usar como agentes terapeúticos capaces de atajar la enfermedad durante el curso de las infecciones. Por otra parte, el mayor conocimiento de las secuencias del VSHV implicadas en procesos como la fusión, podría llevar al diseño de mutantes multiples que resultaran en la atenuación del virus y que se podrían utilizar para el desarrollo de vacunas vivas o de ADN.

**1.4.2. Receptores celulares.** El reconocimiento entre los rabdovirus y sus células huésped está mediado por la unión de la pG a su receptor celular cuya naturaleza aún no está totalmente identificada. Los primeros experimentos mostraron que los rabdovirus VSV y RV competían por un receptor común en las células susceptibles. Este receptor común tenía un componente soluble en disolventes orgánicos que bloqueaba el ligamiento e infectividad de los rabdovirus [Wunner, 1984 #543; Conti, 1988 #946], ya que el tratamiento de la membrana celular con fosfolipasa pero no con tripsina inhibía el ligamiento de VSV o RV a las células huésped [Superti, 1984 #609; Wunner, 1984 #543]. Además la fosfatidilserina (PS) es capaz de inhibir el ligamiento de VSV a la célula huésped y la formación de placas de lisis [Schlegel, 1983 #544]. Tanto la cabeza de la serina como los acidos grasos fueron esenciales para la inhibición [Yamada, 1986]. El ligamiento de PS por la pG se ha demostrado y mapeado en el caso de la pG de VSHV [Coll, 1994 #774]. La segregación predominante de la PS a la parte interior de la membrana plasmática (80-90% del total de la PS en la

membrana), podría explicar el número limitado de receptores. A pesar del papel aparente de la PS en el ligamiento de VSHV o VSV [Konieczko, 1994], lo más probable es que la PS constituya, una parte de un complejo proteina-lipido [Schlegel, 1983 #544; Schlegel, 1983 #603] o una interacción implicada en los pasos posteriores de fusión [Estepa, 1996 #1204].

Se han aplicado distintas estrategias para intentar identificar las secuencias de la pG implicadas en la interacción con el receptor. Por ejemplo la secuencia 170-255 de la pG de RV era homologa a las regiones de los venenos de serpiente que interaccionan con el receptor de acetilcolina (AchR) [Tordo, 1993 #768], sugiriendo su implicación en el reconocimiento del receptor. Además la pG de RV interacciona con el AchR y se comporta como un antagonista del AchR [Hanham, 1993].

Siguiendo una estrategia diferente, se generaron 3 AcM anti-receptores de VSHV capaces de neutralizar la infectividad de VSHV en células de trucha RTG-2 y salmón CHSE. Por inmunoprecipitación de los componentes proteicos de la membrana plasmática se pudo identificar un complejo que interaccionaba con ellos compuesto de fibronectina (200 KDa) y una proteina de 47 KDa aún no identificada, siendo este complejo abundante en músculo de trucha y en todos los órganos diana de VSHV. Los AcM anti-receptor también bloqueaban la infección de otros rabdovirus de peces (tenca, SVCV, rabdovirus de la anguila, serotipos distintos de VSHV e VNHI) [Bearzotti, 1999 #1516]. La fibronectina pertenece a la familia de moléculas de adhesión y forma dímeros covalentes de 400 KDa [Sadaghiani, 1994 #1542]. Un complejo de fibronectina se ha identificado también como uno de los receptores de RV [Broughan, 1995 #1544]. Puesto que otros estudios habían identificado el AchR como receptor de RV [Bracci, 1988 #1543; Gastka, 1996 #1546; Lentz, 1986 #1547; Lentz, 1982 #1548], fue interesante comprobar que la fibronectina y el AchR se encuentran formando complejos en la membrana de varias células [Dimytrenko, 1993 #1545]. Todos estos estudios, sin embargo, sólo han comenzado a desvelar la complejidad de la interacción de un rabdovirus con su receptor en la membrana celular y se necesita todavía mucho trabajo en este área de investigación.

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

Únicamente en el caso del RV, se ha llevado a cabo un análisis extensivo de esta estrategia. Para RV se han encontrado pocos AcM anti-pG que no fueran neutralizantes o que fueran independientes de la conformación de la pG [Kontsekova, 1992; Benmansour, 1991 #578; Bunschoten, 1989 #67]. La mayoría de los 266 AcM anti-pG de los que se dispone reconocen varios epítopos superpuestos que definen el sitio II (72.5% de los AcM) y el sitio III (24.8% de los AcM). El resto de los AcM van dirigidos a los sitios I y IV [Lafon, 1983 #310; Benmansour, 1991 #578]. Los mutantes MAR del sitio II siempre presentan 2 mutaciones simultáneas localizadas en aa 34-42 y en aa 198-200, por lo que el sitio II es un epítopo discontinuo. Sin embargo los mutantes MAR del sitio III solo presentan sustituciones de aa localizadas en aa 330-338 (sitio continuo).

Sólo existe un trabajo bioquímico/inmunológico que estudie los fragmentos de la pG de RV importantes para la neutralización [Dietzschold, 1982]. Mientras que todos los fragmentos de la pG obtenidos por tratamiento con bromuro de cianógeno (CNBr) eran capaces de inducir AcP, solo los fragmentos peptídicos aa 20-63, aa 123-198 (el más antigénico) y aa 312-342 eran capaces de inducir AcP neutralizantes. Los fragmentos peptídicos aa 20-63/aa 208-255 y aa 208-255/aa 264-310 estaban unidos por puentes disulfuro.

Estos resultados junto con los obtenidos con los mutantes MAR y otros más recientes [Johnson, 2002 #2396] sugieren una estructura de doble bucle en la pG de RV. El primer bucle es el mayor (fragmento peptídico aa 20-63 unido al aa 208-255) y contiene al bucle menor que a su vez es el que contiene al sitio más antigénico (aa 123-198).

## 1.5 FUSION ENTRE LAS MEMBRANAS RABDOVIRALES Y CELULARES

**1.5.1. Dependencia de la fusión con la disminución de pH.** Después de la internalización celular de los rabdovirus, tienen lugar la fusión entre las membranas virales y las del endosoma celular. Mientras que la unión del virus a su receptor puede ocurrir a 4ºC y pH 7.5, la internalización es un proceso dependiente de la temperatura-energía de la célula y la fusión es dependiente de la disminución de pH en VSV [Schlegel, 1982; Rigaut, 1991] y en RV [Superti, 1984 #542].

Para confirmar esos resultados, las vesículas de lípidos y la pG de VSV solo se fusionaron con vesículas de fosfolípidos a pH 5, tal y como se comprueba por microscopía electrónica o transferencia de fluorescencia [Eidelman, 1984 #610]. La hemolisis de eritrocitos causada por la adición de VSV también es maxima a pH 5 [Bailey, 1981] y la exposición a pH 5 de células infectadas o transfectadas expresando pG en sus membranas causa fusión célula-célula en VSV [Gaudin, 1993 #545] y en VSHV [Lecocq-Xhonneux, 1994].

**1.5.2. Cambios conformacionales inducidos en la pG por la bajada de pH.** La exposición de VSV a pH 5, induce una acumulación de los trímeros de pG en la zona apical del virión tal y como ha sido demostrado por microscopía electrónica [Brown, 1988 #797]. Además, la exposición de trímeros de pG de RV a pH 5 induce un equilibrio reversible entre el estado activo de fusión (83 Å) y el estado inactivo de fusión (113 Å) [Gaudin, 1993 #545]. Este equilibrio, también se ha observado en VSV [Doms, 1987 #] siendo dependiente de la protonización de residuos de histidina [Carneiro, 2003 #2418]. Este cambio de conformación que es un requerimiento imprescindible para la fusión [Maillard, 2002 #2398; Roche, 2002 #2397], supone la exposición de sitios hidrofóbicos de la pG a su superficie, tal y como se demuestra por la alteraciones en la unión de AcM anti sitio II y en la fluorescencia usando fluoróforos hidrofóbicos [Gaudin, 1993 #545].

**1.5.3. Interacciones con fosfolípidos**. Los fosfolípidos extraídos de las membranas celulares inhiben la unión y la infectividad del RV [Superti, 1984 #609] y del VSV [Bailey, 1984; Conti, 1988 #946; Mastromarino, 1987; Schlegel, 1982]. La fosfatidilserina (PS) fue el inhibidor más potente [Schlegel, 1983 #544] y recientemente se ha demostrado que en VSV la fusión requiere interacciones proteina-lipidos [Carneiro, 2002 #2399; Carneiro, 2003 #2418].

El dominio principal de unión de PS se identificó en la pG de VSHV usando pepscan, peptidos sintéticos, pG recombinante y VSHV en ensayos de ligamiento de PS marcada en fase sólida como el correspondiente al aa 82-109 (p2) [Estepa, 1996 #1204; Estepa, 1996 #892; Coll, 1997 #1252]. Este domino de ligamiento de PS contiene heptadas hidrofóbicas no canónicas seguidas por una cabeza con 2 aa cargados positivamente [Coll, 1995 #803]. También se pudieron encontrar heptadas repetidas seguidas de aa cargados positivamente en otros pG de otros rabdovirus en localizaciones similares con variaciones en: secuencias, número de heptadas repetidas, longitud de la cabeza positiva y clase de aa cargados positivamente [Estepa, 1996 #892; Coll, 1995 #775; Coll, 1995 #803]. Los peptidos sintéticos obtenidos de estas regiones también ligaban PS [Coll, 1997 #1252], pero no se pudo demostrar una relación funcional.

Dependiendo de su concentración, el peptido p2 inducía agregación de vesículas, mezcla de lípidos y salida de sondas marcadas con fluoróforos y atrapadas en vesículas de fosfolípidos [Nuñez, 1998 #1251]. Estas observaciones y otros experimentos confirmaron que en la interacción PS-p2 intervenían no solo las interacciones hidrofóbicas sino también las interacciones iónicas [Estepa, 1996 #1204], tal y como se ha demostrado con la pG para otros rabdovirus [Yamada, 1986].

Mediante depolarización de fluorescencia y calorimetría diferencial de barrido, se ha demostrado que el peptido p2 se inserta en la parte hidrofóbica de una bicapa de lípidos aniónicos manteniendo o favoreciendo una estructura conformacional ß [Nuñez, 1998 #1251]. A su vez, el dicroismo circular (CD) demostró que la estructura ß es prácticamente la única que se observa después de la interacción de p2 con PS y es por lo tanto la responsable de la desestabilización de la membrana por este peptido [Nuñez, 1998 #1251].

**1.5.4. Mutantes MAR a bajo pH.** Los AcM neutralizantes que interaccionan con rabdovirus únicamente al pH de la fusión, sólo se han podido estudiar en el caso del RV. Todos estos mutantes mapearon en las regiones aa 29-34, aa 63 y aa 411-415 [Flamand, 1993 #580], pero no se ha establecido claramente su posible relación con la fusión [Gaudin, 1996 #1323].

**1.5.5. Mutantes deficientes en la fusión.** Esta clase de mutantes solo se han estudiado hasta ahora en VSV. El primer mutante defectivo en fusión descrito de VSV se localizó en el aa 117 de la secuencia de la pG. Más adelante la generación de varios mutantes defectivos en fusión por inserción de aa, sugirió que la fusión dependía de varios dominios de la pG tales como los adyacentes a los aa 123, 194, 410 ó 415 [Li, 1993 #571] además de la región aa 118-136 [Whitt, 1990]. Utilizando mutagénesis dirigida, finalmente se identificó la región entre los aa 123-137 de la pG de VSV como la más importante en la fusión y la que contenía el hipotético peptido de fusión [Zhang, 1994]. Sin embargo, otras regiones de la pG también están implicadas en la fusión, ya que se han generado mutantes defectivos en fusión en regiones como las definidas por los aa 120-150, aa 134-161, aa 190-210, aa 300-360 y aa 409-419 [Shokralla, 1998 #1426]. La región aa 385-418, por ejemplo, también altera el pH optimo de la fusión y la región inmediatamente adyacente al domino transmembranal, aa 443-452, también parece estar implicada en el proceso [Shokralla, 1998 #1426; Jeetendra, 2002 #2395], tal y como se ha demostrado recientemente por estudios spectroscópicos con peptidos derivados de esa región [Maillard, 2003 #2423].

**1.5.6. Peptidos inhibidores de la fusión.** En la mayoría de los virus con envuelta, la disminución del pH en el endosoma provoca un cambio conformacional irreversible en la correspondiente proteina vírica de membrana que conduce primero a la liberación de un segmento amino terminal comienzo del peptido de fusión. En el caso de los rabdovirus, la situación es totalmente distinta por que su peptido de fusión es interno y los cambios conformacionales inducidos como consecuencia de la disminución del pH son reversibles.

Se han encontrado algunos peptidos sintéticos derivados de la secuencia de pG de virus con envuelta capaces de inhibir su propia infección. Por ejemplo, los peptidos sintéticos correspondientes a las heptadas repetidas amino-terminales o peptidos N (DP-107) adyacentes al peptido de fusión de la glicoproteína (pG) del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), bloquean la infección viral e inhiben la formación de sincitios a concentraciones micromolares [Owens, 1990 #1259; Wild, 1992 #910]. Sustituciones de aa en las heptadas repetidas de los

peptidos N eliminaban su actividad antiviral [Kazmierski, 1996 #1190; Wild, 1992 #910]. Otros peptidos sintéticos correspondientes a la parte C-terminal, adyacente a la región transmembranal (DP-178) y con una tendencia a formar $\alpha$-helices, también tienen actividad antiviral incluso superior (concentraciones nanomolares) [Wild, 1993 #1198; Wild, 1995 #1199]. Además, se han descrito peptidos inhibidores localizados en la secuencia del peptido de fusión de la pG de HIV [Slepushkin, 1993 #1168; Jiang, 1993 #1261; Jiang, 1993 #1262; Nehete, 1993 #1263]. Peptidos inhibidores similares a los descritos para HIV se han encontrado en los virus de la influenza [Yao, 1996 #1188; Lambert, 1996 #1200], respiratorio sincitial [Lambert, 1996 #1200], paramixovirus [Sergel-Germano, 1994 #1126; Rapaport, 1995 #1124; Reitter, 1995 #1122] y paperas [Lambert, 1996 #1200; Wild, 1997 #1254].

Debido a la capacidad de los peptidos C para asociarse con los peptidos N [Chen, 1995 #1092], la actividad antiviral de los peptidos sintéticos C podría ser debida a las interacciones con los dominios de peptidos N en la pG y al revés [Wild, 1995 #1199; Chan, 1997 #1320]. La estructura de rayos X de esta parte de la molécula de pG de HIV demostró que 3 peptidos N forman una triple hélice superenrollada sobre la que se sitúan exteriormente 3 peptidos C [Chan, 1997 #1320]. Este complejo N+C es capaz de formarse en ausencia del resto de la proteina, es estable a altas temperaturas, las mutaciones en sus heptadas repetidas incorporadas a la pG impiden la fusión de HIV y la adición in vitro de los peptidos sintéticos derivados de las secuencias N o C son capaces de inhibir la infección viral y la formación de sincitios.

En los rabdovirus, sin embargo no hay rotura interna de la pG para liberar el peptido de fusión, el cambio conformacional inducido por el pH es reversible y hasta el momento no se han descrito peptidos inhibidores. Se han descrito, sin embargo, peptidos capaces de aumentar la infectividad de VSHV cuyo mecanismo de acción está relacionado con la fusión y cuya secuencia es parcialmente idéntica con las de aa 88-96 y 133-135 de pG [Mas, 2002 #2385].

**1.5.7. Ensayos de fusión en rabdovirus.** Los principales ensayos de fusión utilizables para el estudio de mutantes defectivos en fusión, se han basado en transferencia de energía de fluorescencia, activación de la transcripción o formación de sincitios.

Para los ensayos de fusión basados en transferencia de energía de fluorescencia se utilizan liposomas marcados con N-(lisamina rodamina B sulfonil)-fosfatidiletanolamina (R-PE) y N-(7-nitro-2,1,3,-benzoxadiazol-4-il) fosfatidiletanolamina (NBD-PE). Cuando ambos fosfolípidos marcados están unidos en una vesícula, tras una excitación a 450 nm, la R-PE absorbe la emisión de la NBD-PE a 530 nm. Después de la fusión, los lípidos correspondientes a la membrana no marcada diluyen la mezcla R-PE+NBD-PE, no hay transferencia de energía entre el NBD y el RH y por lo tanto aparece la emisión de NBD-PE a 530 nm. Este ensayo se ha utilizado para seguir al fusión de RV con vesículas de fosfolípidos [Gaudin, 1993 #545]. Nunca se ha descrito para ensayar la fusión de células transfectadas.

En los ensayos de fusión por activación de la transcripción por la polimerasa del fago T7, se usan dobles transfecciones en células independientes. Por un lado, se transfectan células con plásmidos que tienen el gen de la ßgal bajo el promotor de la polimerasa T7 (por ejemplo, el pGINT7β). Por otro, se infectan células susceptibles a vaccinia con la cepa de Vaccinia VTF7-3, que expresa la polimerasa del fago T7 [Fuerst, 1986 #1511] y después se transfectan con plásmidos que codifican el gen de la proteina fusógena. La fusión entre ambas células se detecta después de mezclarlas por la activación por la polimerasa T7 del gen de la ßgal [Nussbaum, 1994 #1917]. Este ensayo nunca se ha descrito utilizando células de pez, aunque la obtención de VNHI ADN infectivo en células EPC ha utilizado recientemente este sistema [Biacchesi, 2000 #1956; Biacchesi, 2000 #2002; Biacchesi, 2002 #2324; Estepa, 1999 #1903; Biacchesi, 2002 #2393].

Para los ensayos de fusión por formación de sincitios, simplemente se transfectan las células con la pG y la fusión se detecta por visualización al microscopio de los sincitios que se forman. Este método se ha utilizado para caracterizar la fusión de EPC en células infectadas por

VSHV [Estepa, 1996 #892] y su dependencia de pH, temperatura y concentración celular [Estepa, 1997 #1284]. También se ha utilizado extensivamente en VSV para el estudio de mutantes de fusión por transfección con los plásmidos que contienen las secuencias mutadas [Li, 1993 #571; Zhang, 1994; Shokralla, 1998 #1426; Jeetendra, 2002 #2395].

## 1.6 ANÁLISIS COMPARATIVO DE MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN

**1.6.1 La transfección de células eucariontes.** En determinadas condiciones, las células eucariontes pueden internalizar ADN exógeno y un pequeño porcentaje de éste localizarse en el núcleo para su transcripción y expresión. La incorporación covalente del ADN exógeno al genoma ó no, hace que la expresión sea permanente ó temporal [Singh, 2001 #2163].

Debido al tamaño y carga negativa del ADN y a la multitud de barreras membranosas y enzimáticas de la célula, su entrada y consiguiente transcripción en el núcleo, donde residen la maquinaria celular de transcripción y las ARN polimerasas, es muy poco eficiente. Para aumentar esta eficiencia, se han desarrollado y continúan desarrollándose una amplia variedad de métodos. Históricamente, se ha utilizado fosfato cálcico, policationes condensadores de ADN (DEAE, polilisina), retrovirus, microinyección, etc [Garcia-Chaumont, 2000 #2168; Ma, 2001 #2172]. Sin embargo, estos primeros métodos tienen problemas de toxicidad celular, baja reproducibilidad, complejidad de ejecución ó bajas eficiencias de transfección. Para mejorar las bajas eficiencias de transfección de estos primeros métodos, se han empleado varias técnicas entre las que se encuentran la formación de complejos ADN-liposomas.

Las eficiencias de expresión de transgenes utilizando complejos ADN-liposomas no superan el 50% de las células transfectadas y la falta de control de las variables implicadas hace que su reproducibilidad sea baja. Los niveles de transfección más reproducibles son del ~ 20%. Se desconoce cuál es el paso limitante, puesto que los complejos ADN-liposoma penetran en el 100% de las células transfectadas aunque no en todas penetran el mismo número de moléculas [Tseng, 1999 #2095]. Los métodos para mejorar la eficiencia de expresión de los transgenes introducidos por transfección de los complejos ADN-liposomas van dirigidos a modificaciones en el ADN, en el

liposoma ó en la célula (Tabla 2). A su vez las modificaciones en la célula pueden clasificarse en aquellas que mejoran la translocación del ADN a través de la membranas plasmática (liposomas, ultrasonidos, electroporación, bombardeo), endosomal (agentes lisosomotrópicos, $Ca^{++}$) y/ó nuclear (control ciclo celular, NLS y peptidos). Si no se obtienen los máximos rendimientos en cada una de las translocaciones membranosas mencionadas, la baja eficiencia del proceso global disminuye la expresión del ADN transfectado.

Debido a que las células de pez tienen ciclos más largos que los de las células de mamíferos y temperaturas optimas de crecimiento menores, los reactivos comerciales para transfección basados en liposomas y desarrollados para células de mamíferos deben ser optimizados para transfectar este tipo de células. Por otra parte, muy pocos estudios se han dirigido a optimizar intrones [Betancourt, 1993 #726], promotores [Sharps, 1992 #1922; Inoue, 1990 #1911; Moav, 1992, #1923], activadores [Friedenreich, 1990 #1910], oncogenes [Hayasaka, 1990 #1916] o el uso de células multi-potentes [Bejar, 1999 #1915] para transfección [Hackett, 2000 #2004; Bearzotti, 1992 #1387]. La línea celular aislada de carpa [Fijan, 1983 #1906] epithelioma papulosum cyprini (EPC), fue la que mejor predijo el comportamiento de plásmidos en peces transgénicos [Moav, 1992 #1923] y se transfectaba con una mayor eficiencia que otras líneas celulares de peces [Bearzotti, 1992 #1387; Moav, 1992 #1923]. Por ello se ha elegido esta línea celular para los estudios presentes. Las eficiencias de transfección en estudios preliminares utilizando EPC fueron del 5-37% [Lopez, 2001 #1942].

**1.6.2. Ruta del ADN foráneo dentro de la célula.** Para que el transgen que codifica un ADN se exprese, la primera barrera que el complejo ADN-liposoma tiene que atravesar es la membrana plasmática (Figura 1). Utilizando ADN y liposomas marcados, se ha podido comprobar la co-localización de estos en la membrana plasmática una vez adicionados a las monocapas celulares. La entrada posterior a la célula puede ser por endocitosis natural (ruta endosoma-lisosoma), por fusión natural de membranas ó por medios artificiales (ultrasonidos, electroporación, bombardeo). Después, para que el ADN llegue al citoplasma tiene que atravesar la

membrana de los endosomas/lisosomas. Por último para que el ADN pueda entrar en el núcleo donde residen las ARN polimerasas, tiene que atravesar la membrana nuclear [Nishikawa, 2001 #2166]. Efectivamente, se comprueba que un tiempo después de la transfección, el ADN marcado se acumula en el núcleo donde los liposomas nunca se detectan [Marcusson, 1998 #2100; Scherman, 1998 #2113].

**1.6.3. Utilización de liposomas catiónicos para transfección de ADN.** El uso de complejos de ADN-liposomas formados por ADN (cargado negativamente) y liposomas catiónicos (cargados positivamente) ha mejorado la eficiencia y reproducibilidad de la transfección obtenida con métodos anteriores [Stamatatos, 1988 #1393; Lasic, 1997 #1391]. Los lípidos catiónicos que se usan para el diseño de los liposomas tienen parte hidrofílica y parte hidrofóbica. El uso de liposomas catiónicos tiene las ventajas de que forman complejos electrostáticos con el ADN, se introducen espontáneamente en las células facilitando el transporte del ADN al núcleo y hacen al ADN resistente a las nucleasas condensándolo en partículas mayores de 50 nm de diámetro [PedrosoDeLima, 2001 #2167; Lebedeva, 2000 #2170]. Es un método simple y más o menos reproducible [Felgner, 1987 #2098].

Aunque los complejos ADN-liposomas se pueden conservar a 4 ºC, se han diseñado liposomas capaces de resistir la liofilización y la posterior rehidratación [Anchordoquy, 1997 #2115].

La estructura de los complejos ADN-liposomas catiónicos es globular y multilamelar alternando una bicapa lipídica y una monocapa de ADN [Radler, 1997 #2102; Lin, 2000 #2171].

**1.6.4. Modificaciones en el ADN para aumentar la eficiencia de transfección.** El ADN que se utiliza para transfectar células con liposomas son plásmidos (ADN bicatenario circular covalentemente cerrado) que contienen secuencias reguladoras de la expresión del transgene y ~ 3 Kpb de secuencias bacterianas para replicación y selección del plásmido en bacterias [Estepa, 1994 #860]. Hay que tener cuidado de no degradar el ADN durante su preparación, ya que la transfección con ADN degradado induce apoptosis en las células transfectadas [Schiavone, 2000 #2157].

Las modificaciones en los plásmidos para mejorar su utilización con liposomas se han dirigido a aumentar bien su transcripción por selección de los mejores promotores para "atrapar" las ARN polimerasas [Moav, 1992 #1923 Bearzotti, 1992 #1387; Hansen, 1991 #728] ó bien su replicación mediante la inclusión de orígenes de replicación tales como el del virus SV40. Además, se han descrito aumentos de hasta 1000 veces en la expresión cuando se incluyen secuencias del promotor temprano de SV40 que actúa como señal de localización nuclear [Dean, 1999 #2160]. También se han utilizado miniplásmidos [Darquet, 1997 #2116] que al eliminar secuencias bacterianas, tienen aumentada su eficiencia de transfección ya que un mismo complejo liposomal puede vehiculizar un mayor número de moleculas de plásmido cuanto más pequeñas sean estas.

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

**1.6.5 Ultrasonidos para translocar la membrana plasmática.** Las ventajas del uso de la sonicación para la transfección del ADN son: i) rapidez, ii) sencillez y economía, iii) versátil por ser un método mecánico y iv) aplicable in vivo localmente para terapia génica [Newman, 2001 #2081]. Las aplicaciones de este método pasan por entender los efectos de la sonicación en las células y aclarar el mecanismo mediante el cual el ADN atraviesa las membranas celulares. El primer efecto que se observa después de la aplicación de los ultrasonidos a las células es el calentamiento [Diederich, 1999 #1944] . Un segundo efecto, es el aumento del espacio intercelular y más tarde perforaciones en las membranas al aumentar las intensidades/frecuencias [Frenkel, 2000 #1930; Martin, 1983 #1946]. Los ultrasonidos terapeúticos (~ W $cm^2$ a 3.000 KHz durante 30 a 90 s) producen un ensanchamiento del espacio intercelular en los tejidos así como la rotura de las conexiones entre células adyacentes [Frenkel, 2000 #1930]. La cavitación parece ser la responsable

de la entrada del ADN en las células [Liu, 1998 #2069; Wyber, 1997 #2068; Frenkel, 1999 #1945; Greenleaf, 1998 #2077]. Por ejemplo, utilizando 0.4-0.6 W $cm^2$ a 40 KHz durante 6-24 s se ha conseguido introducir ADN en las células de las aletas de las truchas [Fernandez-Alonso, 2000 #2074; Fernandez-Alonso, 2001 #2039]. La perforación del espacio intercelular en tejidos requiere mayores intensidades (2.2 W $cm^2$ a 3.000 KHz durante 30 a 90 s) [Frenkel, 2000 #1930]. Sin embargo, la comparación de los distintos trabajos es difícil debido a la influencia desconocida que tienen las numerosas variables que intervienen (frecuencia, intensidad, duración, geometría, etc) y a los pocos estudios dedicados a examinar sistemáticamente los efectos de dichas variables [Wyber, 1997 #2068].

Los plásmidos sufren pocas alteraciones con el proceso de sonicación [Fernandez-Alonso, 2000 #2074 ; Wyber, 1997 #2068] y quedan protegidos contra dichas alteraciones cuando se acomplejan con liposomas [Wasan, 1996 #2072]. Aunque la combinación de la sonicación con liposomas aumenta unas 7 veces la eficiencia de la transfección celular [Lawrie, 1999 #2070; Unger, 1997 #2078], no se han publicado muchos trabajos sobre este tema.

**1.6.6. Electroporación para translocar la membrana plasmática.** Las variables físicas en la transferencia de ADN a las células por electroporación [Hama-Inaba, 1987 #2121; Knutson, 1987 #2122] son: i) la duración del pulso eléctrico T (tiempo, 5-20 msec), que depende de la resistencia del medio (ohmnios, Ω) y de la potencia (Faradays, μF) del condensador ($T = \Omega \cdot \mu F$). La resistencia del medio inversamente proporcional a su concentración iónica ( ~ 20 Ω), depende además del volumen y del espesor de la cubeta usada para la electroporación y ii) la intensidad del campo eléctrico (~ 6.000 V/cm en cubetas de 0.4 cm), que tiene gran influencia en el porcentaje de transfección optimo, generalmente coincidente con un 20-80% de mortalidad celular [Chu, 1987 #2120].

El medio de electroporación afecta a las células y a la entrada del ADN de varias maneras, ya que: su resistencia influye en T que a su vez afecta la supervivencia celular, su osmolaridad afecta la supervivencia celular, su concentración de iones afecta la estabilidad de las membranas

durante el pulso eléctrico y el pulso eléctrico provoca una permeabilización temporal o aparición de poros en la membrana plasmática, que permaneciendo a bajas temperaturas durante varias horas afecta a la supervivencia celular [Rols, 1998 #2128].

La eficiencia de entrada del ADN en la célula también depende de la concentración de ADN (optimo de 1-40 μg/ml), la hipotonicidad del medio [Golzio, 1998 #2127], la presencia de etanol [Golzio, 2001 #2124], DMSO [Melkonyan, 1996 #2129] ó suero [Delteil, 2000 #2125], del número de pulsos y de su duración. Aunque el número de pulsos aumenta proporcionalmente la entrada del ADN en la célula, su duración parece ser el parámetro más importante, ya que sólo cuando los pulsos se aplican durante unos 5 ms se puede detectar dicha entrada [Rols, 1998 #2128].

Una vez que el ADN ha entrado en las células ha de expresarse y para ello tiene que llegar al núcleo. Se ha demostrado que las células de ciclo celular corto (crecimiento rápido) expresan el transgen introducido por electroporación más eficientemente que las de crecimiento lento, probablemente debido a un mayor número de mitosis [Colosimo, 2000 #2126]. El incremento de expresión cuando las células se incuban con colchicina antes de la electroporación, confirma el requerimiento de mitosis (no hay membrana nuclear) para este efecto.

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

**1.6.7. Bombardeo para translocar la membrana plasmática.** Sólo se ha usado el bombardeo con partículas de oro recubiertas de ADN para introducir genes, en tejidos in vivo [Gomez-Chiarri, 1996 #1444; Gomez-Chiarri, 1999 #1931], pero no se ha empleado el bombardeo in vitro ni con complejos ADN-liposoma.

**1.6.8. Control de pH en la ruta endosoma/lisosoma.** Los complejos ADN-liposoma endocitados por las células se procesan utilizando la ruta endosomal. Esta ruta conlleva una posible degradación del ADN por la actuación de enzimas lisosomales que actúan a bajo pH, por lo que los compuestos que promueven la translocación del ADN fuera del endosoma o que controlan el pH del lisosoma, aumentan la eficiencia de la expresión [Morales, 1999 #2150].

En este sentido, el tratamiento de las células con 20-100 μM de cloroquina, un agente lisosomotrópico que evita la disminución de pH del lisosoma, es el método que más se ha usado para aumentar la eficiencia de transfección. Los tratamientos con cloroquina durante y después de la transfección aumentan un 40% la eficiencia de la transfección de complejos de ADN-liposomas [Luthman, 1983 #2096]. La cloroquina también incrementa 1.5 veces la expresión de complejos ARN-peptidos y de ARN-liposomas [Bettinger, 2001 #2148]. Debido a que la exposición a cloroquina por más de 4 h a 10-100 μM causa muerte celular, la sacarosa (5-500 mM), el cloruro amónico (10-40 mM) o la polivinilpirrolidona (0.01 –1 mg/ml), también se han usado como agentes lisosomotrópicos alternativos [Ciftci, 2001 #2145].

Otra alternativa para escapar del endosoma/lisosoma, es la utilización en los liposomas de lípidos que se vuelven fusogénicos solo cuando el pH baja a valores lisosomales [Kono, 2001 #2099; Simoes, 2001 #2144] o lípidos con enlaces SH desestabilizables en el medio reductor de los lisosomas debido a la activación de enzimas específicas [Tang, 1998 #1488].

**1.6.9. Adición de calcio.** El $Ca^{++}$ parece tener 2 efectos sobre la transfección: condensar el ADN cuando se añade antes de la transfección y aumentar su expresión cuando se añade post-transfección. En los primeros métodos utilizados para transfección celular mediante el uso del $Ca^{++}$, solo se empleaba su capacidad de formación de precipitados muy finos de complejos ADN-$Ca^{++}$ sobre las células. Después se ha demostrado que la presencia de $Ca^{++}$ después de la transfección en concentraciones <10 mM, es capaz de aumentar 3-20 veces la eficiencia de expresión de los complejos ADN-liposomas. Este efecto se ha demostrado en 5 líneas celulares y usando 6 formulaciones distintas de lípidos catiónicos [Lam, 2000 #1941]. El efecto es específico pues no depende solamente de las cargas del $Ca^{++}$ puesto que otros iones tales cómo el $Mg^{++}$ o el $Na^{+}$ no lo exhiben y si se inhibe con EGTA (quelante específico del $Ca^{++}$).

Además se ha observado que la inhibición de la transfección por la presencia de suero en el medio de cultivo puede ser contrarrestada por la presencia de 2 mM de $Ca^{++}$ [Haberland, 2000 #2097]. Parece ser que el $Ca^{++}$ no se necesita para la entrada del ADN en la célula y que el suero no

inhibe ni el ligamiento ni el paso de la membrana citoplasmática de los complejos ADN-liposomas pero si el escape del ADN de los endosomas y/o la expresión del ADN [Haberland, 2000 #2097]. Es posible que esta actividad post-transfeccional del $Ca^{++}$ sea debida a su capacidad lisosomotrópica. Al inhibir o reducir el cambio de pH en el endosoma-lisosoma estaría actuando a favor de la transferencia del ADN desde el endosoma al citoplasma [Haberland, 1999 #2154].

**1.6.10. Influencia de la mitosis: ausencia de membrana nuclear.** Sorprendentemente, la mayoría de las células en una monocapa son capaces de internalizar los complejos ADN-liposoma, pero sólo un 20% de ellas exhibe expresión del transgen [Scherman, 1998 #2113]. Puesto que en una monocapa de una línea celular la principal causa de heterogeneidad se debe al estado del ciclo celular de cada célula, es de suponer que el ciclo celular tenga alguna influencia en la expresión del transgen. Confirmando estas observaciones, se ha demostrado que en las células en crecimiento la eficiencia de transfección siempre es superior que en las células en reposo.

Por otra parte, utilizando células sincronizadas por doble bloqueo con timidina (2.5 mM), se demostró que la eficiencia de transfección aumentaba 3-10 veces después de la mitosis [Tseng, 1999 #2095]. Con poblaciones celulares separadas por centrifugación, también se demostró que la actividad mitótica incrementa de 30 a 500 veces la expresión de los complejos ADN-liposomas transfectados [Brunner, 2000 #2158; Mortimer, 1999 #2159]. Células Hela sincronizadas en G1 o en G2/M transfectadas con complejos ADN(GFP)-liposoma demostraron resultados similares mediante análisis por FACS [Tseng, 1999 #2095], confirmados por otros estudios usando células permeabilizadas con digitonina [Escriou, 2001 #2156]. Se supone que en todos estos casos la desaparición de la membrana nuclear durante la mitosis contribuye a una mayor penetración del ADN en el núcleo. Sin embargo, no toda la expresión obtenida es debida a este fenómeno, ya que existen células pre-mitóticas que también expresan el transgen y además nunca se llega al 100% de células con expresión sino a un máximo del 40% [Tseng, 1999 #2095]. La desaparición temporal de la membrana nuclear durante la oogénesis también se ha aprovechado para aumentar la eficiencia de

transfección de genes en oocitos inmaduros utilizando retrovirus como vectores para producir ganado transgénico [Chan, 1998 #2149].

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

El ejemplo más eficaz ha sido el uso de peptidos que incluían secuencias correspondientes a las señales peptídicas de localización nuclear (NLS) del antígeno T de SV40 [Aronsohn, 1997 #2085]. Los complejos formados por interacciones iónicas entre el ADN y los peptidos NLS aumentan la eficiencia de transporte del ADN al núcleo, tanto que la inyección intracitoplasmática de solo 10 moleculas de ADN-NLS (0.06 fg de plásmido) son suficientes para producir peces cebra con un transgen integrado [Liang, 2000 #2112]. El uso de complejos ADN-NLS permite una reducción de $10^5$ veces en las cantidades de ADN necesarias para detectar la transfección [Liang, 2000 #2112; Collas, 1998 #1971; Liang, 2000 #2112]. Estos resultados se confirmaron utilizando ensayos de transporte al núcleo en células permeabilizadas con digitonina [Sebestyen, 1998 #2117]. El ligamento covalente entre NLS y el ADN sin embargo, no causa un aumento de la eficiencia de transfección.

También los complejos melitina-polietilenimina provocan una mejora (~ 4 veces) en el transporte nuclear de las secuencias ADN gracias probablemente a que la melitina posee una secuencia NLS [Ogris, 2001 #2161].

Todavía se conocen poco las secuencias poseedoras de señales similares, que en las secuencias del ADN también favorecen el transporte del ADN al núcleo. Los primeros experimentos se realizaron con secuencias del virus SV40 [Dean, 1997 #2186]. Utilizando células permeabilizadas con 40 μg/ml de digitonina o con núcleos aislados se ha demostrado que la transferencia del ADN al núcleo requiere no sólo proteínas citoplasmáticas sino también secuencias específicas en el ADN [Dean, 1997 #2186; Wilson, 1999 #2185]. Estas secuencias consisten en repeticiones de 72 pares de bases localizadas en el promotor de SV40 [Dean, 1999 #2183; Li, 2001

#2182]. La presencia de estas secuencias de ADN es capaz de aumentar la expresión de transgenes en varios tipos celulares y utilizando varios métodos de transfección (liposomas catiónicos, peptidos, inyección) y además tienen efecto en células que no están en división celular [Vacik, 1999 #2184; Li, 2001 #2182; Dean, 1999 #2160].

**1.6.12. Peptidos quiméricos.** Los peptidos quiméricos combinan diferentes peptidos cortos capaces cada uno de: ligar reversiblemente al ADN, condensarlo, dirigirlo a células específicas, translocar el ADN al citoplasma ó dirigirlo al núcleo celular [Morris, 2000 #2108; Luo, 2000 #2130]. El diseño de peptidos quiméricos puede seguir 2 estrategias: una única secuencia peptídica (varias secuencias de peptidos cortos unidas covalentemente) ó varios peptidos cortos que se autoensamblan no covalentemente entre si.

Los peptidos quiméricos basados en la unión covalente de peptidos de fusión virales y secuencias NLS se han usado con éxito para la transfección. Se han utilizando los peptidos de fusión virales de la hemaglutinina HA del virus de la influenza [Haensler, 1993 #2134], de la pG de VSV [Schuster, 1999 #2142] y de la pG de HIV [Morris, 1997 #2136; Morris, 1999 #2137] (Tabla 3). Varias poliaminas catiónicas de diferentes tamaños y estructuras tales como poli-lisina, poliarginina, espermidina, espermina, temporinas [Rinaldi, 2001 #2162], dendrímeros, protamina, poli-etileneimina [Lemkine, 2001 #2173; Boussif, 1995 #2114; Boussif, 1999 #2153], etc, también se han usado para condensar ADN junto con peptidos NLS [Wyman, 1997 #2139; Niidome, 1997 #2140; Midoux, 1998 #2135].

La polilisina, por ejemplo, es capaz de compactar ADN hasta formar partículas de 100-200nm. Para aumentar su endocitosis y su transferencia a células específicas, la polilisina puede ligarse covalentemente al tripeptido RGD que interacciona con los receptores celulares de las integrinas [Harbottle, 1998 #2132; Colin, 2000 #2133], a anti-CD3 o anti-CD5 para linfocitos T, a la transferrina o a la galactosa para hepatocitos [Wagner, 1998 #2151; Brown, 2000 #2146], etc.

La glicosilación de las aminas de la polilisina y de la polialilamina introduce grupos hidrofílicos que disminuyen su citotoxicidad in vivo y aumentan la eficiencia de transfección in vitro varios órdenes de magnitud.

Otra estrategia consiste en acoplar polilisina a un peptido derivado de un anticuerpo que liga ADN [Avrameas, 1999 #2141].También se han usado anticuerpos anti-citoesqueleto para dirigir los ADN-liposomas al citoplasma demostrándose un incremento en la eficiencia de expresión [Khaw, 2001 #2165].

Se ha descrito una molécula híbrida obtenida mediante ligamiento covalente de un derivado lipídico (dioeloil fosfatidiletanolamina, dioleoil-PE) y un peptido fusogénico derivado del veneno de la abeja (melitina) [Lam, 2001 #2174; Ogris, 2001 #2161]. Este reactivo es insensible a la presencia de suero y forma partículas con una carga positiva entre 50-250 nm. Acomplejado con ADN, la dioleoil-PE-melitina transfecta eficientemente varios tipos celulares [Legendre, 1997 #2103].

Para incrementar la translocación del ADN a través de las membranas lisosomales, se han utilizado peptidos fusogénicos virales que cambian de conformación con la bajada de pH induciendo fusión o lísis de membranas. Otra estrategia importante es el uso de peptidos que incluso a pH neutro son capaces de fusionar con la membrana plasmática tales como el peptido de fusión de la pG de HIV [Morris, 1999 #2137].

También se han usado peptidos asociados no covalentemente por medio de interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas. Por ejemplo, el peptido de influenza (INF) y un peptido condensador palmitoilado [Wilke, 1996 #2138] o el peptido formador de poros (JTS1) y un peptido condensador [Gottschalk, 1996 #2131], etc. Para autoensamblar peptidos y proteínas con el ADN de una manera más controlada, intermedia entre la unión covalente y la no covalente, se ha usado ADN biotinilado y estreptavidina-transferrina [Sato, 2000 #2147].

**1.6.13. Resumen de métodos para aumentar la eficiencia de transfección.** Los complejos ADN-liposomas catiónicos penetran espontáneamente en la mayoría de las células aunque se expresan con desigual eficiencia [Tseng, 1999 #2095]. Dicha penetración puede

aumentarse utilizando métodos mecánicos (ultrasonidos, electroporación, bombardeo, etc) [Lawrie, 1999 #2070; Colosimo, 2000 #2126]. Sin embargo, para aumentar las eficiencias de expresión del 20-50 % al 80-100 %, es necesario que el ADN exógeno atraviese también las membranas del endosoma/lisosoma y la nuclear. Para ello pueden utilizarse:

1. Agentes lisosomotrópicos tales como el cloruro amónico, la cloroquina, la sacarosa o el $Ca^{++}$[Ciftci, 2001 #2145; Lam, 2000 #1941], que disminuyen la estancia en el lisosoma.

2. Lípidos o peptidos que son fusogénicos solo al bajo pH del lisosoma [Kono, 2001 #2099; Simoes, 2001 #2144], que ayudan a escapar del lisosoma.

3. Aumento de mitosis o meiósis. La electroporación, los complejos ADN-liposomas [Tseng, 1999 #2095; Brunner, 2000 #2158; Mortimer, 1999 #2159], la inyección [Chan, 1998 #2149] o la penetración en células permeabilizadas [Escriou, 2001 #2156], requieren la ausencia de las membranas nucleares para una máxima eficiencia de expresión. El uso de secuencias NLS tanto en peptidos [Liang, 2000 #2112] como en el ADN [Dean, 1999 #2160], sin embargo, puede aumentar la eficiencia del transporte al núcleo incluso cuando las células están en reposo [Aronsohn, 1997 #2085].

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

**Tabla 2.**

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

| Membrana | Método | Referencia |
|---|---|---|
| Plasmática | Ultrasonidos | [Lawrie, 1999 #2070] |
| | Electroporación | [Colosimo, 2000 #2126] |
| | peptidos quiméricos | [Morris, 1999 #2137] |
| Endosoma | pH | [Luthman, 1983 #2096] |
| | $Ca^{++}$ | [Lam, 2000 #1941] |
| | peptidos quiméricos | [Haensler, 1993 #2134] |
| Núcleo | Mitosis | [Tseng, 1999 #2095] |
| | NLS | [Aronsohn, 1997 #2085] |
| | peptidos quiméricos | [Ogris, 2001 #2161] |

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

**Tabla 3.**

**Ejemplos de peptidos con actividad condensadora de ADN, endosomolítica, inductores de fusión o promotores de poros.**

| Secuencia | Origen | Referencia |
|---|---|---|
| GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ | melitina | [Ogris, 2001 #2161] |
| GLFEAIAGFIENGWEGMIDGGGC | influenza HA | [Haensler,1993 #2134] |
| KFTIVFPHNQGHWKNVPSNYHYCP | VSV pG | [Schuster, 1999 #2142] |
| GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV | HIV pG | [Morris, 1999 #2137] |
| WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA | GALA | [Haensler, 1993 #2134] |
| GLFEALLELLESLWLLEA | covalente: JTS1 | [Gottschalk,1996 #2131] |
| HHHHHWYG | covalente | [Midoux, 1998 #2135] |
| WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA | covalente | [Wyman, 1997 #2139] |
| $(LARL)_6$ KLLKLLLKLWLKLLKLLL | covalente | [Niidome, 1997 #2140] |
| $(K)_{19}$VAYISRGGVSTYYSDTVKGRFTRQKYNKRA | Ac anti-ADN | [Avrameas, 1999 #2141] |
| palmitoil-SPKRSPKRSPKR + influenza HA | no covalente | [Wilke, 1996 #2138] |
| YKAKKKKKKKKWK + JTS1 | no covalente | [Gottschalk, 1996#2131] |

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

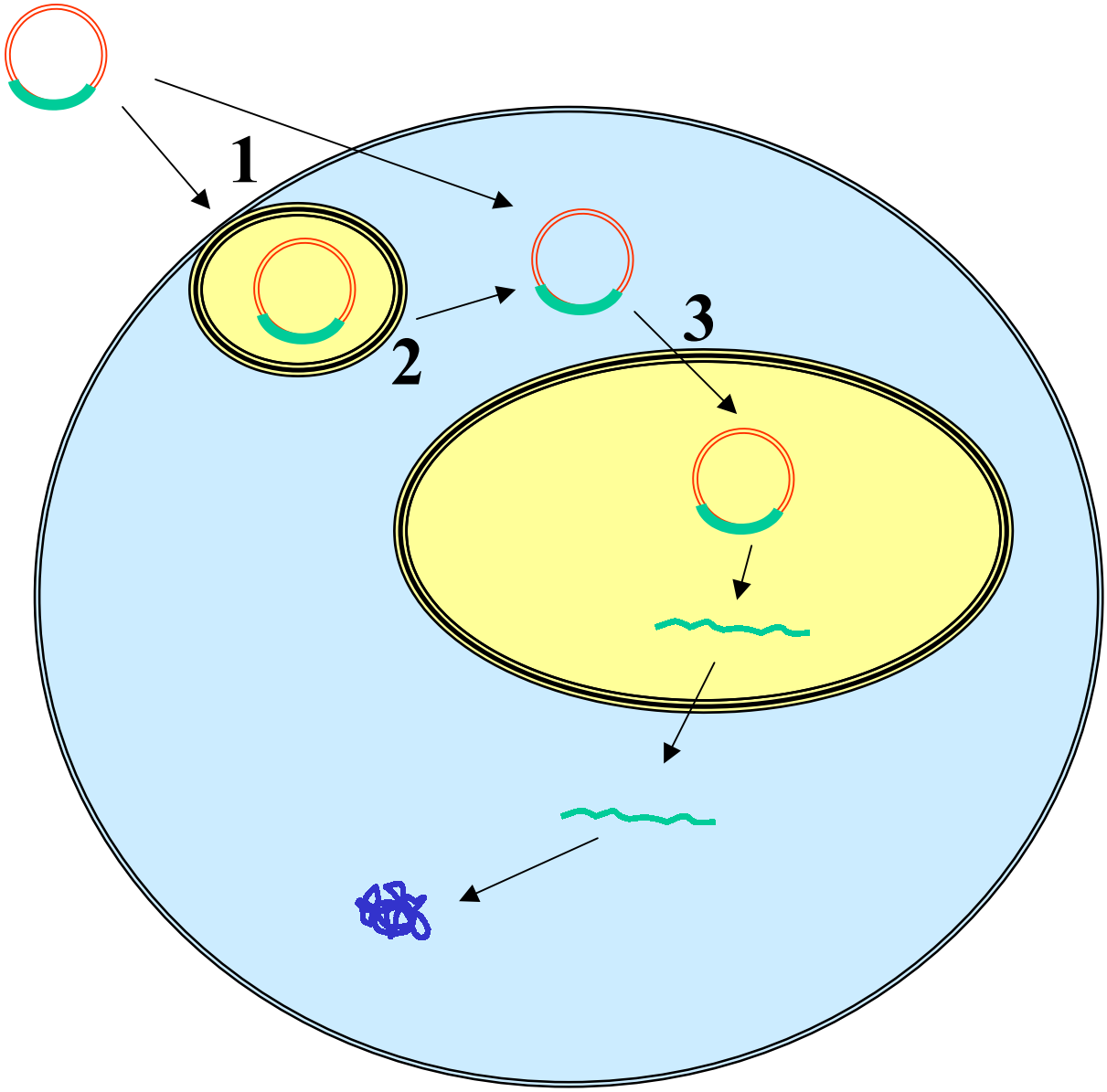



**Figura 4.- Ruta celular de los complejos ADN-liposoma para expresión de sus genes.** Se diseña primero un plásmido que contiene el transgen con promotores, intrones, terminadores y demás elementos de control para células eucarióticas. El plásmido, tiene que penetrar las membranas: plasmática bien a través de la ruta endosoma/lisosoma (**1, 2**) o por fusión directa con ella (**1**) y después la membrana nuclear (**3**). Sólo dentro del núcleo las ARN polimerasas pueden fabricar el ARN mensajero que se traducirá en el citoplasma [Hackett, 2000 #2004].

# 2. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA

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

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

Se ha demostrado en VSHV la existencia de un dominio de ligamiento de fosfolípidos aniónicos entre los aa 82-109 (p2) [Estepa, 1996 #1204; Estepa, 1996 #892]. Por otra parte, aunque aún no existe un consenso generalizado, la posición del peptido de fusión en la pG de VSHV se ha propuesto entre los aa 142-159, por comparación con VSV [Walker, 1999 #2010]. La existencia en VSHV de: un puente disulfuro entre la C110 (contenida en el p2) [Estepa, 1996 #892] y la C152 (contenida en el peptido de fusión) [Einer-Jensen, 1998 #1507] y de mutantes con alteraciones en el pH de fusión localizados alrededor de la C110 [Gaudin, 1999 #1914], sugirió que la región implicada en fusión podría localizarse simultáneamente en el p2 y en el peptido de fusión de VSHV [Gaudin, 1999 #1914]. Por todo ello, se decidió enfocar el estudio a la región que comprende ambos dominios situada entre los aa 56-159.

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

poder estudiar la capacidad de fusión de los mutantes diseñados. Las 2 líneas de investigación concluyeron en los ensayos de fusión en células de pez de los mutantes diseñados en la región seleccionada.

En concreto, se ha trabajado en los siguientes objetivos parciales:

1. Estudios comparativos de las secuencias de los aa 56-159 de la pG de VSHV con otras pertenecientes a otros rabdovirus y a varias cepas de VSHV (GeneBank), para definir las propiedades generales de la región en estudio.
2. Estudio de la interacción con fosfolípidos de segmentos elegidos de la región seleccionada, utilizando peptidos sintéticos (pepscan, p2, p3, p4 y p9) o recombinantes (frg#11) derivados de su secuencia y confirmación de la capacidad inmunogénica de la región elegida.
3. Diseño y obtención de mutantes en peptidos sintéticos y en el gen de la pG
4. Puesta a punto de un ensayo de fusión utilizando células de peces, después de la optimización de la transfección de células EPC.
5. Análisis de la capacidad fusogénica de los mutantes obtenidos.

# 3. MATERIAL Y MÉTODOS

## 3.1. CULTIVOS CELULARES.

**3.1.1 Línea celular EPC.** La línea celular empleada en todos los ensayos fue la *Epithelioma Papullosum Cyprini* (EPC) [Fijan, 1983 #1906] derivada de carpa. Las células EPC se crecieron en medio RPMI-1640 modificado por Dutch con 20 mM Hepes (290 mOsm/Kg), (Flow Ayrshire, Escocia), con 10% de suero fetal bovino (SFB, Seralab, Inbiotech, León, España) y suplementado con 2 mM de glutamina (Flow), 1 mM de piruvato sódico (Flow), 50 µg/ml de gentamicina (Flow) y 1,2 µg/ml de anfotericina (Flow) [Estepa, 1992 #217; Estepa, 1992 #218; Estepa, 1992 #219]. Se utilizaron frascos estériles de plástico de 25, 75 y 150 $cm^2$ de superficie (Costar, Cambridge, MA, USA) y placas de 24, 48 y 96 pocillos (Costar). Las células se crecieron a una temperatura de 28ºC en una atmósfera de 95 % de aire y 5 % de $CO_2$. Una vez obtenidas, las monocapas celulares de EPC, se guardaron en incubadores a 12 ºC hasta su uso [Basurco, 1990 #32; Estepa, 1992 #220]. Para subcultivarlas, las células se despegaron de los frascos con una solución de tripsina-EDTA y se diluyeron con medio fresco al volumen necesario (dilución 1/3 a 1/5) para sembrar nuevos frascos. La mezcla tripsina-EDTA se preparó mezclando 0,25 % de 4 U/mg de tripsina (Serva, Heidelberg, Alemania), 1 g/ml de glucosa (Merck, Alemania), 0,026 % de EDTA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y 0,001 % de rojo fenol (Sigma) en solución salina tamponada con fosfato (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM $HNa_2HPO_4$ y 1,5 mM $H_2KPO_4$, pH 7,4).

**3.1.2. Transfección de células EPC.** Para optimizar la eficiencia de transfección de células EPC se utilizaron plásmidos codificando ßgal o GFP y plásmidos codificando pG para ensayar las propiedades de fusión. Se sembraron 500.000 células EPC por ml en placas de 24 pocillos con 400 µl de medio RPMI-1640 modificado por Dutch con 20 mM de Hepes y suplementado con 10% de suero fetal bovino (crecimiento óptimo a 28-30 ºC). Unas 24 h después se transfectaron con las mezclas ADN-fugene (preincubadas durante 15 min en ausencia de SFB). Después de la transfección, las células se incubaron durante 1 día a 28 ºC para los

ensayos de expresión de ßgal o 2 días a 20 ºC para los ensayos de expresión de la pG de VSHV [Bearzotti, 1992 #1387; Lopez, 2001 #1942; Fernandez-Alonso, 1999 #1882].

Cuando la transfección se realizó por electroporación, se levantaron las células EPC de los frascos de cultivo con tampón fosfato libre de $Mg^{++}$ y $Ca^{++}$ (PBS) conteniendo 0,9 g/l de EDTA. Después de lavarlas con el mismo tampón plasmídico a $2x10^6$ células en 400 µl de PBS se añadieron 10 µg de ADN y se electroporaron en cubetas de 0,2 cm a 0.3 Kv, 960 µF ($\zeta$~ 0,2ms). Las células electroporadas se incubaron en placas de 24 pocillos hasta la realización de los ensayos de detección.

Para los ensayos de transfección con plásmidos dependientes de la polimerasa T7 (por ejemplo, el pGINT7ß bajo el promotor T7), de manera previa a la transfección, las células se infectaron con la cepa de *Vaccinia* VTF7-3, que expresa la polimerasa del fago T7 [Fuerst, 1986 #1511] y se incubaron durante varios tiempos y a distintas temperaturas.

Los agentes lisosomotrópicos como el cloruro de amonio, cloroquina y sacarosa**,** $CaCl_2$, colchicina o timidina se obtuvieron de Sigma (Sigma Che.Co.St.Louis, Mi) y se adicionaron a las monocapas EPC según se indica en cada caso.

**3.1.3 Detección de la expresión de GFP.** Las células transfectadas con plásmidos codificando GFP, se examinaron y fotografiaron con un microscopio Nikon invertido provisto de una lámpara de luz ultravioleta utilizando un filtro azul DM510 B-2ª y una cámara SBIG ST-7 (Santa Bárbara Instrument group, Sta Barbara, CA, USA). Se incluyó un filtro para evitar la fluorescencia inespecífica de infrarrojos (eyeguard for CFWN 10X MB J99000 ND4). Para tomar y procesar las microfotografías se utilizó el programa CCDOPS versión 4.03 (Santa Bárbara Instrument group) [Fernandez-Alonso, 2000 #2074; Fernandez-Alonso, 2001 #2039; Fernandez-Alonso, 1999#1882].

**3.1.4. Detección de la expresión de ßgalactosidasa (ßgal).** Para ensayar la actividad ßgal en las células EPC transfectadas con una maxima sensibilidad, se utilizó el ensayo Gal-screen

(Tropix, Bedford, MA, USA). Después de eliminar el sobrenadante de cultivo que cubría las monocapas de células EPC transfectadas, se añadieron 200 µl de 0.025 % Triton x100 por pocillo y se agitaron las placas durante 15 min para su lisis. Después se añadieron 100 µl por pocillo de una mezcla de substrato y tampón de lisis-enhancer y 60 min más tarde alicuotas de 20 µl se contaron durante 2 s cada una en un aparato MiniLumat LB9506 (EG&G Berthold, Postfach, Germany). En las condiciones usadas en este trabajo, 1 pg de ßgal rendía $4x10^4$ cps [Lopez, 2001 #1942].

**3.1.5. Tinción histológica de ßgal.** Para visualizar la actividad ßgal en las células EPC transfectadas, las monocapas EPC se fijaron durante 5 min con metanol a –20 ºC y se tiñeron con 2 mg/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-ß-D-galactopyranoside (Xgal) en 5 mM ferrocianida II, 5 mM ferrocianida III, 2 mM $MgCl_2$ en PBS. Después de 16 h a 37 ºC, las monocapas se lavaron con agua y se secaron al aire. Para estimar el porcentaje de células teñidas se tomaron 3 fotografías al azar con un microscopio invertido Olympus provisto de una cámara fotográfica digital. Se contaron 700-1000 células por pocillo y los resultados se expresaron en medias y desviaciones estándar de 2 pocillos por experimento [Lopez, 2001 #1942].

**3.1.6. Ensayos de luciferasa**. Para ensayar la luciferasa "firefly" se empleó el kit Bright-Glow. Para ensayar la luciferasa de "renilla" se empleó el kit Dual. Se siguieron las instrucciones del fabricante (Promega, Madrid, España).

**3.1.7. Ensayos de fusión basados en transferencia de energía de fluorescencia**. Para los ensayos de fusión basados en transferencia de energía de fluorescencia se utilizaron liposomas marcados con N-(lisamina rodamina B sulfonil)- fosfatidiletanolamina (R-PE) y N-(7-nitro-2,1,3,-benzoxadiazol-4-il) fosfatidiletanolamina (NBD-PE). Para ello se mezclaron en Cloroformo/Metanol ½, 10 µl de 60 mg/ml de fosfatidilcolina (PC), 10 µl de 30 mg/ml de fosfatidilserina (PS), 10 µl de 1 mg/ml de R-PE y 10 µl de 1 mg/ml de NBD-PE y se llevaron a sequedad en un tubo de vidrio. Después se añadió medio de cultivo RPMI, 10% SFB, tamponado a pH 6 con 20mM HEPES 20mM MES y se sonicó 3 veces durante 1 min cada vez. Para el ensayo se añadieron las mezclas de fosfolípidos sonicadas a las monocapas de células EPC y se

incubaron durante 30 min. El 100 % de la fusión se estimó añadiendo 1 µl de 2% Triton X100. El aumento de fluorescencia se midió excitando a 485 nm y recogiendo la emisión a 535 nm en un fluorímetro GENios (Tecam, Barcelona, España) [Nuñez, 1998 #].

**3.1.8. Ensayos de fusión basados en la activación de la transcripción por T7.** Los ensayos de fusión basados en activación de la transcripción por la polimerasa del fago T7, se realizaron usando 2 poblaciones de células EPC que se diferenciaban en el gen con el que habían sido transfectadas, siguiendo el procedimiento descrito para HIV [Nussbaum, 1994 #1917] y para VNHI [Biacchesi, 2000 #1956; Biacchesi, 2000 #2002; Biacchesi, 2002 #2324; Estepa, 1999 #1903; Biacchesi, 2002 #2393]. Por un lado se transfectaron células EPC con plásmidos que tienen el gen de la ßgal bajo el promotor de la polimerasa T7 (por ejemplo, el pGINT7β). Por otro, se infectaron otras células EPC con *Vaccinia* VTF7-3, que expresa la polimerasa del fago T7 [Fuerst, 1986 #1511] y se transfectaron después con la pG clonada bajo el promotor T7 en el plásmido pGEMTeasy (donada por el Dr.Michel Bremont). La fusión de ambas células se detectó después de mezclarlas por luminiscencia (ver procedimiento anterior). Se utilizaron diferentes protocolos variando las temperaturas de transfección e incubación así como los tiempos.

**3.1.9. Ensayos de formación de sincitios.** En este ensayo la fusión de células transfectadas con pG se estimó valorando la formación de sincitios célula-célula. Se utilizaron las condiciones óptimas de pH, tiempo y temperatura utilizadas para ensayos similares utilizando células EPC infectadas con VSHV [Estepa, 1997 #1284]. Se siguieron también los métodos empleados en VSV para el estudio de mutantes de fusión por transfección con los plásmidos codificando pG mutada [Li, 1993 #571; Zhang, 1994; Shokralla, 1998 #1426; Jeetendra, 2002 #2395].

Para ensayar la fusión célula-célula y/o su inhibición con Acs, las monocapas EPC se sembraron en pocillos de placas de 24 pocillos (500,000 células por pocillo), al día siguiente se transfectaron con 0.6 µg de plásmido G3-pcDNAI/Amp o pMCV1.4-G acomplejados con 2 µl de

fugene en 100 µl de volumen siguiendo los métodos descritos con anterioridad [Fernandez-Alonso, 1999 #1882; Lopez, 2001 #1942; Rocha, 2002 #2038]. En placas paralelas, los anticuerpos se diluyeron en medio RPMI-1640 (sin bicarbonato) tamponado con 20 mM de HEPES y 20 mM MES (Sigma, Che. Co., St.Louis, Missouri) a pH 6 e incubados 16 h a 4 ºC. Al día siguiente las placas de las EPC transfectadas se lavaron y en el caso del ensayo de inhibición de la fusión se adicionaron las diluciones seriadas de los anticuerpos. Después de 30 min de incubación a pH 6, los cultivos se lavaron y se incubaron durante 2 h a 14 ºC con RPMI-1640 (sin bicarbonato) tamponado con 20 mM de HEPES y 20 mM MES a pH 7.6. Después del paso final de lavado, las monocapas de células EPC se fijaron con metanol frío, se secaron y se tiñeron con Giemsa filtrado. El número de núcleos en sincitios de más de 3 núcleos por sincitio se contaron en 400 células por pocillo y los resultados se expresaron como porcentaje de núcleos en sincitios según la formula, número de núcleos en sincitios / número total de núcleos x 100. Los títulos de inhibición de la fusión se definieron como el inverso de la dilución a la que el número de núcleos en sincitios se reducía al 50% del inicial.

### 3.2. INMUNOENSAYOS.

**3.2.1. Enzimoinmunoensayos (ELISA).** Estos ensayos se utilizaron para la caracterización de los Acs utilizados en este trabajo, para el estudio de las conformaciones del frg#11 y para el estudio de la expresión de membrana de los mutantes de pG. Para realizar los inmunoensayos, se tapizaron placas de poliestireno de 96 pocillos (Dynatech, Plochingen, Germany) con 1 µg/pocillo de peptidos, proteínas recombinantes o VSHV (100 µl/pocillo en agua Sigma) y se secaron manteniéndolas a 37ºC durante toda una noche. Previamente a su uso, las placas tapizadas se bloquearon con 100 µl/pocillo de tampón de dilución (130 mM NaCl, 2 mM KCl, 8 mM $Na_2HOP_4$, 1,4 mM $KH_2OP_4$, 0,24 mM mertiolato, 5 g/l seroalbúmina bovina, 0,3% suero de conejo, 0,5 g/l Tween-20, 50 mg/l rojo fenol, pH 6,8) diluído a 1/20 en agua destilada [Sanz, 1992 #819; Sanz, 1992 #1743]. A continuación, se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min con 100 µl/pocillo de los Ac utilizados diluídos en tampón de dilución.

Se lavaron las placas una vez por inmersión en agua desionizada y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de Acs anti-Igs de ratón obtenidos en conejo y conjugados con peroxidasa (Sigma) diluídos 1/500 en tampón de dilución. Se lavaron las placas tres veces y se revelaron añadiendo 50 µl/pocillo de orto-fenilendiamina 1 mg/ml (OPD, Dakopatts, Denmark) disueltas en tampón sustrato (150 mM citrato sódico, 3 mM $H_2O_2$, 0,24 mM mertiolato, pH 4,8) [Coll, 1989 #125] dejando el desarrollo de color durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se frenó la reacción con 50 µl/pocillo 2 M $H_2SO_4$ y se leyó la absorbancia de las placas en un Titertek Multiskan RC a 492 y a 620 nm. La $A_{620nm}$ se utilizó para corregir diferencias individuales de absorbancia entre pocillos. Los resultados se expresaron como $A_{492}$-$A_{620nm}$ [Martinez, 1987 #637; Martinez, 1988 #336].

Para confirmar la identidad del frg#11 se utilizaron AcP en ascitis de ratón obtenidos por inmunización contra la pG de VSHV purificada por cromatografía de afinidad sobre Concanavalina A [Estepa, 1996 #1204; Perez, 1998 #1382]. Se utilizaron Ac anti-G (5 µg/ml) en tampón de diluciones.

El reconocimiento de los segmentos de pG por los correspondientes Acs se llevó a cabo en pocillos tapizados con VSHV (0.5 o 1.5 µg de proteina viral / ml) en 0.1 M de tampón fosfato-citrato a pH 7.6 y 6. Los ascitis de ratón conteniendo Acs anti-p2, p3, p4 y frg#11 se diluyeron 100-300 veces (para obtener una absorbancia maxima de 1.5-2 unidades) en tampón de diluciones a diferentes pH y se incubaron durante 1 h. Los fondos obtenidos en pocillos recubiertos con BSA e incubados con los mismos Ac a las mismas diluciones o en pocillos recubiertos con VSHV e incubados con Acs irrelevantes se estimaron entre 0.1 - 0.6 unidades de absorbancia. La absorbancia relativa se calculó según la formula, absorbancia a pH 5.6 / absorbancia a pH 7.6 x 100.

Para ensayar Acs anti-pG en suero de trucha, se utilizaron pocillos de placas de 96 pocillos (Dynatech, Plochingen, W.Germany) recubiertas con 2 µg de G4 o frg#11 por pocillo en 100 µl de agua destilada por desecación a 37 ºC. Para reducir el fondo, los pocillos se bloquearon por incubación a 4 ºC con 100 µl por pocillo de tampón de diluciones y se lavaron inmediatamente

antes del ELISA. Los antisueros de trucha se diluyeron serialmente de 30 a 810 veces en tampón de diluciones. Se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente con 100 µl/pocillo en suero de trucha diluido. Después del lavado, se incubaron durante 30 min con el AcM 1G7 anti-IgM de trucha [Sanchez, 1991 #426].

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

Las proteínas ya separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad) en cubeta húmeda durante 3 h a 250 mA en tampón de transferencia (25 mM Tris base pH 8,6, 192 mM glicina y 20% Metanol). Los filtros con las proteínas transferidas se cortaron en tiras y se procedió a la inmunodetección. Para ello, las tiras se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS, 2% de leche desnatada Molico, 0,05% de Tween-20, 4% de extracto *E. coli*, 0,3% de suero de conejo) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron 1 h los Acs diluídos 1/200 en tampón de bloqueo. Se lavaron por inmersión en $H_2O$ tres veces 5 min y se incubaron con Acs de conejo anti-Igs de ratón conjugados con peroxidasa durante 30 min. Tras los últimos lavados, se procedió al revelado utilizando el kit comercial ECL de luminiscencia (Amersham, Arlington Heights, IL).

**3.2.3. Microensayos de neutralización de VSHV.** Este ensayo se utilizó para titular los Ac anti-VSHV obtenidos para caracterizar los ensayos de formación de sincitios. Para realizar este ensayo, se incubaron durante toda la noche a 4ºC $10^3$ $DICT_{50}$/ml de VSHV 07.71 con diluciones seriadas de los Acs en placas Costar de 96 pocillos (200 µl/pocillo) [Lorenzo, 1996

#833]. Al día siguiente, se añadieron 100 µl de las diferentes mezclas de dilución de sueros/virus a cultivos de células EPC en placas de 96 pocillos y se mantuvieron en adsorción durante 2 h a 14ºC con agitación suave cada 15 min. Después de retirar la mezcla, las células se lavaron suavemente para evitar que se levantara el tapiz, con medio RPMI-1640 modificado por Dutch con 2% de suero fetal bovino, después se añadió 100 µl/pocillo de medio de cultivo celular fresco y se incubaron las placas durante toda la noche a 14ºC. Las monocapas de EPC infectadas se fijaron con metanol frío (100 µl/pocillo) durante 10 min. A continuación, se realizó el inmunoensayo. Para ello, las células fijadas se incubaron con el AcM 2C9 [Sanz, 1992 #819; Sanz, 1992 #1743] que reconoce la nucleoproteína N del VSHV (proteína mayoritaria del virus) diluído (1/200) en tampón de dilución de ELISA durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar con $H_2O$ desionizada, se incubaron con 100 µL de Acs de conejo anti-Igs de ratón conjugados con peroxidasa (Sigma) durante 30 min. Después de tres lavados, las placas se revelaron añadiendo 100 µl/pocillo de diaminobenzidina (DAB, Sigma) conservada a -70 ºC recién disuelta en 10 ml PBS pH 6,5, 8 mg DAB y 10 µl $H_2O_2$ (Panreac). Se dejó proceder la reacción hasta que se detectaron focos de color marrón (desde pocos minutos a 1 h) al microscopio invertido. Una vez lavada y secada la placa, los focos marrones (positivos a DAB) se contaron con un microscopio invertido provisto de un ocular 10x con cuadrícula. Los resultados se expresaron según la fórmula: número de focos positivos en presencia de Ac/número de focos en ausencia de Ac x 100. El título de neutralización se definió como la inversa de la última dilución en la que se observan el número focos que se obtienen en los controles sin virus (1-2 por pocillo).

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

Para el ensayo de la expresión de pG en la superficie de las células EPC transfectadas con G3-pcDNAI/Amp o pMCV1.4-G, las monocapas de células EPC se incubaron 1 h con AcMs o AcP

de conejo anti-pG (donado por el Dr. Niels Lorenzen, Denmark), en tampón FACS (0,13 M NaCl, 2,7 ,KCl, 10 mM $Na_2HPO_4$, 1,7 mM $KH_2PO_4$, 0,1% seroalbúmina bovina, 0,01% $N_3Na$ y 5 mM EDTA, pH 7,4) que contenía 2% suero de conejo y 2% suero de cabra. Después de lavar con tampón FACS, las células se incubaron 30 min con anti suero de cabra anti- Fab'2 de ratón fluorescente (Caltag, S.Francisco, CA, USA) y se levantaron de la monocapa con PBS sin $Ca^{++}$ ni $Mg^{++}$. En el mismo día de la tinción, 5000 células se analizaron por citometría de flujo en un aparato Beckton-Dickinson (S. José, CA, USA) FACScan usando el programa LYSYS II para el análisis. La señal de fluorescencia se capturó en la región FL1 a 514-545 nm [Fernandez-Alonso, 1999 #1882; Fernandez-Alonso, 2000 #2074]. Para el ensayo de la expresión de pG en el citoplasma de las células EPC transfectadas con pMCV1.4-G se permeabilizaron las células con FACS™ permeabilizing solution 2 perm2 (BD-Biosciences, Becton Dickinson, España), antes de proceder a la tinción con Acs y a su observación en un microscopio de fluorescencia.

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

**3.2.5. Obtención de anticuerpos policlonales (AcP) en ascitis de ratón.** Se utilizó este método para obtener ascitis de ratón conteniendo AcP anti- frg#11, p2, p3, p4 o pG. Varios ratones hembras BALB/c en grupos de 3, se inmunizaron por inyección de 20 µg de frg#11, p2, p3, p4 o pG [Perez, 1998 #1382] en adjuvante completo de Freund's y después por 4 inyecciones mensuales con adjuvante incompleto de Freund's. El VSHV se inyectó también en saponina. Para ello 30 µg de VSHV concentrado se sonicaron en presencia de 30 µg de saponin (Superfos, Quil A), 600 µg de colesterol y 6 µg de fosfatidilcolina [Larsson, 1993 #921; Morein, 1984 #1492] en 1 ml de agua destilada. Para obtener líquido ascítico de ratón conteniendo los Acs, los ratones inmunizados se inyectaron i.p. con 0.5- $2x10^6$ mielomas X63/Ag8653 tal y como se describió anteriormente [Coll,

1989 #643]. Para obtener unos 40 ml de ascitis se inyectó a los ratones PBS. El ascitis se recogió y mezcló pasándose después de centrifugar por una columna de 3 x 10 cm de Sepharose (Pharmacia) con extracto de E.coli (~10 mg/ml) y suero de conejo (~10 mg/ml) para absorber Acs de fondo. Los ascitis se concentraron unas 10 veces con 40% se sulfato amónico y se dializaron frente a PBS (10 mM fosfato sódico, 150 mM NaCl, pH 7.2 ). Por PAGE se detectaron 2 bandas positivas al Coomassie de 50 y 24 KDa.

**3.2.6. Obtención de AcP en trucha**. Se utilizó este método para obtener Acs anti-VSHV en trucha para caracterizar la formación de sincitios y la expresión en membrana de mutantes de la pG. Las truchas de 200-500 g de peso corporal, se mantuvieron en acuarios de 100 l a 12º-18 ºC. Se inmunizaron en 2 grupos.

Un grupo, truchas 1 y 2 se inmunizaron con VSHV + pG en Freund's. Las truchas se inyectaron i.p. 4 veces durante 3 meses. A cada trucha se le inyectó 30 µg de VSHV sometido a 37 ºC 30 min + 30 µg de pG diluidos 1:1 con adjuvante completo de Freund`s y después con adjuvante incompleto de Freund's. Los títulos de neutralización obtenidos en el suero de las truchas 2 meses después de la última inyección fueron de ~ 100.

En otro grupo las truchas 3 y 4 se inmunizaron con VSHV en saponina. VSHV (30 µg) se sonicó en presencia de 30 µg de saponin (Superfos, Quil A), 600 µg de colesterol y 6 µg de fosfatidilcolina [Larsson, 1993 #921; Morein, 1984 #1492] en 1 ml de agua destilada. Un ml de esta mezcla se inyectó a las truchas i.p. 4 veces durante 3 meses. Los títulos de neutralización obtenidos en el suero de las truchas 2 meses después de la última inyección fueron de ~ 2000.

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

Como suero de trucha control se utilizaron 15 sueros procedentes de truchas sanas no infectadas de 500 g de peso de una granja cerrada sin historias de infecciones previas (Escuela de Montes, Madrid, España).

El plásmido G3-pcDNAI/Amp que codifica el gen de la pG de VSHV [Fernandez-Alonso, 1999 #1882] se usó para inducir Acs anti-pG en truchas de 10 cm de largo. Para imunizar las truchas 10 µg de plásmido se sonicaron con 5-10 truchas de 20-50 g de peso corporal en 200 ml de agua según se describe en detalle en trabajos anteriores [Fernandez-Alonso, 2000 #2074; Fernandez-Alonso, 2001 #2039]. El suero se extrajo de las truchas 1 mes después de la inmunización.

Para generar truchas resistentes a la infección de VSHV, unas 400 truchitas de 0.5-2 g se infectaron por inmersión en VSHV 07.71 [Basurco, 1991 #35]. Las truchas que sobrevivieron a la infección después de 3 meses se sometieron a una nueva infección de VSHV 07.71. Después de 1 mes las truchas supervivientes no mostraron signos de VHS. Se extrajo suero de las truchas 2-4 meses después de la segunda infección (100-200 g por trucha).

## 3.3 BIOLOGÍA MOLECULAR

**3.3.1. Virus de la Septicemia Hemorrágica Vírica (VSHV).** La cepa del virus de la septicemia hemorrágica vírica (VSHV) empleada es el aislado francés VSHV-07.71 [Bernard, 1983 #778; DeKinkelin, 1979 #153; LeBerre, 1977 #314] que se obtuvo de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).

La producción y titulación de virus se realizó según la descrita por DeKinkelin [DeKinkelin, 1979 #153]. Retirando previamente el medio utilizado para crecer las células, se infectaron monocapas de EPC con VSHV en medio con 2% de SFB, a baja multiplicidad de infección (m.o.i. = $10^{-2}$-$10^{-4}$). Las células se mantuvieron en adsorción con el virus durante 1 h a 14ºC con agitación suave cada 15 min y se rellenaron los frascos con medio con 2% de SFB, hasta la lisis completa del tapiz celular (10-14 días). Los inóculos para neutralización se obtuvieron separando los restos celulares del sobrenadante por congelación y descongelación y posterior centrifugación a 3.000 rpm, recuperación del sobrenadante y congelación a –70ºC.

En cuanto a la purificación del virus, la metodología seguida es básicamente la descrita por DeKinkelin [DeKinkelin, 1972 #143] y modificada por Basurco [Basurco, 1990 #32]. Después de descartar por centrifugación los restos celulares de cultivos de EPC infectados, se

precipitó el virus con politilenglicol 6000 (PEG-6.000) al 7% en ClNa al 2,3% a 4ºC y en agitación durante 2 h. Después de centrifugar a 10.000 g durante 45 min se resuspendió el sedimento en 1-2 ml de TNE (0,15 M Tris, 0,15 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,6). Para aumentar la pureza, se ultracentrifugó el virus a través de un gradiente de sacarosa 15-45% en TNE a 80.000 g durante 270 min en una ultracentrífuga Beckman 25-75 con rotor SW27. La estimación de la cantidad de proteína se realizó por medida de $A_{280nm}$ ($\in$ = 1,4) o por tinción con azul de Coomassie y comparación con patrones conocidos, considerado el límite de detección 1 µg por banda de proteína detectada.

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

Para los ensayos de fusión utilizando transcripción por la polimerasa T7 del fago correspondiente, se utilizaron: el pGINT7β (15 Kpb) [Nussbaum, 1994 #1917], el pcADN3.1/HisB/LacZ (8.6 Kpb) (InVitroGen), los pT7EMNLSlacZ (9.4 Kbp) y pE1T7R (9.6 Kpb) [Verri, 1997 #1892], el pCMV-T7p (Dra. Heike, Reims) y el vaccinia T7 (Dr.Blasco) que contienen el gen lacZ bajo el promotor de la polimerasa del fago T7.

Otros promotores se ensayaron con ßgal tales como el de SV40 (pßgal ctrl de Clontech) y el de músculo de carpa (GpcADN3-FG2 de Qiagen).

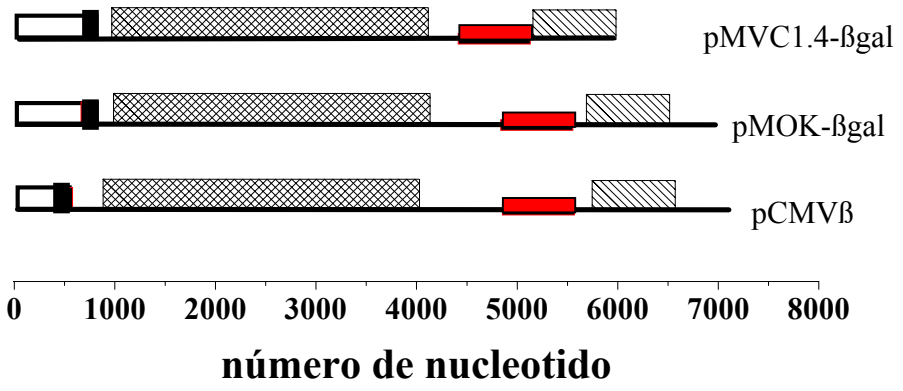
Como genes marcadores alternativos se ensayaron la proteina verde fluorescente (GFP) y la luciferasa (Luc). El gen de la GFP se utilizó clonado bajo el promotor CMV en el plásmido GFP-pQBI$_{25}$ (6, 2 Kpb) (Quantum Biotech Inc, Montrevil-sous-bois, France) o bajo el promotor de actina de carpa pGFPQBI$_{25}$-pAE6 que contienen el gen de la proteína verde fluorescente (GFP). El gen Luc se utilizó clonado bajo el promotor CMV utilizando los plásmidos comerciales pGL3ctrl, pRL-CMV y pRLnull de Promega y el pCMV-Luc donado por el Dr. Bremont (INRA).

Para la generación de la construcción G3-pcDNAI/Amp, se partió de la construcción G-pcDNAI (Dr. Michel Brémont, INRA, Francia), que contiene el gen de la pG de VSHV (aislado francés 07.71) clonado en el vector pcDNAI (4,0 Kpb) (Invitrogen) y se subclonó en el vector comercial pcDNAI/Amp (4,8 Kpb) (Invitrogen) [Fernandez-Alonso, 1999 #1882]. Además se subclonó bajo el promotor de músculo de carpa (G-pcDNAI/Amp), de actina de capa (G-pAE6 donado por la Dra.Estepa, UMH) y de T7 (G-pGEMTeasy donado por el Dr. Bremont, INRA).

**Tabla 4**
**Principales plásmidos que se han utilizado en el trabajo:**

| Expresión: | Vector | Kpb | Promotor | marcador | Obtención |
|---|---|---|---|---|---|
| **ßgal/GFP** | pCMVß | 7.2 | CMVcorto | ßgal | Clontech |
| | pßgalctrl | 7.9 | SV40 | ßgal | Clontech |
| | pGFPQBI$_{25}$[1] | 6.2 | CMVcorto | GFP | QuantumBiotech |
| | pßactin-lacZ[2] | 7.3 | ßactina carpa | ßgal | McLean |
| | pMOKß | 7.0 | CMV | ßgal | ReadyVector |
| | pMCV1.4ß | 6.5 | CMV | ßgal | ReadyVector |
| | pMIDGEß | 4.4 | CMV | ßgal | ReadyVector |
| **Luciferasa** | pCMV-Luc[3] | 6.8 | CMV | Luc | INRA |
| | pGL3ctrl | 5.2 | SV40 | Luc | Promega |
| | pRL-CMV | 4.0 | CMV | r.Luc | Promega |
| | pRLnull | 3.3 | T7 | r.Luc | Promega |
| **G de VSHV** | G-pcADN3-CMV | 7.0 | CMVcorto | G | Qiagen |
| | G-pcADN3-FG2[4] | 7.0 | Musculo de pez | G | Qiagen |
| | G3-pcDNAI/Amp | 6.3 | CMVcorto | G | INIA |
| | G-pGEMTeasy | 4.5 | T7 | G | INRA |
| **Inducibles T7** | pGINT7ßgal[5] | 15 | T7 | ßgal | INIA Dr.Blasco |
| | pcADN3.1/HisB/lacZ | 8.6 | T7 | ßgal | InVitroGen |
| | pT7EMNLSlacZ[6] | 9.4 | T7 | ßgal | Univ.Padua |
| | pE1T7R[6] | 9.6 | CMVcorto | T7polim | Univ.Padua |
| | pCMV-T7p[7] | 7.5 | CMVcorto | T7polim | Riems |
| | VacciniaT7[8] | -- | Vaccinia | T7polim | INIA Dr.Blasco |
| **Promotor Pez** | pGFPQBI25[9] | 6.4 | Actina carpa | GFP | UMH |
| | G-pcADN3-FG2[4] | 7.0 | Musculo de pez | G | Qiagen |

1. Dr.Blasco (INIA, Madrid, España)
2. Dr.McLean (Univ. Southampton, England)
3. Dr.M. Bremont (INRA, Paris Jouy-enJosas)
4. Qiagen (Germany, no publicado)
5. Dr.Blasco, INIA [Nussbaum, 1994 #1917]
6. Dra.Tomamin, Univ.Padua [Verri, 1997 #1892]
7. Dra.Heike, Reims (no publicado)
8. Dr.Blasco (INIA, Madrid, España)
9. Dra.Estepa (UMH, Elche, España)




**Esquema de los mapas de pMCV1.4ßgal, pMOKßal y pCMVß .** ■, promotor mínimo del CMV . □, regiones 5'. ⊠, gen de la ßgal gene. ◫, gen de resistencia a antibióticos. , regiones de plásmidos bacterianos comunes.

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

**3.3.4. Subclonajes del plásmido pGEMTeasy-G al plásmido pMCV1.4.** Para llevar a cabo la puesta a punto de los ensayos de fusión basados en fluorescencia o en formación de sincitios, la colección de mutantes de pG obtenida en pGEMTeasy hubo de subclonarse en el plásmido pMCV1.4, que era el que se expresaba con mejor eficencia en EPC. Para ello, se obtuvo el gen pG mediante una digestión preparativa a partir de 2 µg de la construcción pGEMTeasy-G (Dr.M. Bremont, INRA) con *EcoRI* (10 U/µl) (GibcoBRL, Postfach, Germany), ya que la G está clonada entre dos sitios *EcoRI*, durante 2 h a 37ºC en un aparato Techne dri-block. De igual manera se linearizó el pMCV1.4 (Ready Vector). Para disminuir su religación, primero se inactivó la *EcoRI* del plásmido digerido pMCV1.4 a 65 ºC 15 min y después se añadió fosfatasa alcalina SAP (Roche, Barcelona, España). La mezcla se incubó a 37 ºC 60 min

y después se inactivó la fosfatasa a 65 ºC 15 min. Los productos de las digestiones se separaron en un gel de agarosa LMP al 1% [Sambrook, 1989 #1510], recuperando y purificando las bandas obtenidas con columnas del kit comercial SNAP (InVitroGen, Barcelona, España). Se realizó la ligación del plásmido y el inserto pG (razón plásmido:inserto 1:5, incluyendo controles sin inserto), a temperatura ambiente durante 2 h utilizando la T4 ADN ligasa (Roche) en un volumen final de 20 µl por mezcla de ligación por mutante. Los 20 µl de mezclas ligadas se pipetearon en pocillos de placas de 96 pocillos provistas de filtros MF en su fondo (Millipore, Madrid, España) y se dializaron durante 45 min poniendo las placas a flotar sobre agua destilada. Después se transformaron por electroporación 10 µl de bacterias electrocompetentes *E. coli* Top 10 (InVitroGen, Barcelona, España) con 2 µl de mezcla de ligación dializada en cubetas de 0,1 cm (Biorad) a 1,8 Kv en un aparato Eppendorf 2510. Después de la transformación se añadieron 0.3 ml de medio TB (de Sigma con 8 ml de glicerol por l, pH 7,5) y se incubaron las bacterias a 37ºC durante 30 min en un incubador con agitación. Se sembraron 200 µl por placa en placas Petri de 9 cm de diámetro de TB-Kanamicina (100 µg/ml) y se incubaron a 37ºC durante toda la noche.

La extracción del ADN plasmídico se realizó por el método del CTAB a partir de 6 colonias transformadas por mutante y de una colonia del control de ligación. Para ello, se incubaron cultivos de 2 ml de medio TB-Ampicilina (100 µg/ml) con las colonias en tubos de 13 ml (Starstedt, Inc., Newton, USA) a 37ºC con agitación durante la noche. Se recuperó el precipitado bacteriano por centrifugación a 12.000 rpm durante 10 s y se sometió a lisis con solución STET (50 mM Tris-ClH pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 8% sacarosa, 0.1% TritonX100) y lisozima (1 mg/ml) durante 2 min a temperatura ambiente y durante 45 s en un bloque térmico a 100ºC. Se centrifugó después a 12.000 rpm durante 8 min y se recuperó el sobrenadante, que se trató con ARNasa (50 µg/ml) durante 30 min a 37ºC. Se trató el ADN durante 5 min a temperatura ambiente con una solución al 5% de CTAB (Sigma) (0.2% final), previamente solubilizado y se centrifugó a 12.000 rpm 10 min. El precipitado recuperado se disoció del

CTAB con etanol 100% y ClNa 5 M a –70ºC durante 20 min y se lavó con etanol 70% frío. Se resuspendió el precipitado en $H_2O$ destilada estéril (Sigma).

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

**3.3.5. Clonaje del frg#11.** La secuencia correspondiente al aa 56-110 de la pG de VSHV 07.71 [Thiry, 1991 #462] se amplificó por PCR del cADN obtenido de su ARN en proyectos anteriores en este laboratorio [Estepa, 1999 #1552]. La preparación en cantidad del frg#11 y su caracterización se describieron en detalle en una publicación [Rocha, 2002 #2401]. Brevemente, la secuencia mencionada arriba se clonó en el plásmido pRSETA plasmid (Invitrogen, S.Diego,Ca), en E.coli DH5α y se expresó en E.coli BL21 DE3. Las secuencias correspondientes a los aa 56-110 estaban presentes en el plásmido recombinante como se demostró por secuenciación del inserto en las 2 direcciones. Para su expresión, se añadió IPTG y los lisados de bacterias en tampón de lisis (20 mM $Na_2HPO_4$, 0.5 M NaCl, 6 M guanidina HCl, pH 7.8) se eluyeron de una columna de afinidad de Ni (ProBond$^{TM}$, Invitrogen) con pH 4 y se purificaron después por cromatografía en Sefadex.

**3.3.6. Expresión del frg#11 recombinante.** Para expresar el frg#11 clonado en E.coli DH5α , se transformaron E.coli BL21 DE3 con el plásmido pRSETA-frg#11. Las bacterias se crecieron en 1l de LB con ampicilina a 37 ºC. Cuando el cultivo alcanzó una DO a 600nm de 0.7, la temperatura se bajó a 28ºC y se añadieron 100 mM IPTG para inducir la expresión del frg#11. Las bacterias crecieron durante 6 h más antes de añadir de nuevo 100 mM IPTG y de mantener el cultivo

16 h más a 28ºC. El procedimiento se aumentó de escala a 15 l con la ayuda de un fermentador (Inbiotec, León, España). Finalmente, las células se centrifugaron y se lisaron con 30 ml de tampón de lisis (20 mM $Na_2HPO_4$, 0.5 M NaCl, 6 M guanidinio HCl, pH 7.8). El lisado se sometió a 25 ciclos de sonicación a 300 W y luego se centrifugó a 20.000 g 30 min. El sobrenadante se aplicó a una columna de afinidad de Ni (ProBond$^{TM}$, Invitrogen) equilibrada con tampón de ligamiento (20 mM $NaH_2PO_4$, 0.5 M NaCl, 8 M urea, pH7.8). Se lavó con tampón de lavado a pH 6 según instrucciones del fabricante y se eluyó con tampón de elución a pH 4. La concentración de las proteinas eluidas se siguió por absorbancia a 280 nm. Las fracciones del pico de absorbancia se mezclaron y se dializaron en 20 mM Tris a pH 4 para aumentar la solubilidad del frg#11. Para aumentar la pureza de las fracciones eluidas separándolas de componentes de alto peso molecular, se cromatografiaron por una columna de Sephadex G-100 en 20 mM Tris pH 4. Las concentraciones y su pureza se determinaron por absorbancia a 590 nm después de añadirlas el reactivo Bradford (BioRad) y por densitometría de las bandas obtenidas después de la tinción con azul de Coomassie de los geles PAGE del frg#11 y de curvas a varias concentraciones de BSA.

**3.3.7. Caracterización por PCR y secuenciación del frg#11.** Para la caracterización preliminar de las construcciónes se utilizó la secuencia publicada del gen de 1,58 Kpb de la pG que contenía la construcción de partida G-pcDNAI y pGEMTeasy-G [Thiry, 1991 #462; Thiry, 1991 #463]. Se diseñaron 4 oligonucleótidos con el objeto de amplificar dos fragmentos solapados en la zona del frg#11 del gen de pG (nucleótidos, nt 13 a 339 y nt 184 a 1.536 de la secuencia de pG). La secuencia de los oligonucleótidos en sentido 5'→3' fue la siguiente:

#59 (ida): ATGGAATGGAACACTTTTTTCTTGGTG;

#60 (vuelta): GGTGAGCTCGATAAGTCACTCTGTGCAG;

#61 (ida): CGACCAGCTCAACTCAGGTGTCCTCAT;

#62 (vuelta): TCAGACCGTCTGACTTCTGGAGAACTG.

Se calculó el $T_M$ de forma manual y mediante el programa PCGene. El tamaño esperado de los fragmentos amplificados era de 327 (oligos #59 y #60, nt 13 a 339 de la secuencia de G) y de

1.353 (oligos #61 y #62, nt 184 a 1.536 de la secuencia de G) pares de bases. Se realizaron amplificaciones PCR con cada una de las dos parejas de oligonucleótidos (#59-#60 y #61-#62) y las dos construcciones con el gen G, la de partida G-pcDNAI y la subclonada G3-pcDNAI/Amp, incluyéndose controles negativos sin ADN y con el plásmido comercial utilizado en el subclonaje (pcDNAI/Amp). Se utilizó la AmpliTaq ADN Polymerase (Perkin-Elmer, Bucks, Inglaterra). Se mezclaron para la reacción 5 U de Ampli Taq, 200 ng de cada uno de los oligonucleótidos de las parejas correspondientes, 10 ng de ADN plasmídico, el tampón correspondiente, en presencia de 2 mM de $MgCl_2$ y de 0,2 mM de una mezcla de dNTPs (Promega), en un volumen final de 100 µl. Primero se realizaron 30 ciclos de amplificación de 1 min a 95ºC, 1 min a 55ºC y 2 min a 72ºC, seguido de un último ciclo de extensión de 10 min a 72ºC. Después se hicieron migrar en un gel del 1% de agarosa 10 µl de cada reacción de PCR durante 2 h a 80 V para comprobar la amplificación.

**3.3.8. Purificación de plásmidos**. Todos los plásmidos listados en la Tabla 4 se usaron para transformar bacterias *E.coli DH5alfa* (Clontech, Madird, España). La preparación de plásmidos en gran cantidad se hizo después utilizando el sistema comercial de purificación de ADN Wizard Plus Megaprep (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo las instrucciones de la casa comercial, y un protocolo de purificación modificado basado en lisis alcalina omitiendo el paso final de cromatografía en resina. El protocolo se simplificó y optimizó en cuanto a rendimiento y grado de pureza. El protocolo optimizado es el siguiente: se resuspendieron 3 g de pasta de bacterias en tubos de 250 ml (rotor GSA) con 40 ml de la solución I (50 mM Tris-Cl, 40 mM EDTA, 100 µg/ml de ARNasa A, pH 7,5) y se lisaron durante <20 min mezclando por inversión hasta que se obtuvo un medio transparente con una solución de lisis II (0,2N NaOH, 0,1% SDS). Después los restos bacterianos se precipitaron con una solución de neutralización III (1.3 M Acetato de Potasio, pH 4,8) y se retiró el precipitado por centrifugación a 14.000 g durante 15 min y filtración a través de papel de filtro. Para recuperar el plásmido del sobrenadante se precipitó con 55 ml de isopropanol durante 5 min, agitando por inversión y se

centrifugó a 14.000 g 15 min. Después de secado y disuelto en $H_2O$ (Sigma) se volvió a precipitar el ADN en tubos de 40 ml (rotor SS34) con 0,25 mM de Acetato de Sodio pH 5,2 y etanol 100% frío y por último se lavó con etanol 70%. Después de secar el precipitado durante 20 min a vacío o durante toda la noche a temperatura ambiente se disolvió el ADN en $H_2O$ (Sigma). Finalmente se estimó la cantidad de ADN total por medida de la absorbancia en un espectrofotómetro ($A_{260nm}$) y el porcentaje de plásmido por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se ajustaron las soluciones de plásmido a 0,5-1 mg/ml de ADN total ($A_{260}$nm). Las preparaciones de plásmidos contenían 80-100% de ADN plasmídico, según se demostró por electroforesis en gel de agarosa, siendo el resto otros ADN bacterianos.

**3.3.9. Análisis de secuencias de la pG de rabdovirus.** Se utilizó el modelo de alineamiento propuesto para las secuencias de pG derivadas de los cADN de 14 rabdovirus animales pertenecientes a 4 géneros [Walker, 1999 #2010]. Los aa hidrofóbicos (en código de letras únicas, F,Y,I,L,V,M,A,+W,H,T), se definieron como aquellos aa con valores de $\Delta G$ >0.4 Kcal/mol para transferir la cadena lateral del aa del agua al etanol [Schulz, 1984]. Los aa hidrofóbicos se usaron para definir las heptadas hidrofóbicas repetidas con posibilidad de formar hélices anfipáticas (aa hidrofóbicos en posiciones a y d) con el programa PSEARCH PCGene (Intelligenetics, Geneve, Switzerland) [Coll, 1995 #775]. El alineamiento se realizó con el programa MegaLign del paquete DNSTAR. La alineación posterior de C, P, pG y otros aa se realizó manualmente. Los perfiles de hidrofilicidad/hidrofobicidad se obtuvieron con el programa ANTIGEN del paquete PCGene. Las secuencias de 25 aislados de VSHV se obtuvieron del GenBank según los números de acceso: A10182, AB060725, AB060727, AF143862, AF345857, AF345858, AF345859, AJ233396, NC000855, U28798, U28799, U28747, U88056, U28799, U28800, U88050, U88051, U88052, U88053, U88054, U88055, U28798, Y18263, X73873 y X66134. Las secuencias se alinearon con el programa MegaLign del paquete DNSTAR. Su año de aislamiento, especie huesped y localización geográfica se esquematizan en la Tabla 9.

**3.3.10. Síntesis de peptidos y pepscan.** Los peptidos p2 ($^{82}$IIHLPLSVTSVSAVASGHYLHRVTYRVT$^{109}$), p3 ($^{110}$CSTSFFGGQTIEK$^{122}$), p4 ($^{123}$TILEAKLSRQEATDEASKDHEY$^{144}$), y p9 ($^{58}$RPAQLRCPHEFEDINKGLVSVPT$^{80}$) (Figura 3B) se sintetizaron en Clontech (Palo Alto, California). Los números corresponden a las posiciones amino terminales en al pG de VSHV 07.71 [Thiry, 1991 #462] incluyendo el peptido señal. El peptido amino-terminal añadido al frg#11 recombinante se denominó peptido poly-H (MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKD) y se sintetizó para uso como control ya que los intentos de cortarlo del frg#11 recombinante con enterokinasa fueron infructuosos. La síntesis de peptidos de 15-mer con solapamiento de 5 aa a través de toda la secuencia de la pG (pepscan) [Thiry, 1991 #462] de VSHV 07.71 y las series de peptidos mutantes de la parte carboxi terminal del p2 (aa 93-107) se realizaron en Chiron (Chiron, Mimotopes, Victoria, Australia).

**3.3.11. Ensayos de ligamiento de fosfolípidos en fase sólida.** El análisis de la capacidad de ligamiento de fosfolípidos por los peptidos del pepscan de la pG se hizo utilizando 2 fosfolípidos marcados con el mismo esqueleto de carbonos pero con distinta carga para aumentar la especificidad el ensayo. Los fosfolípidos marcados que se usaron fueron: 1 Ci/mmol, fosfatidil-[2-$^{3}$H]-inositol 4,5 bisfosfato (PIPP) y fosfatidil [2-$^{3}$H]-inositol (PI) (Amersham, Buckinghamshire, England). Se disolvieron en disolventes orgánicos, se secaron en tubos de vidrio, se mezclaron con tampón 150 mM fosfato-citrato a pH 5.6 [Gaudin, 1993 #545] y se sonicaron a 4 ºC 3 veces durante 1 min. Los fosfolípidos marcados en tampón fosfato-citrato pH 5.6 (100 µl/pocillo) se adicionaron a los pocillos de placas de 96 pocillos cubiertos con los peptidos del pepscan. Después de 4 h de incubación a 4 ºC, las placas se lavaron 3 veces con agua destilada y se incubaron con 100 µl/pocillo de 2% SDS 50 mM etilenediamina pH 12 a 60 ºC durante 30 min para extraer los fosfolípidos marcados. Los extractos se transfirieron a placas de 96 pocillos de polietileno-tereftalato (Wallac-Pharmacia) con 100 µl por pocillo de liquido de centelleo (LKB, Loughtrough, England), se mezclaron y se contaron con un contador 1450-Microbeta (Wallac, Turku, Finland & Pharmacia Iberica) [Estepa, 1996 #1204].

# 4. RESULTADOS

## 4.1 ESTUDIOS COMPARATIVOS DE SECUENCIAS

**4.1.1. Comparación de las secuencias implicadas en fusión entre rabdovirus**. Tal y como se definió en la estrategia, como puntos de partida para seleccionar las secuencias de la región de pG potencialmente implicada en la fusión de VSHV, se han elegido las posiciones del peptido de fusión (aa 142-159) y del dominio p2 de ligamiento de fosfolípidos (aa 82-109) definidas en trabajos anteriores.

Los estudios realizados han tomado como referencia el alineamiento de secuencias de pG de rabdovirus recientemente propuesto por Walker. Este alineamiento propone una estructura consenso para la pG de 14 rabdovirus animales representativos de 4 géneros diferentes: *Vesiculovirus, lyssavirus, Ephemerovirus y Novirhabdovirus* [Walker, 1999 #2010]. La Figura 5 compara las secuencias alrededor del p2, el peptido principal de ligamiento de fosfolípidos (aa 82-109) identificado en estudios anteriores en la pG de VSHV [Estepa, 1996 #892]. Además, se ha incluido el denominado frg#11 (aa 56-110), que incluye todas las heptadas repetidas (aa 68-99) de esta región de la pG [Coll, 1995 #775]. Este fragmento recombinante está simétricamente flanqueado por 2 secuencias cortas que contienen 2 argininas cada una (aa 58-63 y aa 103-107) y por 2 puentes disulfuro. La C carboxy terminal del frg#11 (p2) está unida al peptido de fusión definido por el alineamiento de Walker y por los mutantes de fusión identificados anteriormente en VSV [Shokralla, 1999 #1884] y en VSHV [Gaudin, 1999 #1914]. Por lo tanto, la región que contiene todos estos dominios seleccionada para el estudio presente ha quedado definida entre los aa 56 a 159.

Como primera observación se puede mencionar que existe una gran variación de secuencias de aa y algunas características estructurales conservadas entre los distintos géneros de rabdovirus. Por ejemplo, la mayor parte del frg#11 aparece flanqueada por 2 C altamente conservadas, las: C:I (C denominada I) y C:II o C:III. La C:I forma un puente disulfuro con la C:XII, que en el VSHV corresponde a C64-C315. Dependiendo del rabdovirus, la C:II o C:III, forman puentes disulfuro con

la C:V, que en el VSHV corresponde a C110-C152 (Figura 5). La C:II está ausente en la mayoría de los Novirabdovirus (rabdovirus de peces) y la C:III está ausente en los virus de la rabia.

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

Las heptadas hidrofóbicas repetidas del frg#11 de VSHV localizadas con el programa PSEARCH y descritas con anterioridad [Coll, 1995 #803], no se encontraron en los hipotéticos frg#11 de otros rabdovirus. Sin embargo, muchos de sus aa hidrofóbicos correspondientes podían alinearse manualmente, demostrando que su presencia sí que estaba conservada. Los aa hidrofóbicos aumentaban en número hacia la parte carboxi-terminal del frg#11, especialmente en los últimos 14 aa, en los que al menos 8 posiciones contenían aa hidrofóbicos en todos los rabdovirus animales (Figura 5).

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

Las secuencias de aa que siguen al frg#11 (en VSHV, aa 111-141) muestran que la parte amino terminal (en VSHV, aa 111-127) es muy rica en aa hidrofóbicos mientras que el resto hasta el peptido de fusión contienen un elevado número de aa con carga positiva (26 %) (Figura 6).

Los 17 aa del peptido de fusión tienen características homólogas en todos los rabdovirus (Figura 6). Por ejemplo, la P equivalente a la posición P148 en VSHV está presente en todos los géneros de rabdovirus, además la P150 y la C152 están en todos los rabdovirus excepto en RV. Otras posiciones conservadas en todos los rabdovirus son la 147 en que aparecen aa con anillos aromáticos tales como la F o Y y la 154 en que aparecen W o Y. Existe además un motivo conservado en la parte media de los 17 aa del peptido de fusión constituido por la secuencia (F,Y)PXPXXCX(W,F) (siendo X cualquier aa).

**4.1.2. Perfiles de hidrofilicidad/hidrofobicidad.** Para confirmar las observaciones del estudio anterior, se realizó un estudio de hidrofilicidad/hidrofobicidad utilizando el programa ANTIGEN de PCGene con las secuencias de las Figuras 5 y 6. La Figura 7 (inferior) muestra el perfil de hidrofilicidad/hidrofobicidad de esta región en el VSHV. Del amino al carboxilo terminales, pueden distinguirse los siguientes dominios: un primer dominio hidrofílico (aproximadamente aa 56-75), seguido por un dominio en el que la hidrofobicidad aumenta hasta el C110. A continuación hay otro dominio claramente hidrofóbico (aa 110-120), seguido por un bucle hidrofílico (aa 110 al 140). Al final de la secuencia (aa 140 al 159) y correspondiéndose con el peptido de fusión, se encuentra otro dominio hidrofóbico.

Para estudiar la posible presencia y conservación de estos dominios en otros rabdovirus, se llevó a cabo el correspondiente estudio de hidrofilicidad/hidrofobicidad en las secuencias estudiadas por Walker. La Figura 7 (superior) muestra la superposición de todos los perfiles obtenidos para posiciones análogas a las estudiadas en VSHV. A pesar de las variaciones de secuencias (Figura 5 y 6) se observan dominios muy similares a los encontrados para VSHV. Por ejemplo, la zona amino terminal comienza siendo hidrofílica para ir convirtiéndose en hidrofóbica hasta el C110 en el que se encuentra un pico de hidrofobicidad. Así mismo, también existe un pico altamente hidrofílico aproximadamente localizado en posiciones relativas al VSHV entre los aa 110 y 140, seguido por el dominio hidrofóbico correspondiente a la localización del peptido de fusión donde se encuentra la C152 en VSHV.

**4.1.3. Comparación entre cepas de VSHV.** Para estudiar la variación de aa en la región estudiada (dominio de ligamiento de fosfolípidos y peptido de fusión, aa 56-159) en VSHV, se recopilaron las secuencias de la pG totales o parciales procedentes de las 22 cepas de VSHV depositadas en el GenBank por varios autores (Tabla 9) y se alinearon con el programa Megalign (DNstar). Los resultados del alineamiento se muestran en la Figura 8.

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

El cambio más importante encontrado es la de un W en vez de la C en posición 152, lo que sugiere que el puente disulfuro 110-152 no es absolutamente necesario para la estructura-función de la pG de VSHV. Una variación también importante es la posición 81 que está situada entre las P79 y P86 (la mitad del frg#11), donde el frg#11 podría tener uno o dos "codos". También resulta significativo el cambio S97N, ya que únicamente aparece en cepas de VSHV aisladas de platija japonesa (Tabla 9B) [Nishizawa, 2002 #2392], salmon coho (Tabla 9L, uno de los primeros aislados en especies marinas denominado Makah y Tabla 9O), arenque del pacífico (Tabla 9P,R y T) y bacalao (Tabla 9Q) [Benmansour, 1997 #1421].

**4.1.4. Selección de segmentos en la región aa 56-144 de la pG para su estudio.** Para estudiar su posible relación con la fusión de VSHV por medio de peptidos sintéticos, se han definido 4 segmentos (localizados entre los aa 56-144) alrededor del dominio de ligamiento de fosfolípidos (p2, aa 82-109), basándose en las zonas de los perfiles de hidrofilicidad/hidrofobicidad (Figura 7) y excluyendo el peptido de fusión (aa 142-159), de muy difícil síntesis por su alta hidrofobicidad. Además del p2, los segmentos seleccionados fueron

los p9 (aa 58-80), p3 (aa 110-122) , p4 (aa 123-144) y frg#11 (p9+p2, frg#11 aa 56-110) (Figuras 3A, 3B).

El p2 moderadamente hidrofóbico se ha seleccionado debido a que estudios anteriores con este peptido lo identificaron como el peptido que más ligaba PS de toda la pG de VSHV; contiene varias heptadas repetidas y una cabeza carboxi terminal en la que se encuentran 2 R. El peptido p9 con una parte hidrofílica y otra moderadamente hidrofóbica, contiene 23 aa desde la posición 56 al comienzo del p2; contiene el resto de las heptadas repetidas de esta región amino terminal de la pG así como una cabeza amino terminal con 2 R simétrica a la del p2. Entre el p9 y el p2 se encuentra la posición 81, altamente variable entre las cepas de VSHV. El frg#11 (aa 56-110) se diseñó uniendo p9+p2, contiene las 5 heptadas repetidas (aa 68-99) de esta región (Figura 3A) y se obtuvo como un fragmento recombinante. El frg#11 en la pG está flanqueado por los puentes disulfuro C64-C315 y C110-C152 [Einer-Jensen, 1998 #1507], que acercan los peptidos de ligamiento de fosfolípidos y de fusión en la estructura tridimensional de la pG (Figura 3A and 3B).

Después del p2, el pico hidrofóbico p3 contiene una secuencia de 12 aa, 11 de los cuales están totalmente conservados entre los rabdovirus de peces de agua fría (VSHV, VNHI y HIRV) [Walker, 1999 #2010]. El peptido p4 va desde el final del p3 hasta el comienzo del hipotético peptido de fusión (aa 142) y contiene abundantes aa hidrofílicos y uno de los sitios (K140) que cambian de aa en los mutantes resistentes a la neutralización con el AcM C10 [Bearzotti, 1995 #883; Gaudin, 1999 #1914]. Se han utilizado peptidos sintéticos o recombinantes basándose en las secuencias arriba comentadas y se han estudiado una serie de propiedades relacionadas con el ligamiento de fosfolípidos y la fusión a pH neutro y a pH 5.6 (pH bajo).

**4.1.6. Selección de mutantes para su estudio.** Una vez estudiadas las secuencias de la región de la pG de VSHV y seleccionados los segmentos, se analizaron las posibles mutaciones a introducir tanto en el dominio p2 de ligamiento de fosfolípidos (ensayo de ligamiento de PS

marcada en fase sólida) [Estepa, 1996 #1204] como en los restantes segmentos y en el peptido de fusión (ensayos de fusión de células transfectadas con plásmidos mutados en la pG)(Figura 8).

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

Debido a que las P59, P79, P86 y G98 estaban conservadas y a que formaban "codos" según indicaban los modelos construidos por ordenador (Programa DTMM, Desk Top Molecular Modeler, vs 3, Oxford University Press, 1994), se eligieron estas posiciones para su mutación a un aa que no impusiera ninguna restricción estructural tal como es el caso de la A.

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

En la región del p3 se eligió la posición 115 para realizar una mutación (mutante F115K) por ser una de las 3 posiciones más hidrófobicas y más conservadas en todos los rabdovirus (Figura 6). En el dominio p4 se eligió la T135E, debido a que era una de las posiciones con homología al peptido incrementador de infección del VSHV y a que el mecanismo de acción de dicho peptido está relacionado con la fusión [Mas, 2002 #2385]. En el peptido de fusión, se eligieron aquellas mutaciones que por su posición similar en VSV habían resultado en mutantes deficientes en fusión [Li, 1993 #571; Whitt, 1990; Zhang, 1994; Shokralla, 1998 #1426; Shokralla,

1998 #1426; Jeetendra, 2002 #2395] y que estaban localizadas alrededor del motivo conservado (**F**,Y)**P**XPXXCX(**W**,F) (posiciones F147, P148 y W154) (Figura 6).

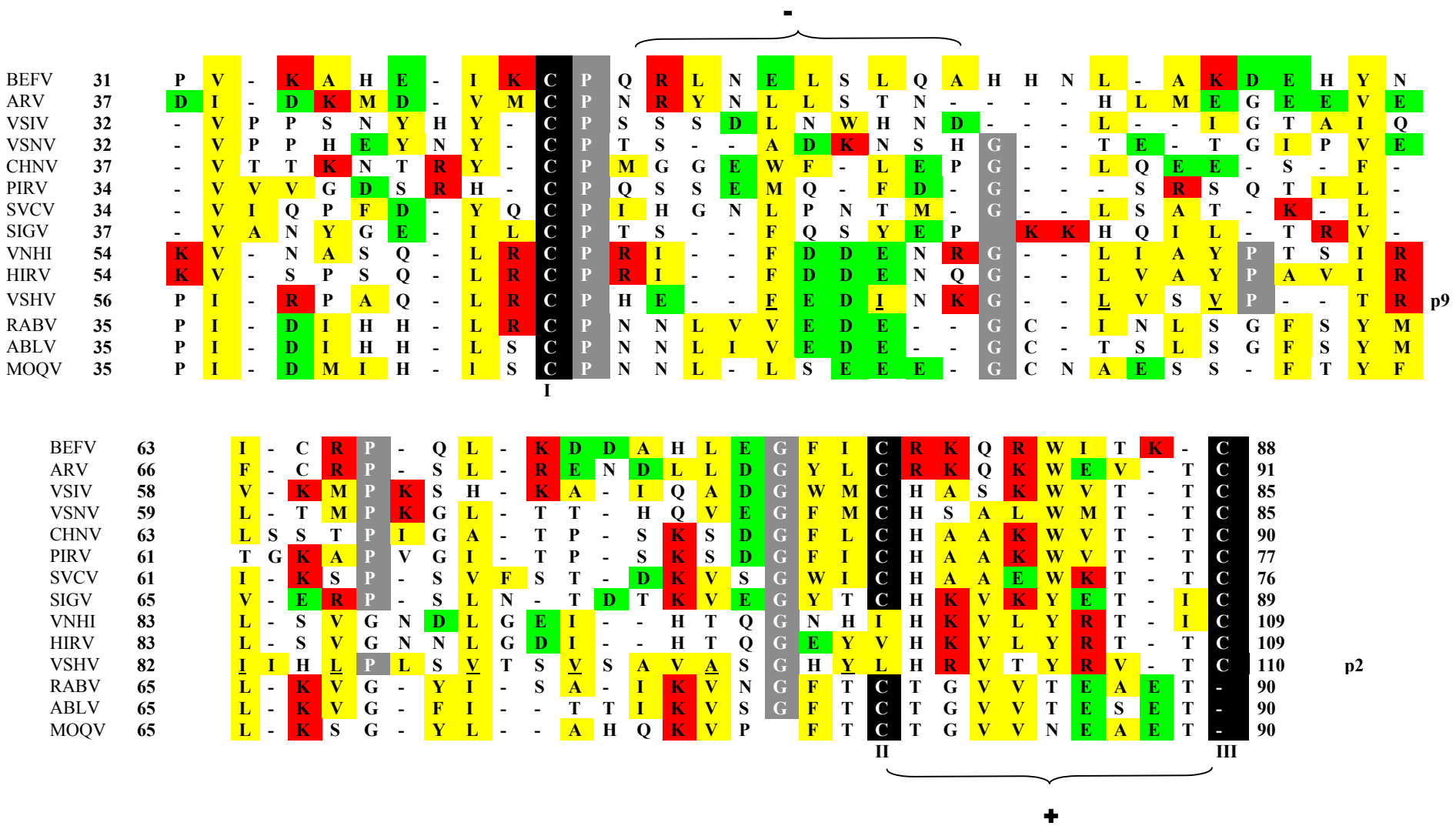



**Figura 5. Alineamiento de las secuencias de aa deducidas de los cADN de 14 rabdovirus animales pertenecientes a 4 géneros en la región del frg#11 (p9+p2).** Se ha seguido el último alineamiento propuesto [Walker, 1999 #2010] y después se optimizó manualmente para conseguir una máxima coincidencia entre los motivos estructurales basados en C (columnas negras), P o pG (columnas grises). Los aa hidrofóbicos que forman heptadas repetidas en VSHV se han subrayado en VSHV). Los aa que tienen carga positiva están en rojo y los de carga negativa en verde. Los aa en amarillo son los más hidrofóbicos: F,Y,I,L,V,M,A y W. La posición del primer y el último aa en cada pG de cada rabdovirus se dan en la figura. Se han señalado las cabezas en donde abundan las cargas positivas y negativas. Bovine ephemeral fever cepa BB7721 (BEFV), Adelaide River cepa DPP61 (ARV), vesicular stomatitis Indiana (VSIV) y New Jersey (VSNV), Chandipura cepa 16553514 (CHNV), viremia primaveral de la carpa (SVCV), sigma (SIGV), necrosis hematopoiética infecciosa cepa WRAC (VNHI), septicemia hemorragica vírica (VSHV), hirame (HIRV), rabia cepa CVS (RABV), mokola (MOKV), lisavirus australiano cepa Ballina 960591 (ABLV).

p4

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BEFV | 89 | S | E | T | W | Y | F | S | T | S | I | E | Y | Q | I | L | E | V | I | P | E | Y | S | G | C | T | D | A | V | K | K | L | D | - | - | - | - | - | Q | G | A |
| ARV | 92 | T | E | T | W | Y | F | V | T | D | V | K | Y | Q | I | I | E | V | I | P | T | E | N | E | C | M | E | E | R | E | R | K | L | - | - | - | - | - | K | G | E |
| VSIV | 86 | D | F | R | W | Y | G | P | K | Y | I | T | Q | S | I | R | S | F | T | P | S | V | E | Q | C | K | E | S | I | E | Q | T | K | - | - | - | - | - | Q | G | T |
| VSNV | 86 | D | F | R | W | Y | G | P | K | Y | I | T | H | S | I | H | N | E | E | P | T | D | Y | Q | C | L | E | A | I | K | S | Y | K | - | - | - | - | - | D | G | V |
| CHNV | 91 | D | F | R | W | Y | G | P | K | Y | I | T | H | S | I | H | N | I | K | P | T | R | S | D | C | D | T | A | L | A | S | Y | K | - | - | - | - | - | S | G | T |
| PIRV | 78 | D | F | R | W | Y | G | P | K | Y | I | T | H | S | I | H | H | L | R | P | T | T | S | D | C | E | T | A | L | Q | R | Y | K | - | - | - | - | - | D | G | S |
| SVCV | 77 | D | Y | R | W | Y | G | P | Q | Y | I | T | H | S | I | H | P | I | S | P | T | I | D | E | C | R | R | I | I | Q | R | I | A | - | - | - | - | - | S | G | T |
| SIGV | 90 | D | M | P | W | Y | F | S | P | T | I | S | H | S | I | S | P | L | R | V | K | E | S | E | C | K | D | A | I | A | E | H | Q | - | - | - | - | - | L | G | T |
| VNHI | 110 | S | T | G | F | F | G | G | Q | T | I | E | K | A | L | V | E | M | K | L | S | T | - | - | - | K | E | A | G | A | - | Y | D | - | - | - | - | - | T | T | T |
| HIRV | 111 | S | T | G | F | F | G | G | Q | T | I | E | K | A | L | V | E | M | K | L | A | P | - | - | - | R | E | V | G | V | - | Y | D | - | - | - | - | - | T | T | T |
| VSHV | 110 | S | T | S | F | F | G | G | Q | T | I | E | K | T | I | L | E | A | K | L | S | R | - | - | - | Q | E | A | T | D | - | E | A | - | - | - | - | - | S | K | D |
| RABV | 91 | Y | T | N | F | V | G | Y | V | T | T | T | F | K | R | K | H | F | R | P | T | P | D | A | C | R | A | A | Y | N | W | K | M | A | G | D | P | R | Y | E | E |
| ABLV | 91 | Y | T | N | F | V | G | Y | V | T | T | T | F | K | R | K | H | F | R | P | T | V | A | A | C | R | D | A | Y | N | W | K | V | S | G | D | P | R | Y | E | E |
| MOQV | 91 | Y | T | N | F | F | G | Y | V | T | T | T | F | K | R | K | H | F | R | P | T | P | E | F | C | R | N | A | Y | N | W | K | V | A | G | D | P | R | Y | E | E |

**Peptidos de Fusión**

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BEFV | 124 | | L | I | P | P | Y | Y | P | - | P | A | G | C | F | W | - | N | T | E | M | 141 |
| ARV | 126 | | Y | I | P | P | Y | Y | P | - | P | T | N | C | V | W | - | N | A | I | D | 143 |
| VSIV | 110 | | W | L | N | P | G | F | P | - | P | Q | S | C | G | Y | - | A | T | V | T | 127 |
| VSNV | 110 | | S | F | N | P | G | F | P | - | P | Q | S | C | G | Y | - | G | T | V | T | 127 |
| CHNV | 125 | | L | V | S | L | G | F | P | - | P | E | S | C | G | Y | - | A | S | V | T | 142 |
| PIRV | 122 | | L | I | N | L | G | F | P | - | P | E | S | C | G | Y | - | A | T | V | T | 139 |
| SVCV | 121 | | D | E | D | L | G | F | P | - | P | Q | S | C | G | W | - | A | S | V | T | 138 |
| SIGV | 125 | | H | V | S | L | S | F | P | - | P | E | D | C | S | W | - | N | S | V | N | 142 |
| VNHI | 140 | | A | A | A | L | Y | F | P | A | P | - | R | C | Q | W | Y | T | D | N | V | 158 |
| HIRV | 140 | | A | S | A | L | Y | F | P | A | P | - | R | C | Q | W | Y | T | D | N | V | 158 |
| VSHV | 142 | | H | E | Y | P | F | F | P | E | P | - | S | C | I | W | M | K | N | N | V | 159 |
| RABV | 125 | | S | L | Q | N | P | Y | P | D | - | Y | H | - | - | W | L | R | T | V | R | 141 |
| ABLV | 125 | | S | L | H | T | P | Y | P | D | - | S | S | - | - | W | L | R | T | V | T | 141 |
| MOQV | 125 | | S | L | H | N | P | Y | | D | - | Y | H | - | - | W | L | R | T | V | T | 141 |
| | | | | | | | F | | | | | | | | | W | | | | | | Posiciones más |
| | | | | | | | Y | P | | | P | | | C | | Y | | | | | | conservadas |

**Figura 6. Alineamiento de secuencias de aa deducidas de los cADN de 14 rabdovirus animales pertenecientes a 4 géneros en la región de los peptidos de fusión hipotéticos.** Se ha seguido el último alineamiento propuesto [Walker, 1999 #2010] y después se optimizó manualmente para conseguir una máxima coincidencia entre los motivos estructurales basados en C (columnas negras) y P (columnas grises). Las posiciones más conservadas fueron las correspondientes a la P148 (en todos los rabdovirus), la P150 y C152 (en todos los rabdovirus excepto en RV) y las F,Y 147 y W,Y154. El motivo (F,Y)PXPXXCX(W,Y) aparece conservado en la mitad de la secuencia de los 17 aa que constituyen el peptido de fusión homologo al determinado por mutantes defectivos de fusión en VSV

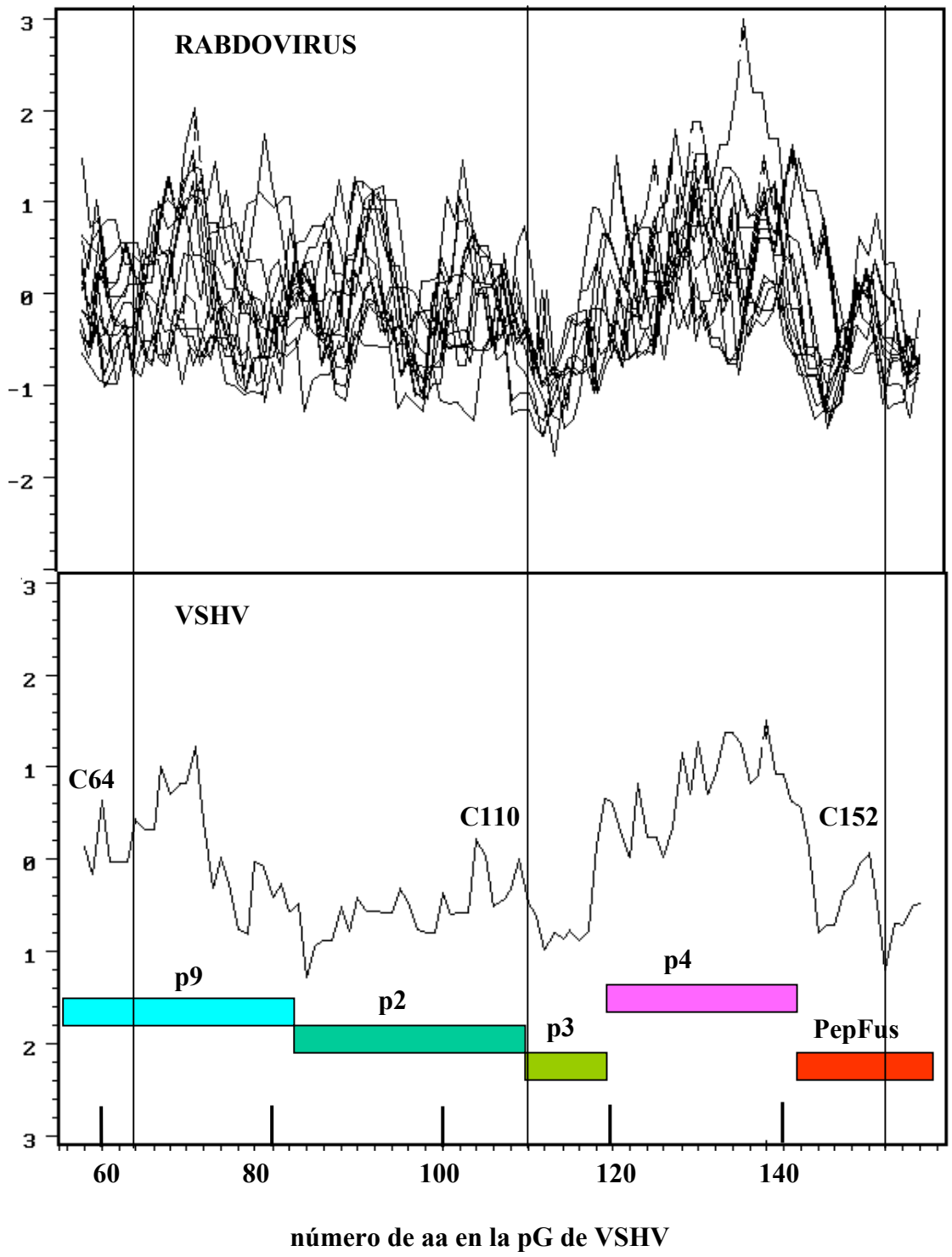



**Figura 7. Comparación de perfiles de hidrofilicidad/hidrofobicidad de la región frg#11+peptido hipotético de fusión.** Se obtuvieron los perfiles de hidrofilicidad (+, de 1 a 3)/hidrofobicidad (- , de 1 a 3), de las secuencias alineadas de Walker pertenecientes a la región frg#11+ peptido de fusión mediante el programa ANTIGEN del paquete de programas PCGene. Para hacer el perfil se eligió una ventana de 6 aa propuesta por defecto en el programa. Después se representaron gráficamente y se superpusieron con el programa Adobe Photoshop vs7 utilizando sus posiciones de aa relativas a las posiciones de VSHV.

**Tabla 5 .**
**Descripción de los aislados de VSHV cuyas secuencias de pG están en el GenBank y que se estudian en la Figura 8.**

| Nº acceso | Fig17 | año | especie | Lugar | referencia |
|---|---|---|---|---|---|
| A10182 | A | 1990 | Trucha | Fr | [Renard, 1990 #2402] |
| AB060725 | B | 2001 | Platija | Ja | [Nishizawa, 2002 #2392] |
| AB060727 | C | 2001 | Platija | Ja | [Nishizawa, 2002 #2392] |
| AF143862 | D | 2000 | Arenque | In | [Betts, 2000 #2403] |
| AF345857 | E | 2001 | Trucha | Di | [Winton, 2001 #2404] |
| AF345858 | F | 2001 | Trucha | Di | [Winton, 2001 #2404] |
| AF345859 | G | 2001 | Trucha | Di | [Winton, 2001 #2404] |
| AJ233396 | H | 1998 | Trucha | Fr | [Xing, 1998 #2405] |
| NC000855 | I | 1999 | Trucha | Al | [Schuetze, 1999 #1918] |
| U28799 | J | 1995 | Trucha | Di | [Benmansour, 1997 #1421] |
| U28799 | K | 1997 | Trucha | Fr | [Benmansour, 1997 #1421] |
| U28747 | L | 1988 | Salmon | Wa | [Benmansour, 1997 #1421] |
| U88056 | M | 1995 | Rodaballo | In | [Benmansour, 1997 #1421] |
| U28800 | N | 1995 | Trucha | Fr | [Benmansour, 1997 #1421] |
| U88050 | O | 1991 | Salmon | Wa | [Benmansour, 1997 #1421] |
| U88051 | P | 1993 | Arenque | Bc | [Benmansour, 1997 #1421] |
| U88052 | Q | 1990 | Bacalao | Wa | [Benmansour, 1997 #1421] |
| U88053 | R | 1993 | Arenque | Wa | [Benmansour, 1997 #1421] |
| U88054 | S | 1998 | Trucha | Fr | [Benmansour, 1997 #1421] |
| U88055 | T | 1993 | Arenque | Wa | [Benmansour, 1997 #1421] |
| X73873 | U | 1990 | Trucha | Fr | [Bernard, 1990 #46] |
| X66134 | V | 1993 | Trucha | Di | [Lorenzen, 1993 #697] |

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

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T | U | V | | | Pmutantes | mutantes |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 56 | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | . | P | . | . | . | . | . | . | P | P | | FRG#11 | | |
| 57 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | . | N | . | . | . | . | . | . | N | N | | | | |
| 58 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | . | R | . | . | . | . | . | . | R | R | P9 | | + | |
| 59 | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | . | P | . | . | . | . | . | . | P | P | | | | |
| 60 | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | . | A | . | . | . | . | . | . | A | A | | | | |
| 61 | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | . | Q | . | . | . | . | . | . | Q | Q | | | | |
| 62 | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | . | L | . | . | . | . | . | . | L | L | | | | |
| 63 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | . | R | . | . | . | . | . | . | R | R | | | + | |
| 64 | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | | C | | | | | | | C | C | | | C | |
| 65 | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | . | P | . | . | . | . | . | . | P | P | | | P | P65A |
| 66 | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | . | H | . | . | . | . | . | . | H | H | | | | |
| 67 | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | . | E | . | . | . | . | . | . | E | E | | | | |
| 68 | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | . | F | . | . | . | . | . | . | F | F | | | | |
| 69 | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | . | E | . | . | . | . | . | . | E | E | | | | |
| 70 | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | . | D | . | . | . | . | . | . | D | D | | | - | |
| 71 | I | T | I | I | I | I | I | I | I | I | I | T | . | I | . | . | . | . | . | . | I | I | | | | |
| 72 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | . | N | . | . | . | . | . | . | N | N | | | | |
| 73 | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | . | K | . | . | . | . | . | . | K | K | | | + | |
| 74 | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | | | | |
| 75 | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | | | | |
| 76 | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | | | | |
| 77 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | | | | |
| 78 | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | | | | |
| 79 | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | | | P | P79A |
| 80 | T | A | T | T | T | T | T | T | T | T | T | A | T | T | A | A | A | A | T | A | T | T | | | | |
| 81 | R | Q | R | R | Q | Q | K | R | K | Q | Q | Q | Q | R | Q | Q | Q | Q | R | Q | K | K | | | + | |
| 82 | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | P2 | | | I82S |
| 83 | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | | | | |
| 84 | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | | | | |
| 85 | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | | | | L85S |
| 86 | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | | | P | P86A |
| 87 | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | | | | |
| 88 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | | | | |
| 89 | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | | | | |
| 90 | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | N | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | | | | |
| 91 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | | | | |
| 92 | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | | | | |
| 93 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | | | | A |
| 94 | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | | | | A |
| 95 | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | | | | A |
| 96 | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | | | | A96E |
| 97 | S | N | S | S | S | S | S | S | S | S | S | N | S | S | N | N | N | N | S | D | S | S | | | | N |
| 98 | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | | | G | A | G98A |
| 99 | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | | | | A | H99S |
| 100 | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | | | | A |
| 101 | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | | | | A |
| 102 | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | | | | A |
| 103 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | | | + | R,K,H,E | R103A |
| 104 | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | | | | A |
| 105 | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | | | | A |
| 106 | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | | | | A |
| 107 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | | | + | R,K,H,E | R107A |
| 108 | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | | | | |
| 109 | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | | | | |
| 110 | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | P3 | | C | |
| 111 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | | | | |
| 112 | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | A | T | T | T | A | T | T | T | T | T | T | T | | | | |
| 113 | S | N | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | | | | |
| 114 | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | | | | |
| 115 | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | | | | F115K |
| 116 | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | | | | |
| 117 | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | G | | | | |
| 118 | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | K | Q | K | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | | | | |
| 119 | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | | | | |
| 120 | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | | | | |
| 121 | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | | | | |
| 122 | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | | | + | |
| 123 | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | P4 | | | |
| 124 | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | | | | |
| 125 | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | | | | |
| 126 | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | | | | |
| 127 | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | | | | |
| 128 | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | | | + | |
| 129 | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | L | | | | |
| 130 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | | | | |
| 131 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | | | + | |
| 132 | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | Q | | | | |
| 133 | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | | | | |
| 134 | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | | | | |
| 135 | T | I | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | T | | | | T135E |
| 136 | D | N | N | N | N | N | D | D | D | N | N | N | N | D | N | N | N | N | D | N | D | D | | | - | |
| 137 | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | | | - | |
| 138 | A | A | A | A | A | G | A | A | A | A | A | A | A | A | G | A | A | A | A | A | A | A | | | | |
| 139 | S | G | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | G | G | G | G | S | G | S | S | | | | |
| 140 | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | | Ac neut. | + | |
| 141 | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | | | - | |
| 142 | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | H | | peptido | | |
| 143 | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | | fusión | - | |
| 144 | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | Y | | | | |
| 145 | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | | | P | |
| 146 | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | | | | |
| 147 | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | F | | | F | F147K |
| 148 | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | | | P | P148K |
| 149 | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | E | | | - | |
| 150 | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | | | P | |
| 151 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | | | | |
| 152 | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | W | C | C | C | C | C | C | C | | | C | |
| 153 | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | I | | | | |
| 154 | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | | | W | W154K |
| 155 | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | M | | | | |
| 156 | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | K | | | + | |
| 157 | N | D | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | D | N | N | D | D | D | D | N | N | N | | | | |
| 158 | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | N | | | | |
| 159 | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | V | | | | |

**Figura 8. Comparación de las secuencias de 22 aislados de VSHV en la región frg#11+peptido hipotético de fusión**. Las secuencias de 22 aislados de VSHV depositados por distintos autores se obtuvieron del GenBank según los números de acceso: **A**, A10182; **B**, AB060725; **C**, AB060727; **D**, AF143862; **E**, AF345857; **F**, AF345858; **G**, AF345859; **H**, AJ233396; **I**, NC000855; **J**, U28798; **K**, U28799; **L**, U28747; **M**, U88056; **N**, U28800; **O**, U88050; **P**, U88051; **Q**, U88052; **R**, U88053; **S**, U88054; **T**, U88055; **U**, X73873 y **V**, X66134. Coloreados en negro, las C (posiciones 64, 110 y 152); en rojo, el frg#11 (56-110) y el peptido hipotético de fusión (142-159); en azul claro, el p9 (58-80); en verde, el p2 que es capaz de ligar fosfolípidos aniónicos (82-109); en marrón, el p3 conservado en todos los novirabdovirus (110-122); en violeta, el p4 hidrofílico (123-144); en azul marino, los aa hidrofóbicos del frg#11 ; en gris, las posiciones 88-96 y 133-135 parcialmente idénticas al peptido incrementador de la fusión de VSHV [Mas, 2002 #2385] y en amarillo, las variaciones de secuencia de aa. Otras características tales como las cargas o los aa conservados en el alineamiento con otros rabdovirus también se han señalado en el esquema. Se sitúan en el mapa los peptidos mutantes de la parte carboxi terminal del p2 (91-107) y los mutantes de la pG obtenidos en el pMCV1.4. Los números a la izquierda son las posiciones que ocupan los aa en la pG. La posición 140 es una de las posiciones que resulta mutada en los mutantes MAR frente al AcM C10. La secuencia A10182 correspondiente al VSHV 07.71, se ha tomado como referencia para este trabajo y corresponde a la secuencia patentada por el mismo grupo de investigación (Eurogentec, Lieja, Bélgica) que después depositó la misma secuencia con algunas alteraciones con el número de acceso X73873, que en la región bajo estudio se distingue de la anterior solamente en la mutación R81K.

## 4.2. PROPIEDADES DE LA REGIÓN 56-144

**4.2.1. Ligamiento de fosfolípidos marcados al pepscan de la pG.** Con objeto de investigar el ligamiento de fosfolípidos aniónicos por los peptidos de la pG y en concreto por los de la regiones definidas por los p9, p2, p3, p4 y frg#11, se recubrieron los pocillos de placas de 96 pocillos con los peptidos de 15-mer procedentes de toda la secuencia de la pG de VSHV (pepscan). Después se añadieron los fosfolípidos marcados fosfatidilinositol bisfosfato (PIPP, fosfolípido aniónico) y el fosfatidilinositol (PI, fosfolípido con el mismo esqueleto de carbonos que el PIPP pero sin carga, utilizado como el mejor control para el ligamiento de PIPP). El máximo ligamiento de PIPP (10-14 veces el fondo) se encontró en los peptidos 83-113 (correspondientes al p2). Ligamientos menores (4-6 veces el fondo) se encontraron en los peptidos 109-133 (que incluye el p3) y 149-173 (que incluye la mayoría del peptido de fusión hipotético) (Figura 9A). Los peptidos del pepscan correspondientes a p9 y p4 no ligaban PIPP. Otros peptidos del pepscan también interaccionaban con el PIPP en otras regiones de la pG fuera de la región estudiada en este trabajo (por ejemplo los de la región alrededor del aa 230). Muy poco marcaje permanecía ligado a los pocillos cuando se empleó el PI (Figura 9B).

**4.2.2. Inducción de sincitios por frg#11**. Cuando el frg#11 o el p2 se añadieron a las monocapas celulares a pH 6 se observó un aumento de la superficie de las células de 2-3 veces (Figura 10A). A pH 6 la adición de medio de fusión, p2 (200 µg/ml) o frg#11 (200 µg/ml) indujo un aumento de superficie en el 3.4 ± 0.2, 33.0 ± 1.0 o 36.7 ± 2.4 % (n=2) de las células EPC de la monocapa, respectivamente. La adición de p9, p3, p4 o poly-H a pH 6 o del frg#11 a pH 7.6 a las monocapas de EPC, sin embargo, no produjo aumento en la superficie de las células (datos no mostrados).

En los mismos experimentos aparecieron sincitios de 3-6 núcleos por sincitio, pero solo cuando se añadió frg#11 a pH 6 (Figura 10C). El porcentaje de núcleos en sincitios aumentó del 5 al 10 % cuando se añadieron 50 a 200 µg de frg#11 por ml (Figura 10E). La adición de p2, p3, p4 o poly-H causaba la formación de poco más de un 2% de núcleos en sincitios (Figura 10E y

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

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

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

**4.2.4. Inhibición de la fusión de células transfectadas con pG con Acs anti-p2 y anti segmentos adyacentes.** Para estudiar la participación de los segmentos en la fusión, se obtuvieron los peptidos sintéticos correspondientes, los Acs anti-segmentos pG y se ensayó su efecto sobre la fusión. Debido a que las células EPC transfectadas con plásmidos codificando pG eran capaces de formar ~ 25% de núcleos en sincitios cuando se las exponía a pH 6, pudo estudiarse el efecto de los Acs anti-segmentos pG en la formación de dichos sincitios.

Para una mejor interpretación de dichos experimentos se estudió antes el ligamiento de los Ac anti-segmentos a pG en fase sólida a pH 7.6 y 6. Todos los Ac utilizados reconocían la pG a ambos pH, sin embargo a pH 6 los Ac anti-frg#11 o p2 reconocían sus segmentos correspondientes en pG, 5 o 2 veces, respectivamente, mejor que los anti-p3 o p4 los suyos. En las mismas condiciones los AcM neutralizantes C10 y 3F1A12 reconocían igualmente la pG a los 2 pH ensayados. El ligamiento de los Ac anti-segmentos a sus correspondientes peptidos sintéticos en fase sólida fue independiente del pH (resultados no mostrados). A las mismas condiciones a las que los Ac anti-segmentos se ligaban a la pG en fase sólida, el porcentaje de sincitios obtenidos en presencia de Acs anti-frg#11 (aa 56-110), se reduce más de 4 veces comparado con el número de sincitios en ausencia de Acs (del 100 al ~ 25%). Resultados muy similares se obtuvieron con los Acs anti-p2 y anti-p4. Los Acs anti-p3 (Figura 11) o Ac irrelevantes (AcM anti-N 2C9, que reconoce la nucleoproteína del VSHV) no fueron capaces de alterar el número de núcleos en sincitios.

**4.2.5. Respuesta inmunológica de las truchas al dominio del frg#11.** La respuesta inmunólogica de la trucha al dominio del frg#11 se comparó con la respuesta a G4, una forma recombinante de la pG de VSHV. Para ello se utilizaron sueros de trucha inmunizada con VSHV +

G4 (trucha 1) y placas de ELISA recubiertas con 2 µg por pocillo de G4 (aa 9-443) o de frg#11 (aa 56-110). Después de optimizar las cantidades de frg#11 para una máxima absorbancia y un fondo mínimo con Acs anti-VSHV, se ensayaron sueros de trucha individuales de distintos títulos de neutralización. Sueros procedentes de las truchas inmunizadas por inyección con VSHV+G4 + adjuvante de Freund con los títulos más bajos de neutralización (~100) mostraron los valores más altos de absorbancia (0.6-0.8 unidades). Sueros procedentes de truchas inmunizadas por inyección con VSHV + saponina con títulos de neutralización de ~ 2000 (Figura 12A) y ~ 100.000 (no mostrados), mostraron valores de absorbancia menores (~ 0.2 unidades). Por el contrario, sueros procedentes de truchas control no inmunizadas mostraron valores de absorbancia de solo 0.02 unidades (valores de fondo). Por lo tanto, los sueros procedentes de truchas con los títulos más altos de neutralización (epítopos conformacionales) mostraban las respuestas más bajas al dominio frg#11 (epítopo poco conformacional) confirmando resultados publicados anteriormente con la G4 [Fernandez-Alonso, 1999 #1943].

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

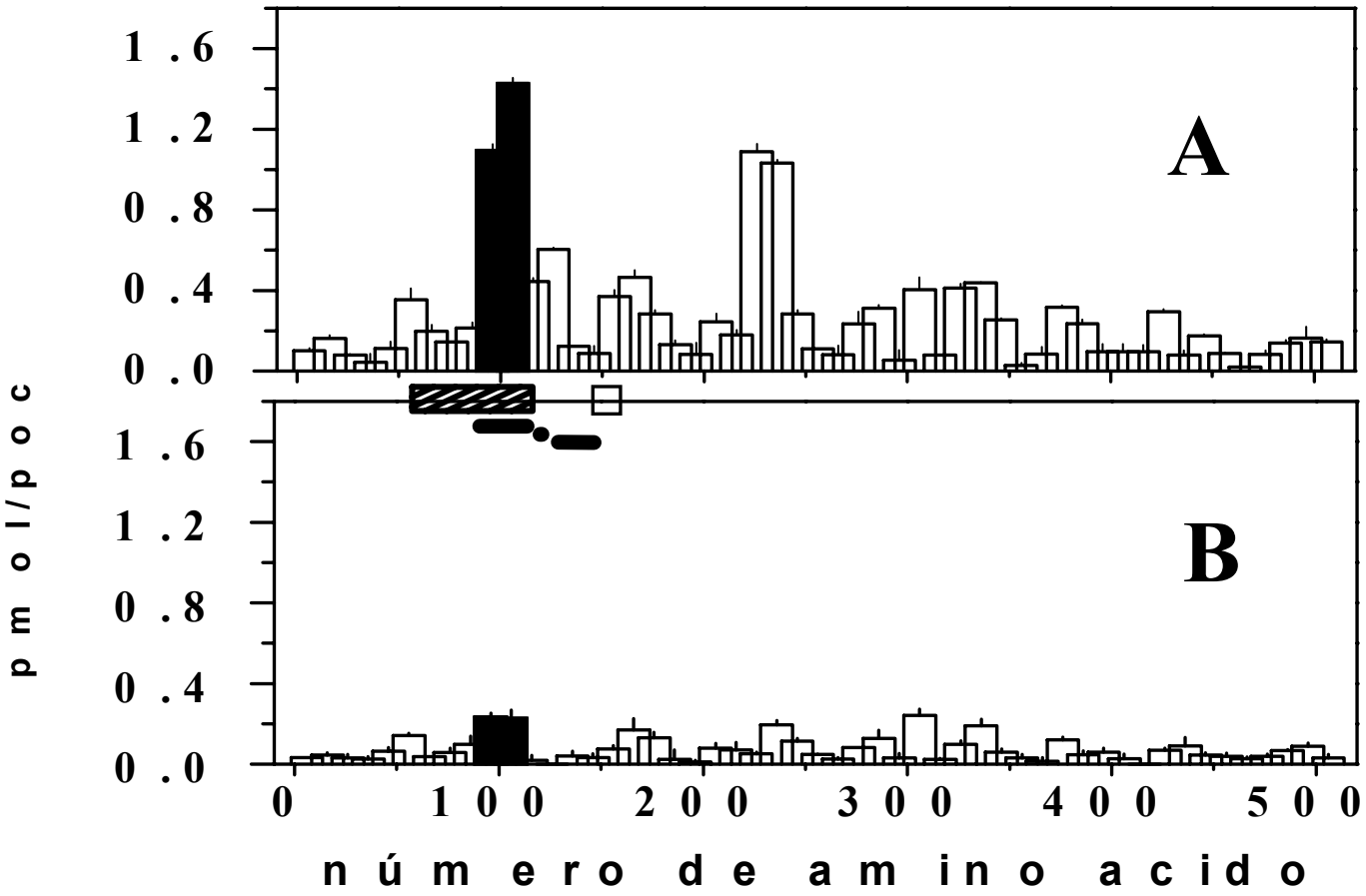



**Figura 9.- Ligamiento de PIPP (A) y PI (B) a peptidos 15-mer del pepscan de pG en fase sólida.** Vesículas sonicadas de 10 pmoles/pocillo de fosfatidil inositol bisfosfato (PIPP) (A) o fosfatidil inositol (PI) (B) en 0.15 M fosfato-citrato a pH 5.6, se añadieron a pocillos tapizados con 3 nmoles/pocillo de peptidos 15-mer del pepscan de pG. Después de incubar y lavar las placas se contaron. Se representan las medias y sus desviaciones estándar de duplicados. A pH 7.6 se obtuvieron resultados similares. ■, peptidos que ligan mayoritariamente PIPP, aa 83-113 correspondientes a la parte p2 del frg#11 (aa 56-110) (barra rallada horizontal). Barras horizontales negras, localización de p2, p3 y p4. Barra horizontal blanca, peptido de fusión.

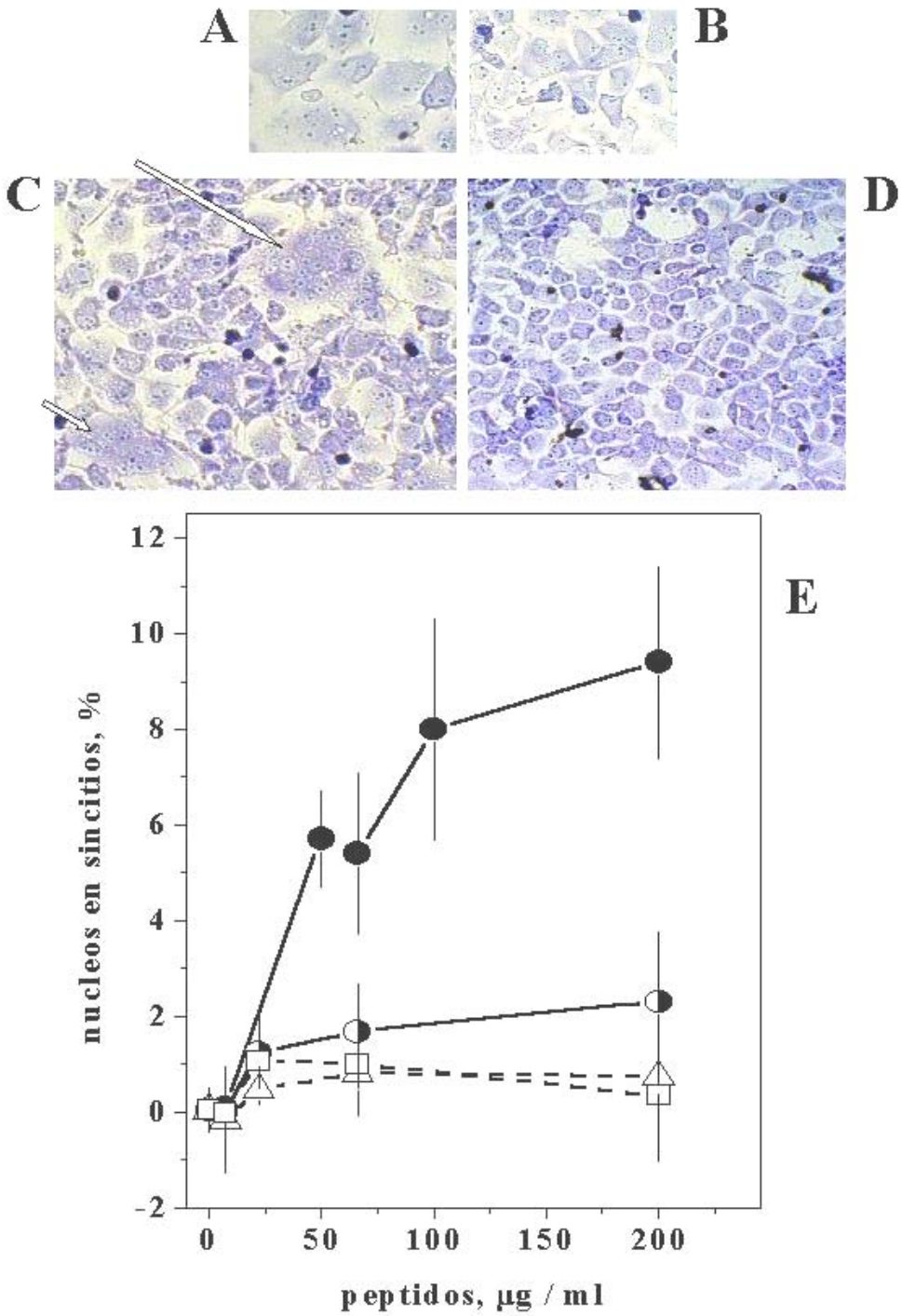



**Figura 10. Microfotografías del ensanchamiento celular (A,B) y formación de sincitios (C,D) en monocapas EPC después de la adición de frg#11 y dependencia de la formación de sincitios con la concentración de frg#11 (E).** Las monocapas EPC se trataron con 20 µg de frg#11 por ml durante 30 min a pH 6 y 14ºC. Después las monocapas se fijaron y se tiñeron con Giemsa. **A**, EPC tratadas con frg#11. **B**, EPC control. **C**, EPC tratadas con frg#11 enseñando los sincitios (flechas). **D**, EPC control. **E**, Los peptidos se añadieron a las monocapas EPC en placas de 24 pocillos y se incubaron 30 min a pH 6 y 14ºC. Después las monocapas se lavaron con medio a pH 7.6 y se incubaron 2 h más. Se fijaron y se tiñeron con Giemsa. Los números de núcleos en sincitios de 3 o mas núcleos por sincitio se contaron entre 400 núcleos por pocillo. Los resultados se expresaron como porcentaje de núcleos en sincitios según la formula, número de núcleos en sincitios / número total de núcleos x 100. Se representan las medias y las desviaciones estándar de 3 experimentos. ●, frg#11; ◐, p2; △, p3; □, p4.

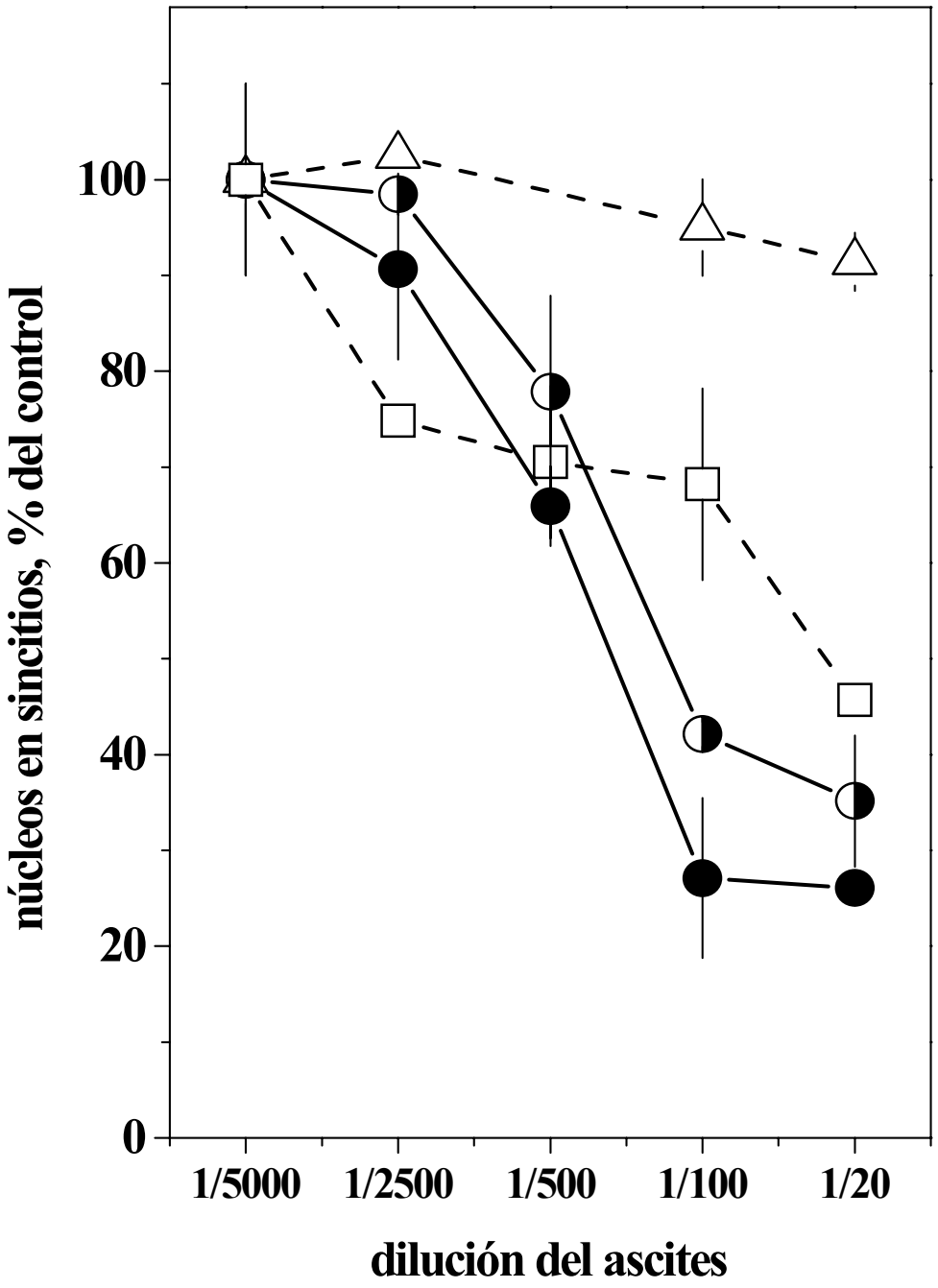



**Figura 11. Inhibición por Acs anti-segmentos de la formación de sincitios en células transfectadas con pG.** Las monocapas de células EPC en placas de 24 pocillos se transfectaron con 0.6 µg de G3-pcDNAI/Amp con fugene. Al día siguiente las monocapas se incubaron 30 min a pH 6 en presencia de los ascitis,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

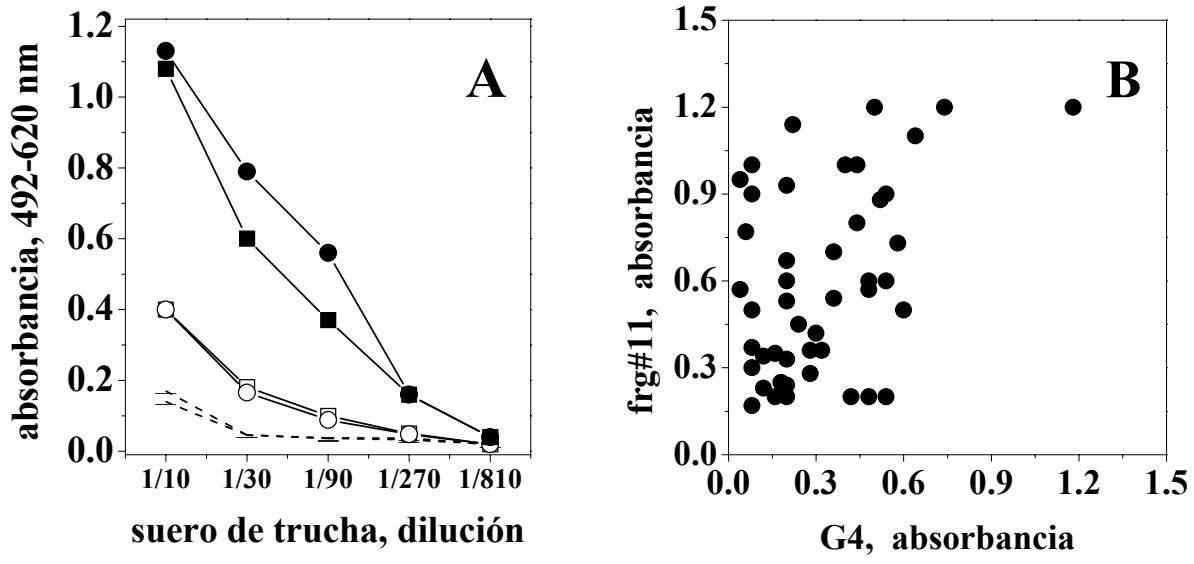



**Figura 12.- Titulación de sueros de trucha sobre fase sólida recubierta de frg#11 (A) y relación entre valores de absorbancia de varios sueros de trucha inmunizada con VSHV y fases sólidas recubiertas con frg#11 o G4**. A) Se utilizaron 2 µg de frg#11 por pocillo. ■●, sueros procedentes de truchas con títulos de neutralización de ~ 100. □○, sueros procedentes de truchas con títulos de neutralización de ~ 2000. ------, sueros de truchas sanas no inmunizadas. B) Los sueros se obtuvieron de 46 truchas inmunizadas con G3-pcDNAI/Amp. Los sueros se ensayaron de 3 en 3 diluciones desde 1/10 a 1/270. Para la comparación se escogieron los datos a 1/30 ya que la mayoría de las absorbancias estaban distribuidas entre 0.3 y 1.2 unidades de absorbancia. Datos reevaluados de experiencias anteriores [Fernandez-Alonso, 2000 #2074].

**Tabla 6. Presencia de Acs anti-frg#11 en sueros de truchas inmunizadas contra VSHV**

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

Para estimar la presencia de Acs anti-frg#11, se utilizó la técnica ELISA en pocillos recubiertos con 2 µg de frg#11 por pocillo. Las absorbancias se obtuvieron con diferentes diluciones de los sueros de trucha, eligiendo la dilución a 1/30 como la mejor para comparar los resultados obtenidos ya que la mayoría de los valores estaban entre 0.3 y 1.2. Los resultados se han expresado en absorbancias relativas a la absorbancia obtenida con una mezcla de los 15 sueros procedentes de truchas no inyectadas, de acuerdo con la formula, absorbancia obtenida con cada suero / absorbancia obtenida con la mezcla de sueros de trucha no inyectados. Se dan las medias y las desviaciones estándar de los valores correspondientes a los distintos sueros analizados individualmente por duplicado. El número en paréntesis es el número de truchas analizadas. Los números en negrita corresponden a medias significativamente diferentes del valor de la mezcla de sueros no inyectados: 1.0 ± 0.2 ($p<0.05$, asumiendo una distribución normal calculada según el test-t de 2 poblaciones de OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

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

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

Las Tablas 7 y 8 muestran que entre todos los tratamientos y agentes de transfección comerciales de nueva generación ensayados, el fugene fue con el que se obtuvo una mayor eficiencia de transfeccción, confirmando anteriores estudios comparativos con otros agentes de transfección [Lopez, 2001 #1942]. La mejor eficiencia de transfección se obtuvo con fugene (30.1 ± 6.7 células teñidas con Xgal, n=2 ), mientras que los mejores agentes comerciales de transfección tales como la lipofectamina (7.6 ± 0.1 células teñidas con Xgal, n=2 ), el GeneJuice (19.0 ± 6.1 células teñidas con Xgal, n=2 ) o el Superfect (16.9 ± 3.2 células teñidas con Xgal, n=2 ), no llegaron a dichas eficiencias. Con otros 5 agentes de transfección comerciales (Tabla 8), no se obtuvieron mayores eficiencias de transfeccción. Por ello, los experimentos que siguieron se realizaron con fugene como reactivo de transfección. La presencia de 0.5 mM $Ca^{++}$ antes o durante la transfección, aunque aumentaba 1.2 veces la eficiencia de transfección, también aumentaba el fondo. Con otros tratamientos tales como Chariot, polilisina, peptidos transfectantes, sonicación o electroporación, no se obtuvieron eficiencias de transfección suficientes.

La transfección óptima se obtuvo cuando se transfectaron las células EPC con una relación de concentración fugene/pCMVß de 3.3 (µl de fugene/µg de pCMVß), disminuyendo cuando se usaron relaciones mayores o menores, confirmando resultados anteriores [Lopez, 2001

#1942]. Sin embargo la variación de expresión de ßgal a lo largo de los diferentes experimentos varió con un coeficiente de variación (CV) del 54.1 %. La actividad βgal fue óptima con 0.6 µg de pCMVß por pocillo de placas de 24 pocillos con 400 µl de medio.

**4.3.2. Transfección a varias concentraciones celulares y tiempos.** El porcentaje máximo de células transfectadas que expresaban ßgal se obtuvo cuando se sembraron 500.000 células por ml (Figura 13A). Concentraciones celulares más altas disminuían 3-4 veces el porcentaje de células transfectadas mientras que con concentraciones menores no se obtenían células transfectadas. Los resultados fueron similares cuando la eficiencia de transfección se estimó por luminiscencia (máximo de 17 x $10^6$ cps). En las mismas condiciones, las estimaciones de la duración del ciclo celular de las células EPC fueron de 44 h a concentraciones celulares iniciales entre 300.000 y 800.000 células /ml. Además se comprobó que la duración del ciclo celular disminuía a concentraciones celulares mayores o menores (resultados no mostrados), por lo que, estos resultados sugieren que las células EPC se transfectan mejor cuanto más activas están en división. Por otra parte, el estrecho rango de las concentraciones celulares a las que la transfección resultó óptima, resalta la dificultad de reproducir las eficiencias de transfección.

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

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

**4.3.3. Influencia de la mitosis en la transfección.** La variación del porcentaje de células teñidas con Xgal con la concentración celular (Figura 13A) y con el tiempo de transfección relativo

a la edad de la monocapa de células EPC (Figura 13B), sugieren su dependencia de la fase del ciclo celular.

Esta hipótesis se confirmó adicionando colchicina o timidina a las monocapas de células EPC antes de la transfección. Un aumento máximo de 2-3 veces en la actividad de ßgal se obtuvo cuando las células se incubaron antes de la transfección con colchicina (10 ng/ml) o timidina (2.5 mM) durante 15-20 h o 5 h, respectivamente. El aumento de la duración de los tratamientos provocaba muerte celular en las monocapas de células EPC y por eso se observó una disminución de la actividad con el tiempo de tratamiento (Figura 14).

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

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

**4.3.5. Uso de promotores CMV de varias longitudes.** La Figura 15AB muestra que la transfección con el plásmido pMOKßgal y su derivado de menor peso molecular el pMCV1.4ßgal, aumentaban entre 3-4 veces el número de células teñidas con Xgal comparados con el plásmido pCMVß. Los incrementos en la eficiencia de transfección fueron unas 10 veces mayores cuando la

actividad ßgal se estimó por luminiscencia (Figura 15B). No se encontraron diferencias significativas entre las eficiencias de transfección del pMOKßgal y su derivado de menor peso molecular pMCV1.4ßgal (n=8). Sin embargo el valor absoluto de la eficiencia variaba de experimento a experimento (Figura 15AB). Como resultado de la mayor eficiencia de transfeccción, la inspección visual de las placas de EPC transfectadas por pMOKßgal/pMCV1.4ßgal y teñidas por Xgal mostraba un color azul que nunca se había podido obtener con pCMVß.

La actividad ßgal obtenida con los pMOKßgal/pMCV1.4ßgal fue también óptima a 1-3 µg de plásmido por ml. Concentraciones de ADN más altas o más bajas disminuían la actividad de ßgal a niveles de fondo (Figura 15AB), confirmando los resultados obtenidos anteriormente con pCMVß [Lopez, 2001 #1942].

La Figura 16 muestra el aspecto de las monocapas EPC transfectadas con pMCV1.4ßgal y teñidas con Xgal. Las células con una gran cantidad de ßgal aparecen teñidas de un azul muy intenso mientras que otras células aparecen teñidas con azul claro.

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

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

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

**Tabla 7 .**
**Listado de los procedimientos ensayados para aumentar la eficiencia de transfección.**

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

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

*Sonicación 2 pulsos de duración 5-10” y amplitud 20-40%.
**Peptido 21 es el peptido transfectante MEG: GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV [Morris, 1999 #2137] y el peptido 22 es el peptido diseñado con secuencias del frg#11 y la parte carboxilo terminal del peptido MEG con la secuencia: LSVTSVSAVASGHYLHRVTYRVTSQPKSKRKV
***Chariot (agente transfectante de proteinas de Active Motif, Rixensart, Bélgica): 2µl/poc
****NLS, nuclear localization peptide: CGGPKKKRKVG [Liang, 2000 #2112]. Se utilizó a 4µg/µg ADN.

**Tabla 8**
**Eficiencias de transfección con agentes de transfección comerciales de última generación**

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

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

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

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

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

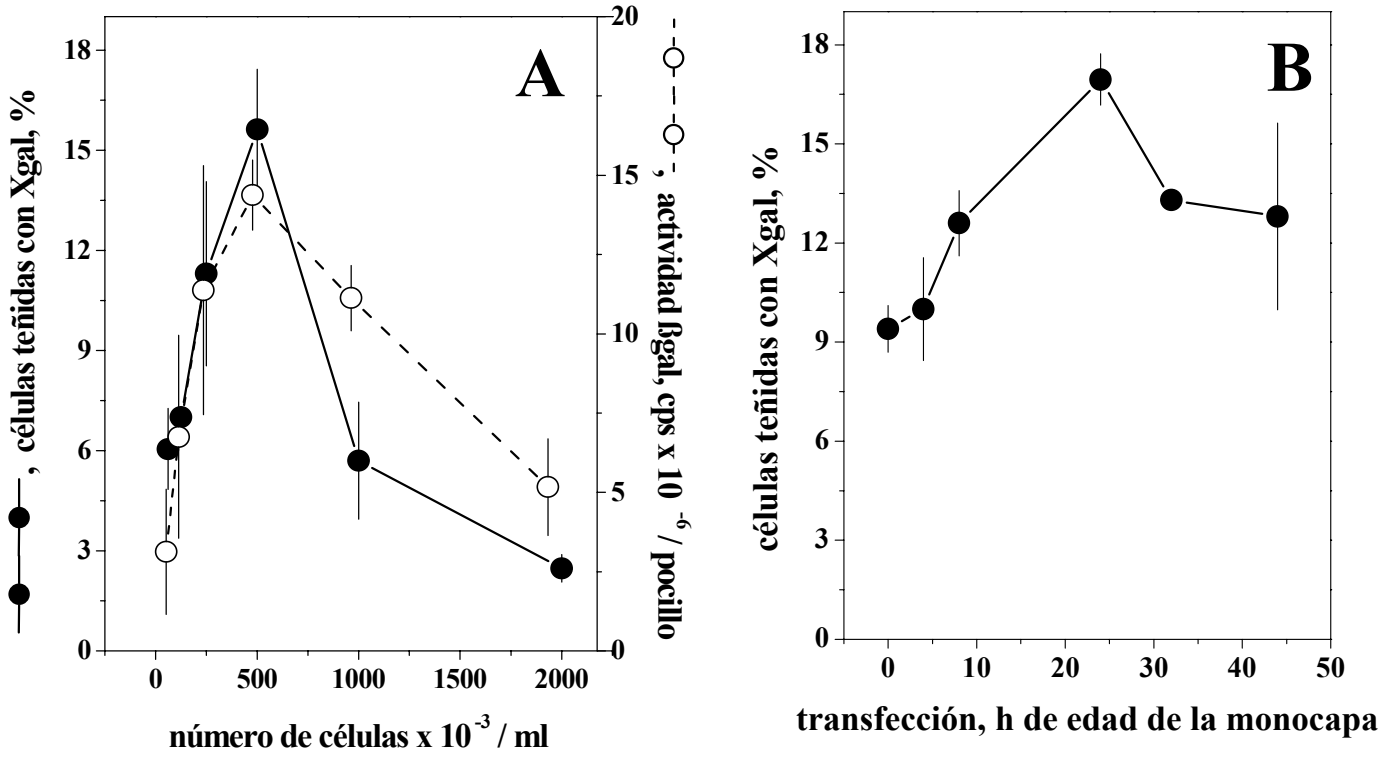



**Figura 13.- Relación entre el número de células teñidas con Xgal o de la actividad ßgal con el número de células con el que se iniciaron los cultivos (A) y el tiempo de cultivo (B). A)** Cantidades distintas de células EPC se sembraron en 400 µl de RPMI 10% FCS por pocillo de una placa de 24 pocillos. Después de 24 h las células se transfectaron con pCMVß y la actividad ßgal se ensayó 24 h después de la transfección. **B**) 500.000 células por ml se sembraron en una placa de 24 pocillos. Las células se transfectaron a distintos tiempos después de iniciado el cultivo y la actividad ßgal se ensayó a las 52 h. Las medias y las desviaciones estándar de 2 experimentos cada uno en duplicado se han representado en ambas figuras.

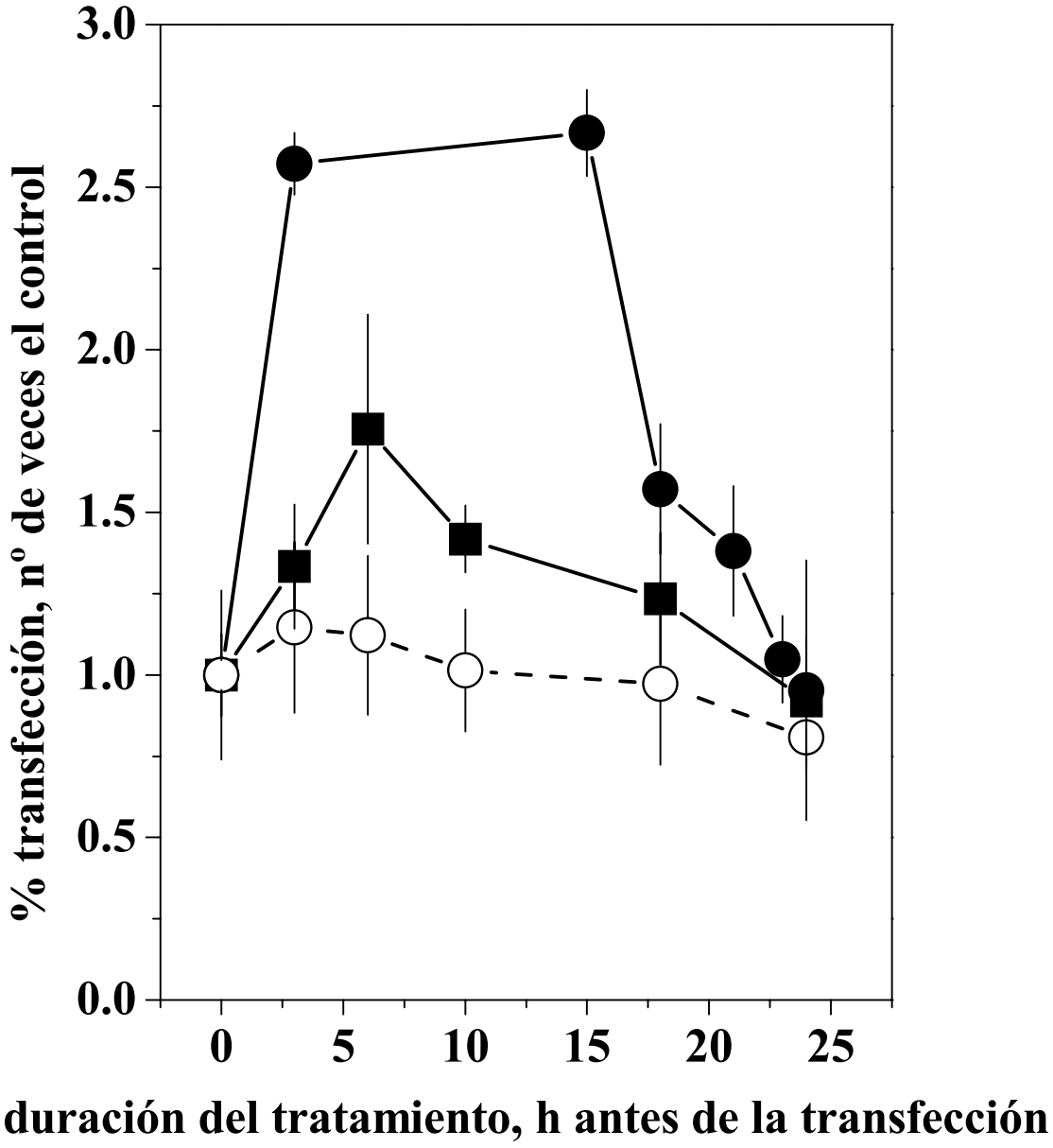



**Figura 14.- Efecto del tiempo de la adición de colchicina y timidina antes de la transfección en el porcentaje de tinción con Xgal de las células EPC.** Unas 500.000 células EPC por ml se trataron con 10 ng/ml de colchicina, 2.5 mM de timidina o agua destilada en 20 µl durante varias h antes de la transfección. Las monocapas se lavaron con medio, los complejos fugene-ADN se añadieron y la actividad ßgal se ensayó 24 h después. Se han representado las medias y las desviaciones estándar de duplicados. ●, colchicina. ■, timidina. ○, agua destilada.

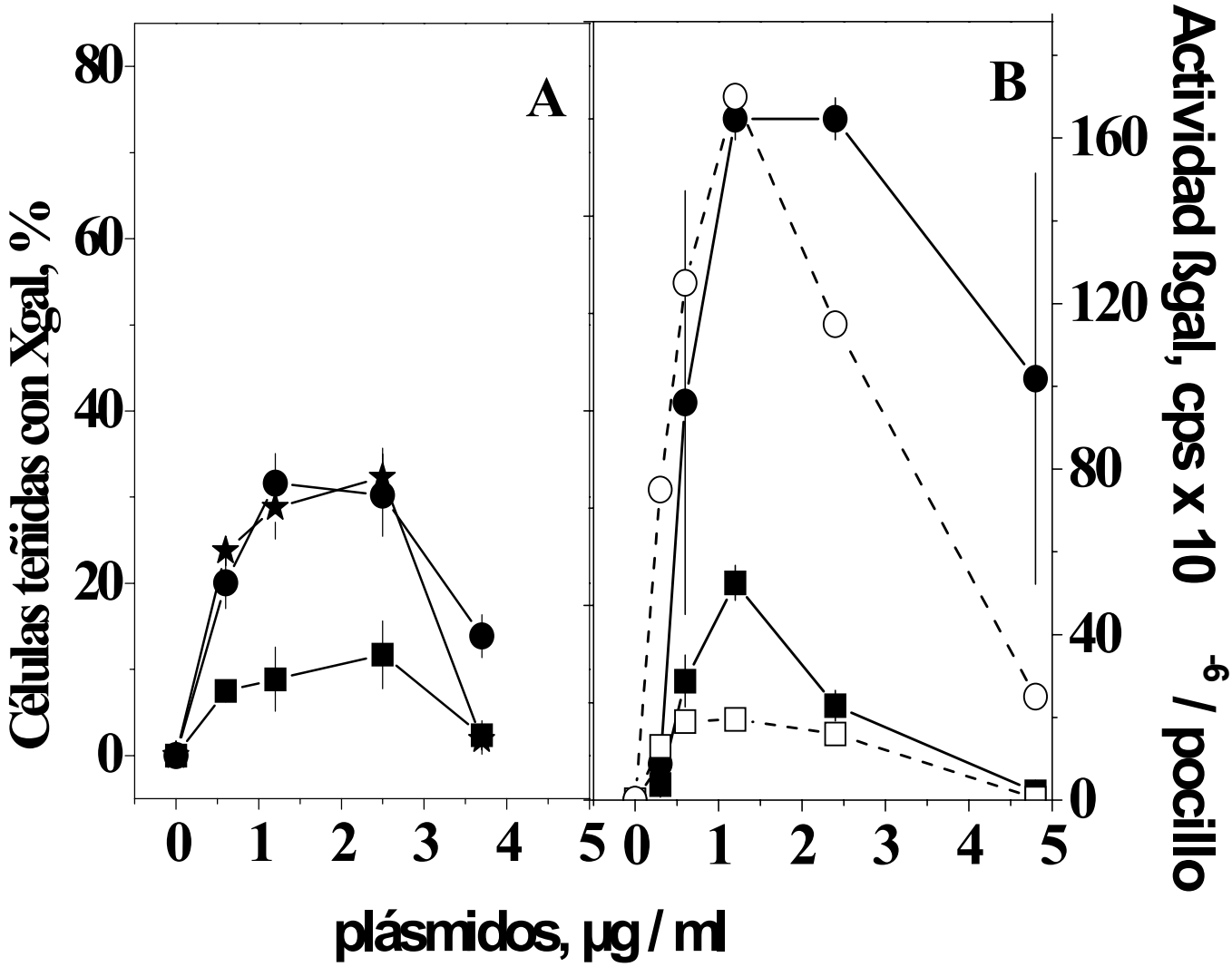



**Figura 15.- Rango de las diferencias en la expresión de ßgal en función de la longitud del promotor CMV en 2 experimentos extremos (A y B).** Unas 500.000 células EPC por ml se transformaron con 0.6 µg de plásmidos acomplejados con 2 µl de fugene en 100 µl de medio sin suero. Los dos experimentos con resultados extremos (izquierda y derecha) representan el rango de valores encontrados en 8 experimentos. Se han representado las medias y las desviaciones estándar de duplicados. ■, células teñidas con Xgal obtenidas con pCMVß. ●, células teñidas con Xgal obtenidas con pMOKßgal. ★, células teñidas con Xgal obtenidas con pMCV1.4ßgal. □, actividad ßgal en cps obtenida con pCMVß. ○, actividad ßgal en cps obtenida con pMOKßgal o pMCV1.4ßgal. A,B, diferentes experimentos, respectivamente.

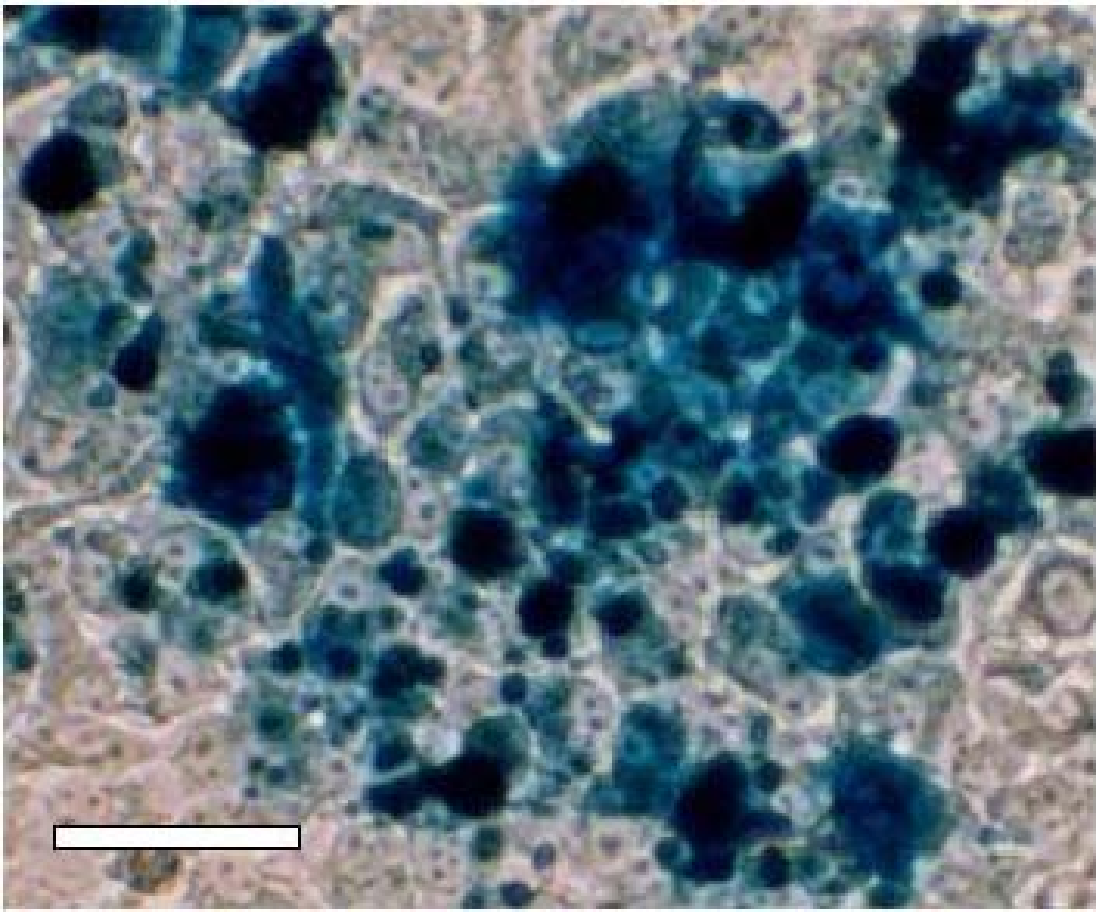


**Figura 16.- Aspecto de una monocapa de células EPC tratada con colchicina, transfectadas con pMCV1.4ßgal y teñidas con Xgal.** El cultivo se comenzó con 500.000 células por ml. Después de 12 h las monocapas se trataron con 10 ng/ml de colchicina y a las 24 h las monocapas se lavaron y transfectaron con pMCV1.4ßgal-fugene y 24 h después se fijaron, tiñeron con Xgal y se fotografiaron. La barra blanca es ~ 40µm.

**4.3.7. Expresión de la pG de VSHV en las membranas de células transfectadas.** La expresión de la pG en las membranas de células EPC transfectadas con los plásmidos pcDNA3.1G3 y pMCV1.4-G, se demostró por tinción con anticuerpos anti-pG y análisis por FACS (Figura 17). Los primeros experimentos de transfección del gen de la pG en células EPC se realizaron de acuerdo con las condiciones optimizadas anteriormente para la expresión de ßgal 24 h después de la transfección a 28ºC. Sin embargo se comprobó que la expresión óptima de pG requería 2 días a 20 ºC (datos no mostrados). En experimentos similares al de la Figura 17, se observa un desplazamiento en el perfil de la intensidad de fluorescencia del 20-70 % de las células vivas (dependiendo del experimento y del plásmido utilizado) con respecto al perfil de las células transfectadas en ausencia de plásmido, lo que indica un reconocimiento de la pG expresada en ellas por los diversos Acs. Este ensayo también permitió seleccionar los mejores AcP y AcM para el posterior estudio de los mutantes de la pG.

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

Para los ensayos de fusión basados en transferencia de energía de fluorescencia se utilizaron liposomas marcados simultáneamente con las sondas fluorescentes fosfolipídicas R-PE y NBD-PE [Gaudin, 1993 #545]. Cuando se excita a 450 nm en presencia de R-PE y NBD-PE, la NBD-PE emite a 535 nm pero esa energía se transfiere a la R-PE que la absorbe. Al disminuir el pH, la fusión provoca una separación de R-PE y NBD-PE, la R-PE no puede captar la emisión de la NBD-PE y la emisión del NBD a 535 nm se puede detectar. Primero se puso a punto una formulación óptima de los liposomas que después de la fusión permitiera una emisión máxima a 535 nm y un fondo mínimo. Para ello se variaron las composiciones relativas de la PC, PE, Ch, R-PE y NBD-PE para formar varios tipos de liposomas y se ensayó la emisión a 535 nm después de lisarlos con Triton x100, que origina la máxima separación posible de R-PE y NBD-PE. Se obtuvieron respuestas máximas de emisión a los 535 nm de unas 40 veces el fondo utilizando las

concentraciones de fosfolípidos integrantes de los liposomas descritas en métodos. Ahora bien, cuando se utilizaron dichos liposomas R-PE y NBD-PE para fusionar con células EPC transfectadas con el gen de la pG no se obtuvieron emisiones a 535 nm mayores del fondo. Se probaron distintas concentraciones celulares, concentraciones de liposomas y tiempos de incubación, pero en ningún caso se obtuvieron resultados positivos. Debido a estos resultados adversos hubo que abandonar este ensayo (resultados no mostrados).

Siguiendo protocolos descritos anteriormente [Biacchesi, 2000 #1956; Biacchesi, 2000 #2002; Biacchesi, 2002 #2324; Biacchesi, 2002 #2393], para los ensayos de fusión por activación de la transcripción con la polimerasa del fago T7, se usan 2 poblaciones distintas de células EPC transfectadas, una para expresar la polimerasa T7 y otra para expresar un gen bajo el promotor T7. Para que se pudiera realizar el ensayo, era pues necesario comprobar primero la expresión de un gen marcador (ßgal) bajo el promotor de T7, por expresión previa de la T7 polimerasa en una misma población de células EPC [Nussbaum, 1994 #1917]. Por lo tanto, se procedió a estudiar la expresión de ßgal codificada en distintos plásmidos bajo el promotor T7 (pT7Lac, pRnull, pGINT7) en células EPC que expresaran la polimerasa T7 por transfección (pT7) o por infección con vaccinia (VTF7-3) o en células BHK productoras permanentes de la polimerasa T7. Para los ensayos de cotransfección secuencial primero se transfectó un plásmido que codificaba la T7 polimerasa (pT7) y después un plásmido que codificaba la ßgal bajo el promotor de la T7 (pT7Lac o pRnull). Para los ensayos de cotransfección simultánea se utilizaron mezclas de los 2 plásmidos en una transfección única. Para los ensayos de infección-transfección, se infectaron células EPC con la cepa de Vaccinia VTF7-3 (multiplicidad de infección de 5 virus por célula) y después se transfectaron con plásmidos que codificaba la ßgal bajo el promotor de la T7 (pT7Lac, pRnull, pGINT7). Además y debido a que mientras que la temperatura óptima para el funcionamiento de la T7 polimerasa es de 37 ºC y la temperatura óptima a la que la pG de VSHV fusiona es de 14-20 ºC, se realizaron experimentos combinando de varias maneras las temperaturas y los tiempos de cada tratamiento (Tabla 8). Sin embargo no

se obtuvieron suficientes niveles de expresión de la ßgal (máximo de 45.7 veces el fondo) en ninguno de los 11 protocolos diferentes que se ensayaron. La expresión de ßgal para poder realizar el ensayo de fusión con una fiabilidad suficiente con estos métodos se estimó en al menos de ~ 700 veces el fondo (Tabla 8). Por lo tanto, a pesar de la variación en protocolos, plásmidos, tiempos y temperaturas ensayados, no se pudieron obtener actividades de ßgal suficientemente útiles para el ensayo en ningún caso. Debido a estos resultados adversos hubo que abandonar este ensayo.

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

Para los ensayos de fusión por formación de sincitios, se transfectaron las células con pMCV1.4-G y la fusión se detectó por visualización al microscopio de los sincitios que se forman al disminuir el pH. En la Figura 18A se muestra el aspecto de los sincitios de entre 3 a 30 núcleos por sincitio que se forman en una monocapa de células EPC transfectadas con pMCV1.4-G después de inducir la fusión a pH 6. Cuando las células se transfectaron con G3-pcDNAI/Amp, ~ 70% de los sincitios que aparecían tenían 3 núcleos por sincitio. Mientras que cuando las células se transfectaron con pMCV1.4-G, la mayoría de los sincitios tenían entre 9-16 núcleos por sincitio (Figura 18B), por lo que se seleccionó este plásmido para efectuar los ensayos. El tamaño y el número de sincitios aumentaba si las células EPC una vez tratadas a pH 6 se incubaban 2 h más a pH neutro (datos no mostrados). Para evitar que las células EPC se despegaran de la monocapa durante el tratamiento a bajo pH, el pH se mantuvo a 6 (suficiente para observar sincitios, aunque el máximo está en pH 5.6) y se utilizaron monocapas de células EPC de al menos 24 h después de iniciado el cultivo.

Para comprobar que la formación de sincitios correlacionaba con la eficiencia de transfección y optimizar su dependencia con la concentración de plásmido, se llevaron a cabo experimentos simultáneos con pCMVß (eficiencia de transfección fácilmente detectable y con alta

sensibilidad), G3-pcDNA/Amp y pMCV1.4-G. La más alta expresión de ßgal con fugene se obtuvo usando 0.6 µg de pCMVß por pocillo tanto si la actividad ßgal se estimaba por número de células teñidas con Xgal como si la actividad se estimaba por luminiscencia o por tinción con FDG y FACS (datos no mostrados). Confirmando su dependencia con la eficiencia de transfección estimada con el plásmido pCMVß y tanto si la fusión se cuantificaba por número de sincitios como por el de núcleos en sincitios, el máximo de formación de sincitios también se encontró utilizando 0.6 µg de G3-pcDNAI/Amp o pMCV1,4-G por pocillo. La utilización de concentraciones de ADN más altas o más bajas reducía el número de sincitios (Figura 19).

**4.3.10. Inhibición de la formación de sincitios con Acs anti-VSHV.** Para demostrar que los sincitios eran dependientes de la pG expresada en la membrana de las células EPC transfectadas, se estudió la formación de sincitios en presencia de Acs de ratón anti-VSHV y anti-pG. Loa AcM neutralizantes C10 y 2FIA12 y el AcM IP1H3, que reconoce un epítopo lineal [Fernandez-Alonso, 1999 #1373], disminuyeron el número de núcleos en sincitios a valores de fondo (Figura 20A). Por el contrario los AcM anti-G I10 o 2C9 (anti-N, usado como control negativo), no afectaron a la formación de sincitios.

El ascitis procedente de ratones inmunizados con VSHV + saponina con un título de neutralización de 1000, redujo el número de núcleos en sincitios a un l5-40 %. Mientras que el ascitis procedente de ratones inmunizados con VSHV + Freund's con un título de neutralización de 10, redujo el número de núcleos en sincitios a un 30-40% (Figura 20B).

La Figura 21 muestra el porcentaje de núcleos en sincitios que se obtuvieron en presencia de suero procedente de truchas inmunizadas con VSHV. Los sueros procedentes de truchas con títulos de neutralización de ~ 100.000 o ~ 2000, redujeron al 40 % el número de núcleos en sincitios. Los sueros procedentes de truchas con títulos de neutralización de ~ 100 redujeron al 60 % el número de núcleos en sincitios. Al contrario, el suero procedente de truchas sanas no inmunizadas no redujo el número de núcleos en sincitios.

**Tabla 10**

**Plásmidos y condiciones utilizados para el ensayo* de fusión basado en la activación de la transcripción por la polimerasa del fago T7**

| | | Plásmidos: | | Temperatura y tiempo | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tipo de ensayo | Células | T7 | ßgal | T7 | + | ßgal | ßgal/fondo |
| **Cotransfección secuencial | EPC | pT7 | pT7Lac | 30ºC 3h | + | 30ºC 3h | 1.3 ± 0.1 |
| | | | pRnull | 30ºC 3h | + | 30ºC 3h | 30.2 ± 4 |
| Cotransfección simultánea | EPC | pT7 | pT7Lac | 35ºC 4h | + | 28ºC 48h | 1.2 ± 0.2 |
| | | | | 28ºC 24 h | + | 28ºC 24 h | 1.3 ± 0.6 |
| ***Infección y transfeccción | EPC | VTF7-3 | pT7Lac | 37ºC 1h | + | 28ºC 24h | 1.0 ± 0.1 |
| | | | pRnull | 37ºC 1h | + | 28ºC 24h | 4.7 ± 2 |
| | | | pGINT7 | 37ºC 1h | + | 28ºC 24h | 1.1 ± 0.1 |
| | EPC | VTF7-3 | pT7Lac | 37ºC 4h | + | 14ºC 24h | 0.8 ± 0.2 |
| | BHK | VTF7-3 | pT7Lac | 37ºC 1h | + | 14ºC 48h | 3.1 ± 1.1 |
| | | | pRnull | 37ºC 1h | + | 14ºC 48h | 4.5 ± 1.2 |
| Transfección | BHK T7 | ---- | pT7Lac | ---- | + | 14ºC 48h | 45.7 ± 8 |
| | | | pGINT7 | ---- | + | 14ºC 48h | 24.4 ± 3 |

*Todos los ensayos de fusión por activación de la transcripción se basaron en: células T7 (EPC o BHK) a las que se les hace expresar temporalmente o expresan constitutivamente la polimerasa del fago T7 (polimerasa que está ausente en las células eucariontes) y células en las que se expresa ßgal bajo el promotor de la polimerasa T7. Después se fusionan ambas poblaciones celulares gracias a la expresión de pG en las membranas de una de ellas transfectada con el correspondiente plásmido. Para poner a punto este tipo de ensayo de fusión, se procedió a estudiar la expresión de ßgal utilizando distintos plásmidos (pT7Lac, pRnull, pGINT7) en células que expresaran la polimerasa T7 por transfección (pT7), por infección con vaccinia (VTF7-3) o por células de mamífero BHK productoras permanentes de T7.

**Para los ensayos de cotransfección secuencial primero se transfectaron EPC con un plásmido que codificaba la T7 polimerasa (pT7) y después con un plásmido que codificaba la ßgal bajo el promotor de la T7 (pT7Lac o pRnull). Para los ensayos de cotransfección simultánea se utilizaron mezclas de los dos plásmidos para una transfección única.

***Para la infección y transfección, por un lado, se infectaron células EPC con la cepa de Vaccinia VTF7-3 (multiplicidad de infección de 5 virus por célula) y después se transfectaron con plásmidos que tienen el gen de la ßgal bajo el promotor de la polimerasa T7 (pT7Lac, pRnull, pGINT7).

Mientras que la temperatura óptima para el funcionamiento de la T7 polimerasa es de 37ºC, la temperatura óptima a la que la pG de VSHV fusiona es de 14-20 ºC. Los resultados se expresan en número de veces el fondo (ßgal/fondo) calculados según la siguiente formula: cps en EPC transfectadas con T7 y ßgal / cps en EPC transfectadas con ßgal. Los resultados se dan en medias y desviaciones estándar de duplicados. Una expresión de ßgal suficiente para realizar el ensayo de fusión debería haber sido al menos de ~ 700 (Tabla 6).

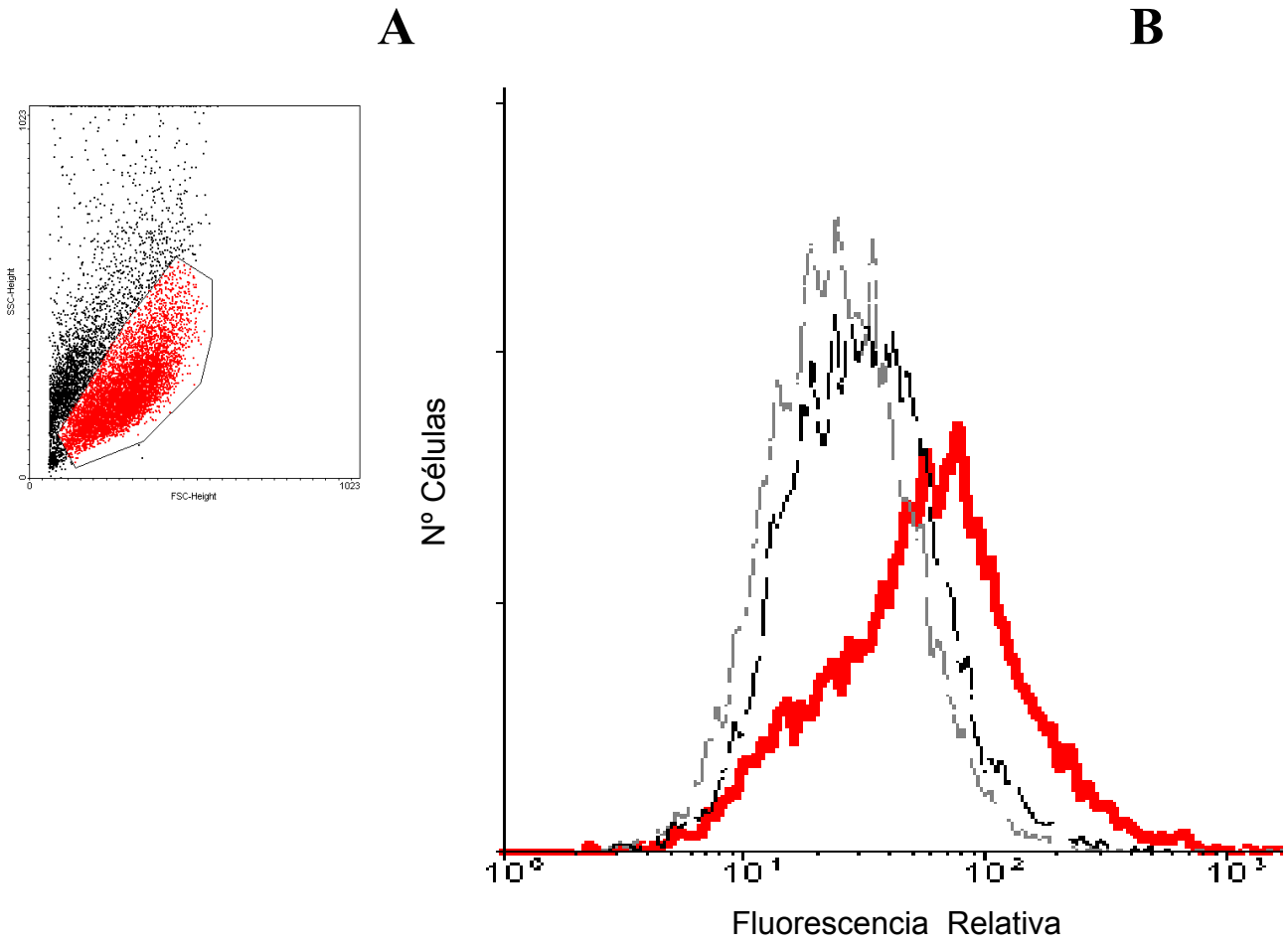



**Figura 17**. **Estimación de la expresión de pG por citometría de flujo de células EPC transfectadas con el plásmido pcDNA3.1G3**. Se transfectaron células EPC con pMCV1.4-G y 2 días después se tiñeron con Acs y anti IgGs de conejo hecho en cabra y marcado con FITC (GAR-FITC) (Caltag, San Francisco, USA) y se examinaron por FACS (Becton-Dickinson, San José, California) a 514-545 nm. **A)** De todas las células EPC solo se escogieron para representar la fluorescencia aquellas que no se marcaron con ioduro de propidio (marcador de ADN que marca las células muertas) y cuya región se recuadra en color rojo en la figura de complejidad (SSC) en función del tamaño (FSC) celular. **B)** Gris, células EPC no transfectadas y teñidas con anti-pG de VSHV. Negro, células EPC transfectadas con pMCV1.4-G y no teñidas con anti-pG de VSHV. Rojo, células EPC transfectadas con pMCV1.4-G y teñidas con anti-pG de VSHV. Resultados similares se obtuvieron utilizando el plásmido pMCV1.4-G.

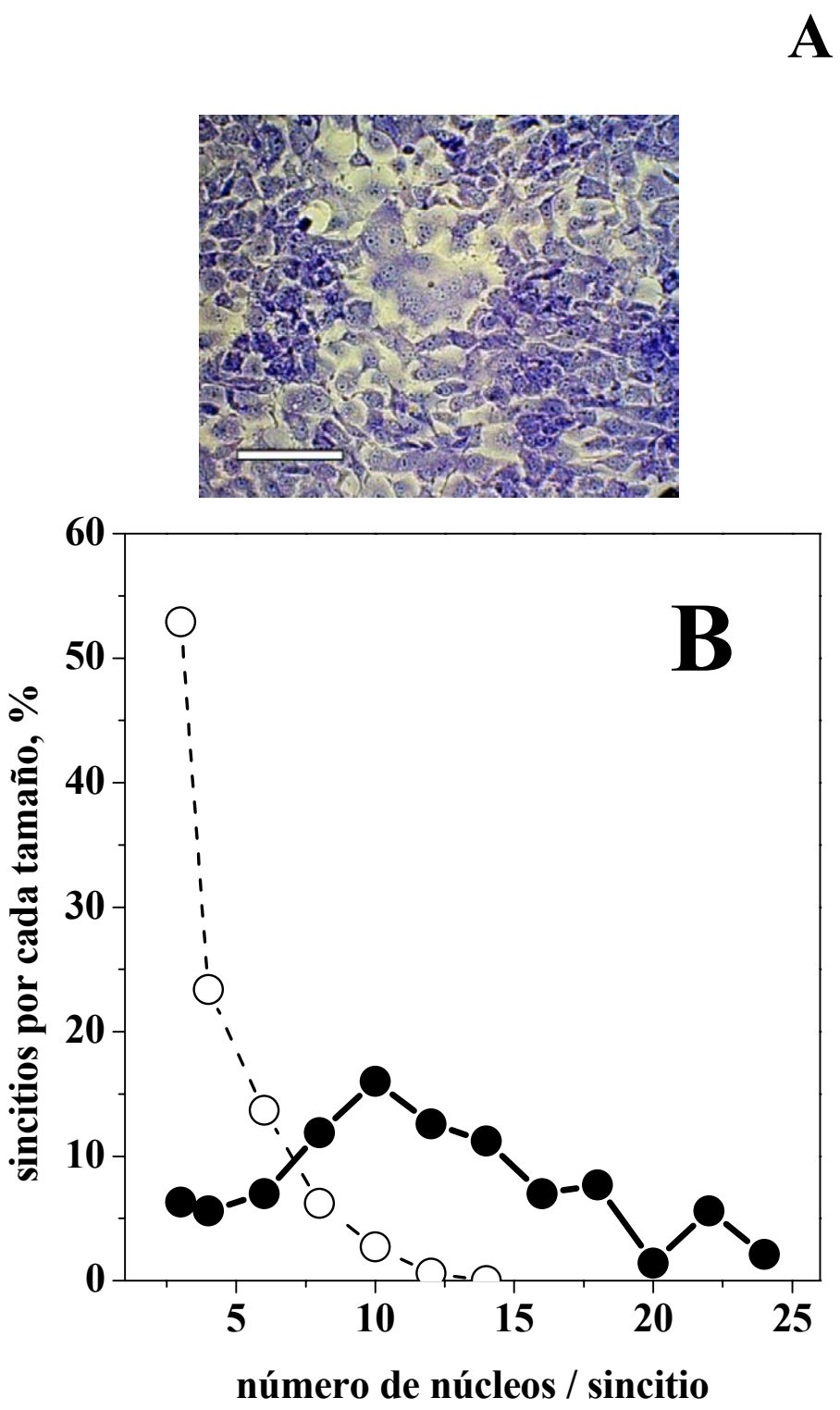



**Figura 18. Microfotografía (A) y distribución de tamaños (B) de los sincitios inducidos a pH 6 en monocapas de EPC transfectadas con pcDNAI/Amp-G3 (○) y pMCV1.4-G (●).** Quinientas mil células por pocillo de una placa de 24 pocillos se transfectaron con 0.6 µg de pcDNAI/Amp-G3 o pMCV1.4-G acomplejados con 2 µl de fugene en 400 µl de medio. A los 2 días las monocapas se incubaron durante 30 min a pH 6 y 2 h a pH 7.5 a 20 ºC. Después se fijaron, se tiñeron y se microfotografiaron. La barra blanca horizontal son 60 µm (**A**). El número de núcleos por sincitio y el número de sincitios se contaron en 200 sincitios (**B**).

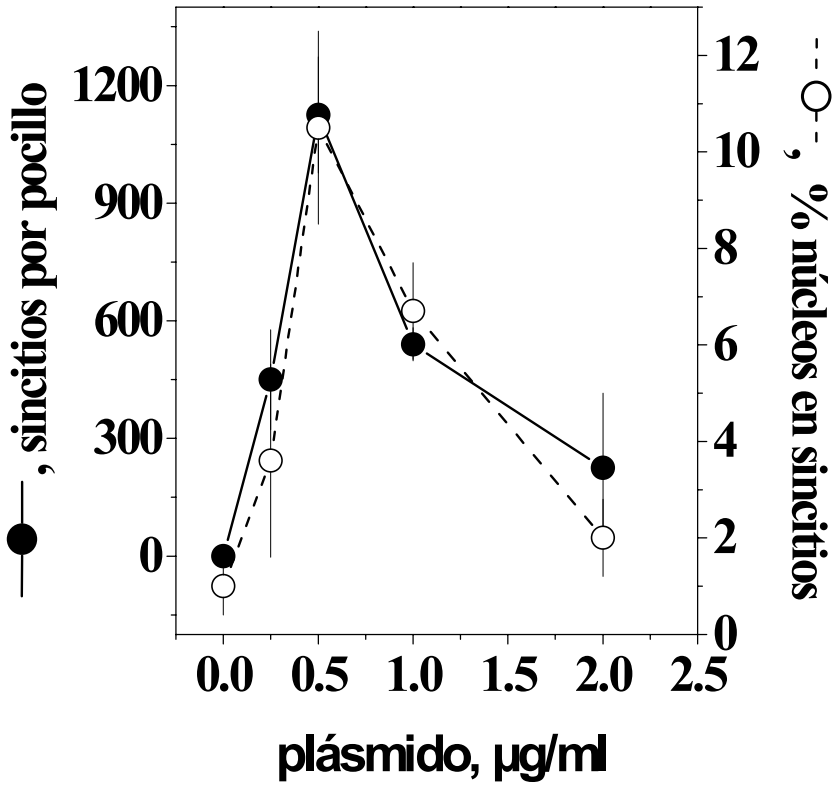



**Figura 19.- Número de sincitios y porcentaje de núcleos en sincitios detectados en monocapas EPC después de la transfección con distintas concentraciones de pcDNAI/Amp-G3**. Las células EPC se transfectaron con concentraciones diferentes de pcDNAI/Amp-G3 con 2 µl de fugene. El número de sincitios y el porcentaje de núcleos en sincitios se contó después de fijar y teñir las células. ●——●, número de sincitios por pocillo. ❍------❍, porcentaje de núcleos por sincitio. Resultados similares se obtuvieron utilizando pMCV1.4-G.

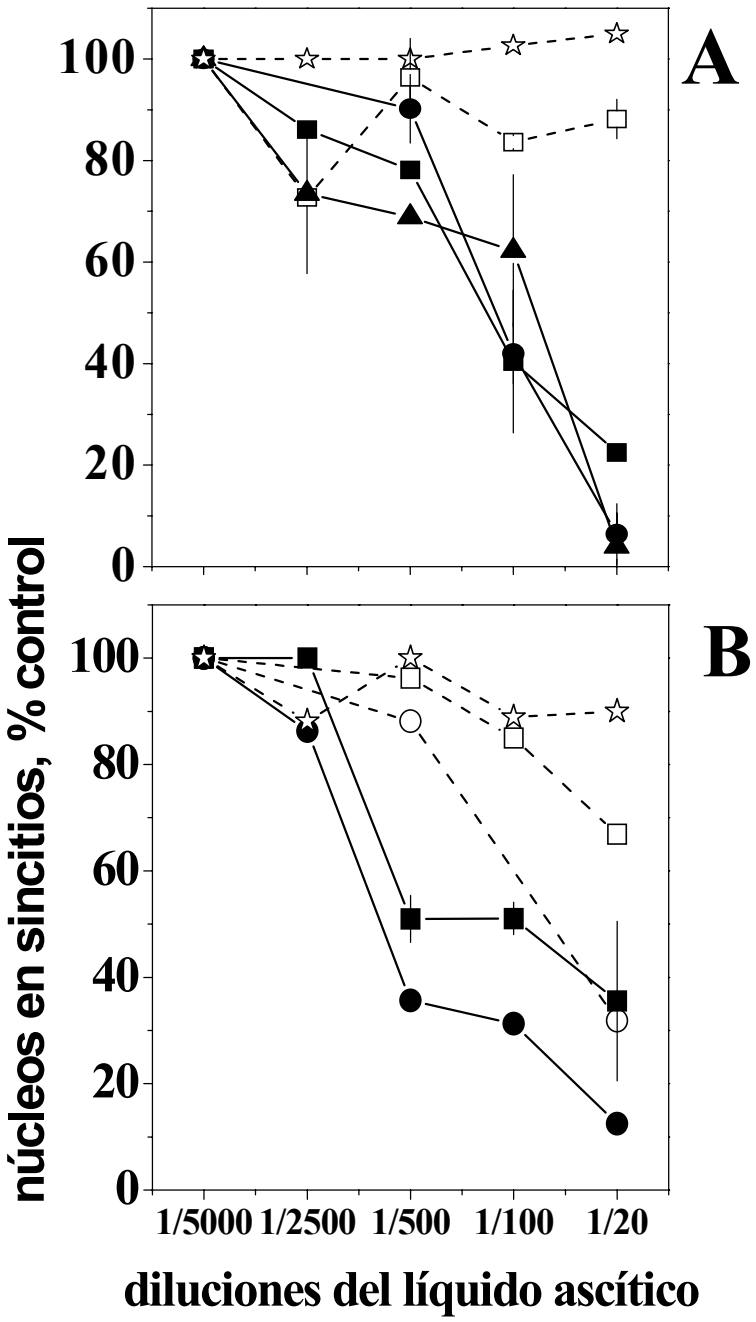



**Figura 20.- Inhibición de la formación de sincitios en células transfectadas con pG por AcM anti-G (A) y AcP anti VSHV o anti-G (B) obtenidos en ratón.** Las monocapas EPC transfectadas con G3-pcDNAI/Amp se incubaron 30 min a pH 6 y 14 ºC en presencia de anticuerpos, se lavaron a pH 7.6 y después de 2 h se fijaron y tiñeron. El porcentaje de núcleos en sincitios en ausencia de Acs fue de 25.3 ± 6.2 % (n=3). Los resultados se expresan en % del control según la formula: número de núcleos en sincitios en presencia de Acs / número de núcleos en ausencia de Acs x 100. Se representan las medias y desviaciones estándar de 2 determinaciones. **A)** --☆---, AcM anti-N VSHV 2C9 [Sanz, 1992 #1743]. ●, AcM C10 neutralizante anti-VSHV (mutantes resistentes mapean en 140 y 433) [Bearzotti, 1995 #883; Gaudin, 1999 #1914]; ■, AcM 2 F1A12 neutralizante anti-VSHV (mutantes resistentes mapean en 253) (Lorenzen, comunicación personal); ▲, AcM IP1H3, anti-VSHV pG (mapeado por pepscan en 399-413) [Fernandez-Alonso, 1999 #1373]; □, AcM 110, anti-VSHV pG (mapeado por pepscan en 139-153). **B)** --☆---, AcM 2C9, anti-VSHV N. ●,■,

Ascitis de ratones inmunizados con VSHV y saponina (título de neutralización ~ 1000); ○,□, Ascitis de ratones inmunizados con pG y Freund's (título de neutralización ~ 100).

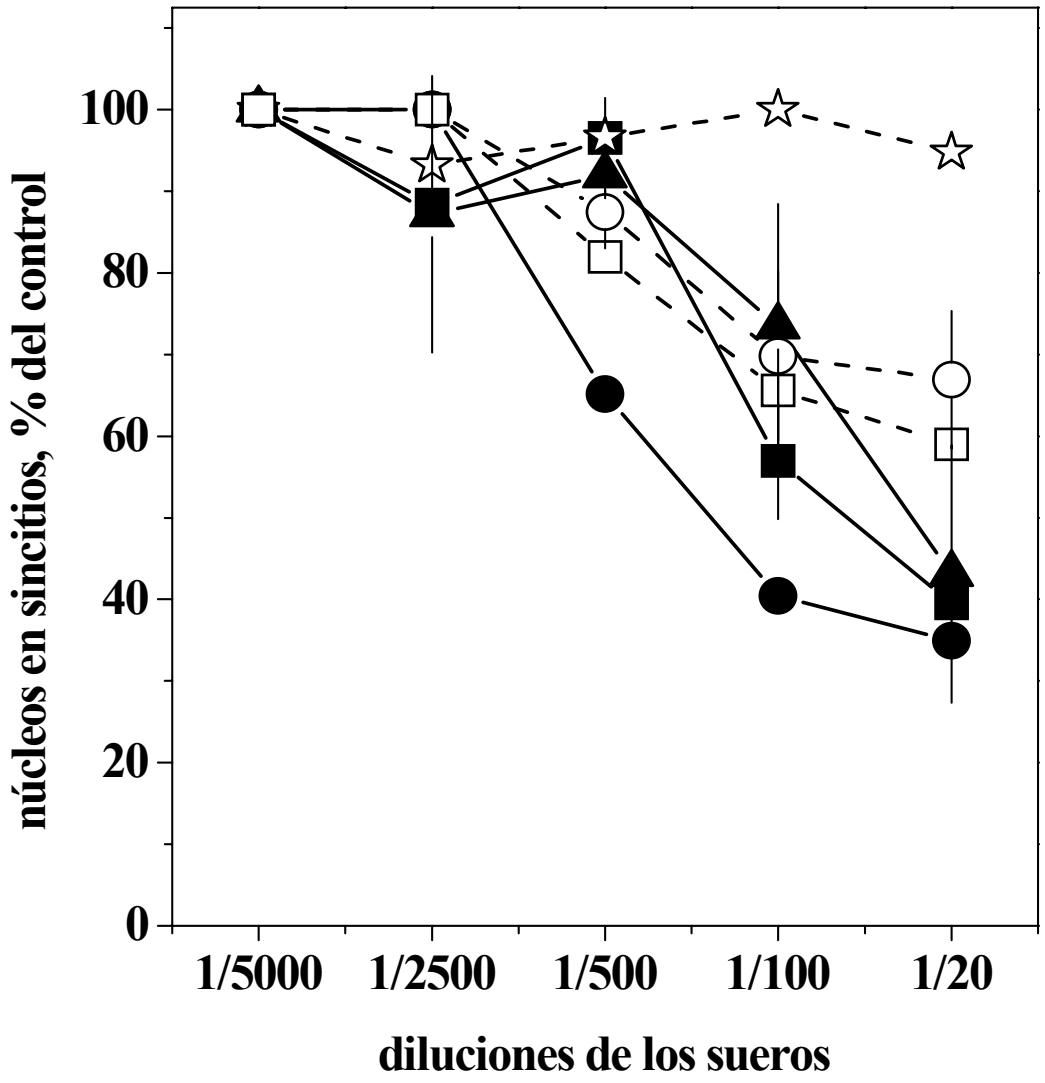



**Figura 21.- Inhibición de formación de sincitios de células transfectadas con pG por sueros de trucha.** Monocapas de EPC transfectadas con G3-pcDNAI/Amp se ensayaron por fusión en presencia de sueros de trucha como en la Figura 12. ☆- - - - -☆, suero procedente de truchas sanas (resultados similares se obtuvieron con otros 14 sueros de truchas sanas). ■,▲,□ sueros de truchas con títulos de neutralización ~ 100.000 (donados por el Dr. Kinkelin de Jouy-in-Josas, France y por el Dr. Lorenzen de Aarhus, Denmark). ●, suero de trucha (trucha #3) inmunizada con VSHV y saponina con títulos de neutralización de ~ 2000. ○, media y desviaciones estándar de dos sueros de trucha (truchas #1 y #2) inmunizadas con VSHV + pG y Freund's con títulos de neutralización de ~ 10.

## 4.4 ANÁLISIS DE MUTANTES.

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

Primeramente se reemplazaron cada uno de los aa de la secuencia original por una A. La única posición de esta secuencia que mostró variaciones en el estudio de los 22 aislados de VSHV (Figura 7), fue la S97N(D), por lo que también se incluyó en el estudio el mutante S97N en lugar del que le hubiera correspondido al mutante A96A. Además se incluyeron como controles 2 secuencias con la misma composición de aa que la original pero con el orden randomizado (secuencias: SVYRYHVAHASLGTR y RGHSAAHVSTYRLYV).

La Figura 22A muestra que la mayoría de los cambios de aa, no disminuyen significativamente la capacidad de ligamiento de PS a los peptidos mutantes del p2. Sin embargo, los cambios S97N (posición 96 en la Figura 22A) y el H102A, no solo no disminuían la capacidad de ligamiento de PS sino que aumentaban 2 veces la capacidad de unión de fosfolípidos de la secuencia original o de las secuencias randomizadas. Estos resultados sugieren que los cambios estudiados en posiciones 97 y 102 podrían aumentar o modular la capacidad de interacción del virus con las membranas celulares una vez introducidos en el virión. En todo caso sugieren posiciones a tener en cuenta en posibles estudios futuros y confirman la participación del p2 en el ligamiento de PS.

Después se estudiaron las influencias de los cambios de aa en la cabeza polar del p2 (2 R cargadas positivamente en posiciones 103 y 107) en el ligamiento de PS (fosfolípido aniónico, cargado negativamente). Para ello se hicieron sustituciones de las R por otros aa positivamente (K), poco positivamente (H) o negativamente (E) cargados. La Figura 22B muestra que el ligamiento de PS no cambia significativamente con la mayoría de las combinaciones estudiadas

(RK, RH, RE, KR, HR, ER, HK, HH y AA). La capacidad de ligamiento de PS de los mutantes, la secuencia original y las randomizadas fueron muy similares excepto en las combinaciones K-K o E-E que sí inhibían el 50 % del ligamiento de PS. Estos resultados sugieren que las interacciones iónicas no son tan importantes como las hidrofóbicas en el ligamiento de PS, al menos en la secuencia del p2 estudiada.

Para estudiar la posible influencia de la introducción de "codos" en la secuencia original en el ligamiento de PS, se introdujeron P en distintas posiciones en la estructura exceptuando las R de la cabeza polar (posiciones 90, 100, 101, 102, 104, 105 y 106) . Sin embargo, la introducción de una P en distintas posiciones no tenía efectos significativos en el ligamiento de PS comparados con el rango de ligamiento de PS entre la secuencia original y las randomizadas (Figura 22C).

Por otra parte, la introducción de 3-7 cambios simultáneos de aa por A, reducía la capacidad de ligamiento de PS proporcionalmente al número de A introducidas. Es decir el ligaminento de PS fue similar al original con 3 (SAVASGHYLHR**AAA**R y SAVASG**AA**L**A**RVTYR) y 4 sustituciones (SA**A**ASG**AA**L**A**RVTYR, AVASGHYLHR**AAAA**R y SA**A**ASGHYLHR**AAA**R), mientras que fue decreciendo con 5 (VASGHYLHR**AAAAA** y SAVASGHYLH**AAAAA)** y con 7 sustituciones (SAVASG**AAAA**R**AAA**R), independientemente de la localización en la secuencia (Figura 22D). Estos resultados demuestran que la capacidad de ligamiento de PS es dependiente de la secuencia y que puede ser disminuida al hacer cambios en ella.

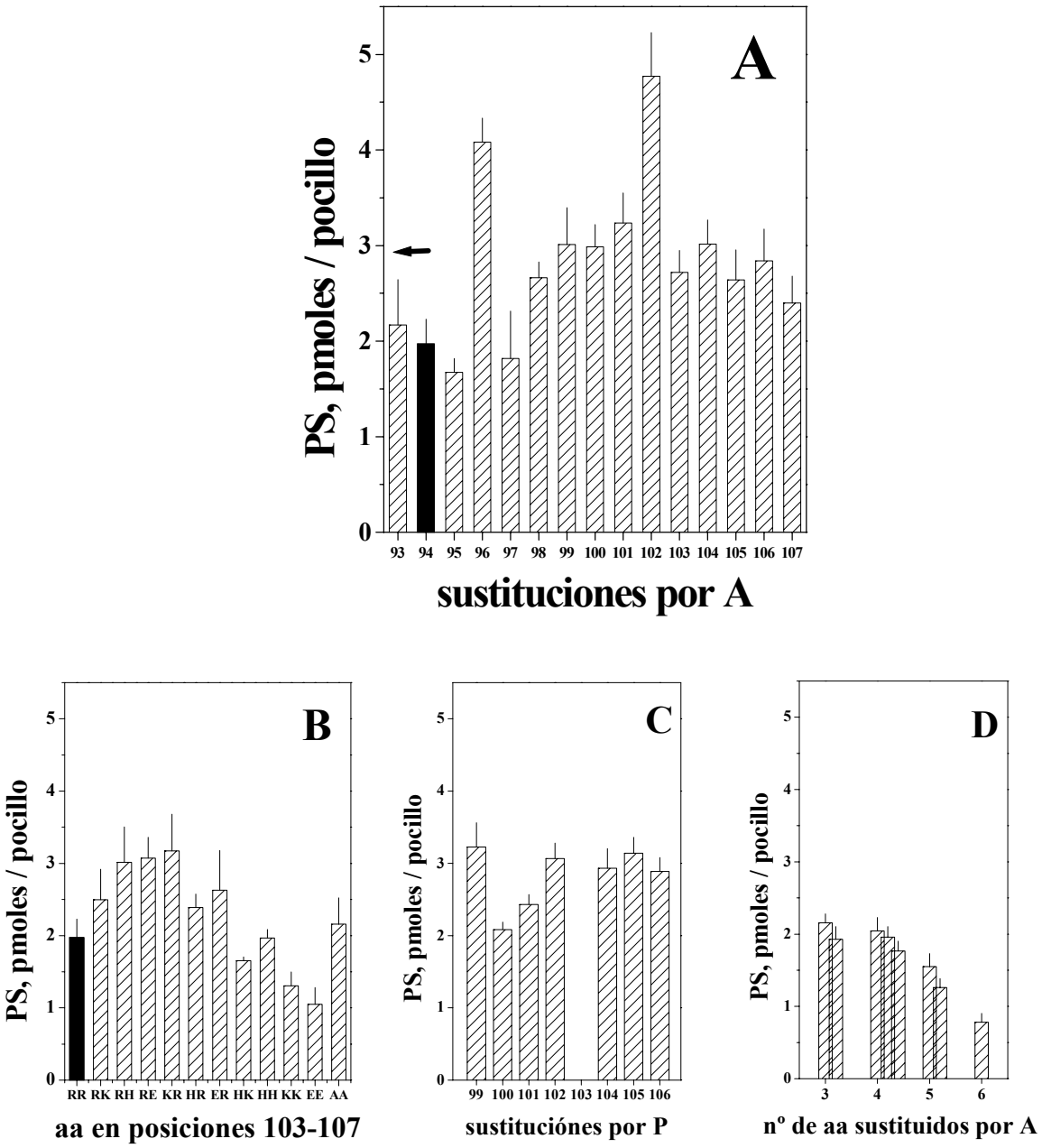



**Figura 22. Ligamiento de PS por peptidos derivados del p2 con mutaciones.** El peptido p2 $^{93}$SAVASGHYLHRVTYR$^{107}$ que contiene parte de las heptadas repetidas y la cabeza cargada positivamente se sintetizó con aa reemplazados en diversas posiciones. El ligamiento de PS marcado se estimó con los peptidos en fase sólida como se describe en métodos. El fondo de marcaje se restó de todos los datos obtenidos y se transformaron en pmoles. Las barras en negro corresponden a la secuencia original aa 93-107 del p2. La flecha horizontal corresponde a la media de los 2 peptidos randomizados (secuencias: SVYRYHVAHASLGTR y RGHSAAHVSTYRLYV). Se representan las medias y las desviaciones standard de dos experimentos cada uno de ellos por triplicado. **A**, cada una de las posiciones se fueron sustituyendo por una A (excepto la 96 que por ser también A se diseño como la S97N). **B**, las posiciones 103 y 107 se fueron sustituyendo por los aa que se indican en la abcisa**. C**, cada una de las posiciones indicadas se sustituyó por una P. **D**, se sintetizaron las siguientes secuencias de izquierda a derecha con las sustituciones en negritas. Con 3 sustituciones: SAVASGHYLHR**AAA**R y SAVASG**AA**L**A**RVTYR. Con 4 sustituciones: SA**A**ASG**AA**L**A**RVTYR, AVASGHYLHR**AAAA**R y SA**A**ASGHYLHR**AAA**R. Con 5 sustituciones: VASGHYLHR**AAAAA** y SAVASGHYLH**AAAAA**. Con 7 sustituciones: SAVASG**AAAA**R**AAA**R

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

a) los que podrían afectar a codos en la estructura altamente conservados, tales como las P y G (P65A, P79A, P86A, G98A y el doble mutante P86AG98A),

b) los que afectan a las heptadas hidrofóbicas (que se han mutado a un aa hidrófilo S o cargado E: I82S, L85S, V92S, A96E y el doble mutante G98AH99S),

c) los que afectan a las cargas positivas de la cabeza del p2 (R en posiciones 103 y 107 que se han mutado a A),

d) los que afectan a la zona p3 y a la zona hidrófila p4 (F115K y T135E), y

e) los que afectan a posiciones homologas en el peptido de fusión en VSV que están en las posiciones F147, P148 y W154 de VSHV (que se han mutado a K, un aa cargado) y que pertenecen al motivo conservado (**F**,Y)**P**XPXXCX(**W**,F).

**4.4.3. Expresión en EPC de los mutantes de pG.** La expresión de la pG en células de EPC transfectadas con los pMCV1.4-G mutantes se comprobó tanto en su citoplasma como en su membrana. En el citoplasma por inmunofluorescencia de células permeabilizadas y en la membrana por FACS de células intactas, utilizando para reconocer la pG, AcPs anti-pG obtenidos en conejos inmunizados con pG purificada.

En todos los mutantes se obtuvieron fluorescencias positivas en el citoplasma de las células EPC transfectadas cuando se permeabilizaron las células (Figura 23). Excepto el mutante I82S, todos los demás también se detectaron en las membranas de las células EPC transfectadas. La Figura 24 muestra los perfiles de intensidad de inmunofluorescencia/número de células obtenidos por FACS con los mutantes estudiados. El porcentaje de células con expresión positiva de pG en sus membranas variaba entre el 42.5 y el 77.2 % de las células transfectadas (n = 2-4 experimentos por mutante y 5000 células por experimento) (Tabla 11). Dada la poca variación de estas estimaciones, los datos sugieren que los mutantes de pG no difieren en su

expresión en membrana (excepto el mutante I82S). Sin embargo, cuando se utilizó el AcM C10 (que reconoce epítopos conformacionales implicados en la neutralización de la infectividad de VSHV y que mapea simultáneamente en los aa 140 y 433), solo la pG no mutante era reconocida por dicho Ac, sugiriendo que todas las mutaciones obtenidas y analizadas afectan la conformación de la pG en la región mutada. No es posible deducir ninguna propiedad similar en el mutante I82S.

**4.4.3. Dependencia del pH en la fusión de mutantes de pG.** Después, se realizaron ensayos de fusión a distintos pH entre 5 y 8 con células EPC transfectadas con los mutantes obtenidos. La Figura 25 muestra que la formación de sincitios se redujo a valores de fondo obtenidos con células EPC sin transfectar en la mayoría de los mutantes obtenidos, excepto en los P79A, L85S, R103A y T135E. La Tabla 11 muestra la cuantificación de la fusión (medias de 2-3 experimentos por mutante).

Los valores medios obtenidos de los porcentajes de núcleos en sincitios pueden ser agrupados en 2 tipos: entre 1.6-2.8 % (correspondientes a los mutantes afectados en fusión: P65A, P86A, G98A, P86AG98A, A96E, G98AH99S, R107A, F115K, F147K, P148K y W154K) y entre 10.5-24.8 % (correspondientes a los mutantes que seguían fusionando, si bien con menor actividad que la pG no mutante: P79A, L85S, R103A y T135E ). Los porcentajes de núcleos en sincitios obtenidos en células transfectadas con la pG no mutante fueron del 45.8 % mientras que en el control negativo de células EPC no transfectadas fueron del 1.3 % (n = 3000). Por lo tanto, todos los mutantes obtenidos que afectan a las posiciones conservadas del peptido de fusión homologo al del VSV (**F**,Y)**P**XPXXCX(**W**,F) (posiciones F147, P148 y W154) eran incapaces de fusionar, confirmando su implicación en el proceso de fusión de VSHV tal y como ocurre en VSV.

Por otra parte, en el caso de los mutantes que conservaban la capacidad de formación de sincitios, el pH óptimo de la formación de sincitios se desplazaba hacia pH más acidos (Figura 25), variando del pH 5.6 para la pG no mutada, al pH 5.3 para el mutante P79A y pH 5 para los

mutantes L85S, R103A y T135E. El resto de los mutantes cuya formación de sincitios resultó inhibida, no mostraban formación de sincitios en ninguno de los pH estudiados (5, 5.3, 5.6, 6, 6.3, 6.6, 7 y 7.3).

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

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

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

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

***, los resultados de la fusión al pH óptimo se dan en porcentaje de núcleos en sincitios > 3 células/sincitio (n ~1300, 4 campos de x100). En la Tabla se da el pH en el que el % fue mayor. La estimación del número de sincitios detectados en una monocapa sin transfectar fue del 1.3 % (n=1300) aunque el 95 % de ellos solo tenía 3 células.

En negritas se resaltan los mutantes que son incapaces de fusionar en el intervalo de pH de 5 a 7.3 (Figura 25). En rojo los mutantes que conservan un porcentaje de fusión alto. El mutante I82S, puesto que no se expresa en membrana no puede saberse si afecta a la fusión o no.

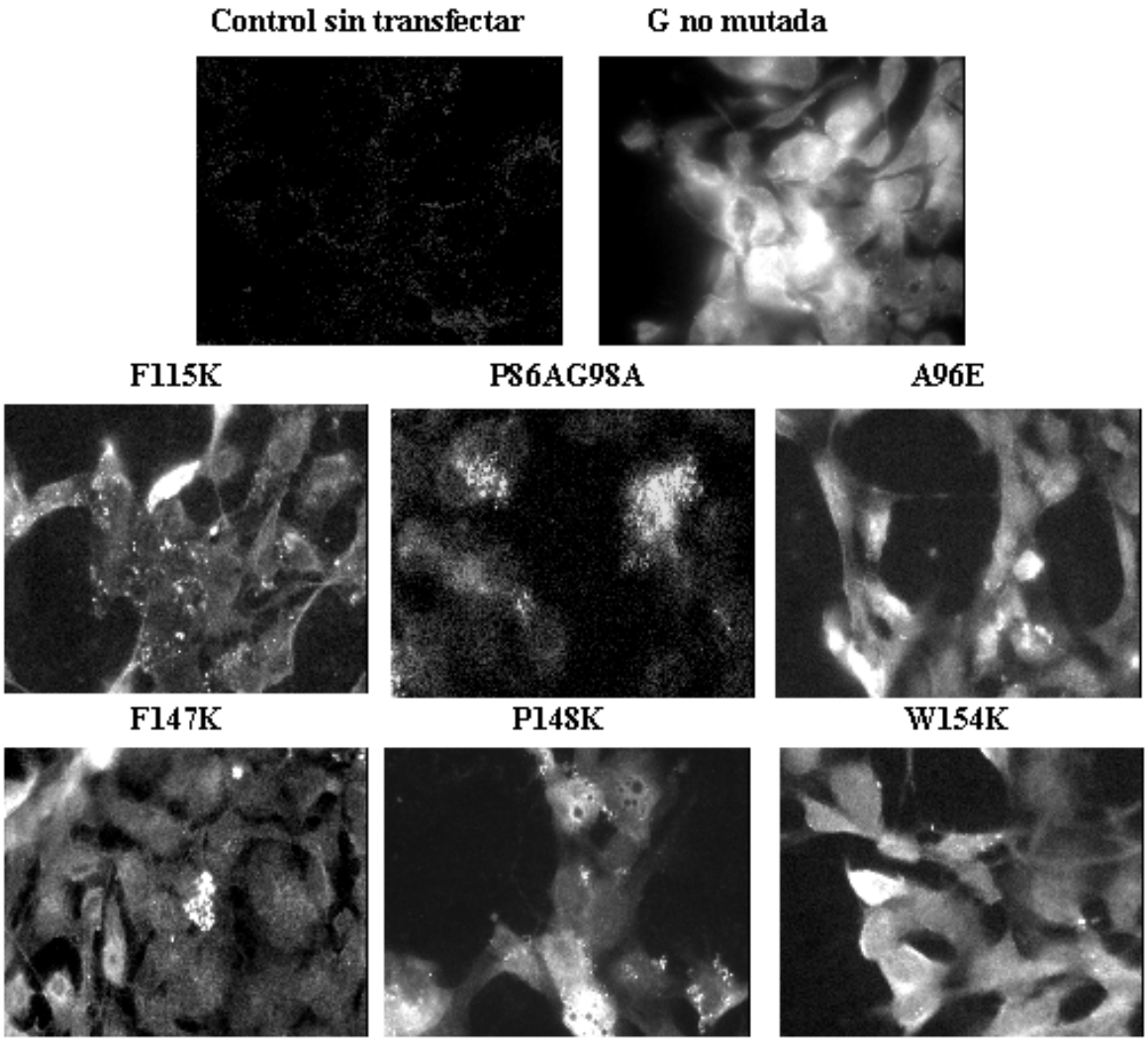



**Figura 23. Estimación cualitativa de la expresión de pG en el citoplasma de células EPC transfectadas con el plásmido pMCV1.4-G y los distintos mutantes por inmunofluorescencia indirecta**. Se transfectaron células EPC con plásmidos pMCV1.4 codificando los distintos mutantes de la pG de VSHV. Dos días después se permeabilizaron y se tiñeron con AcP obtenidos en conejo anti-G de VSHV (cedidos por el Dr. Niels Lorenzen, Aarhus, Dinamarca) y anti- IgG de conejo obtenidos en cabra y marcados con FITC (GAR-FITC). Todos los mutantes mostraron fluorescencia positiva en el citoplasma (Tabla 11). En la figura se muestran algunos de ellos.

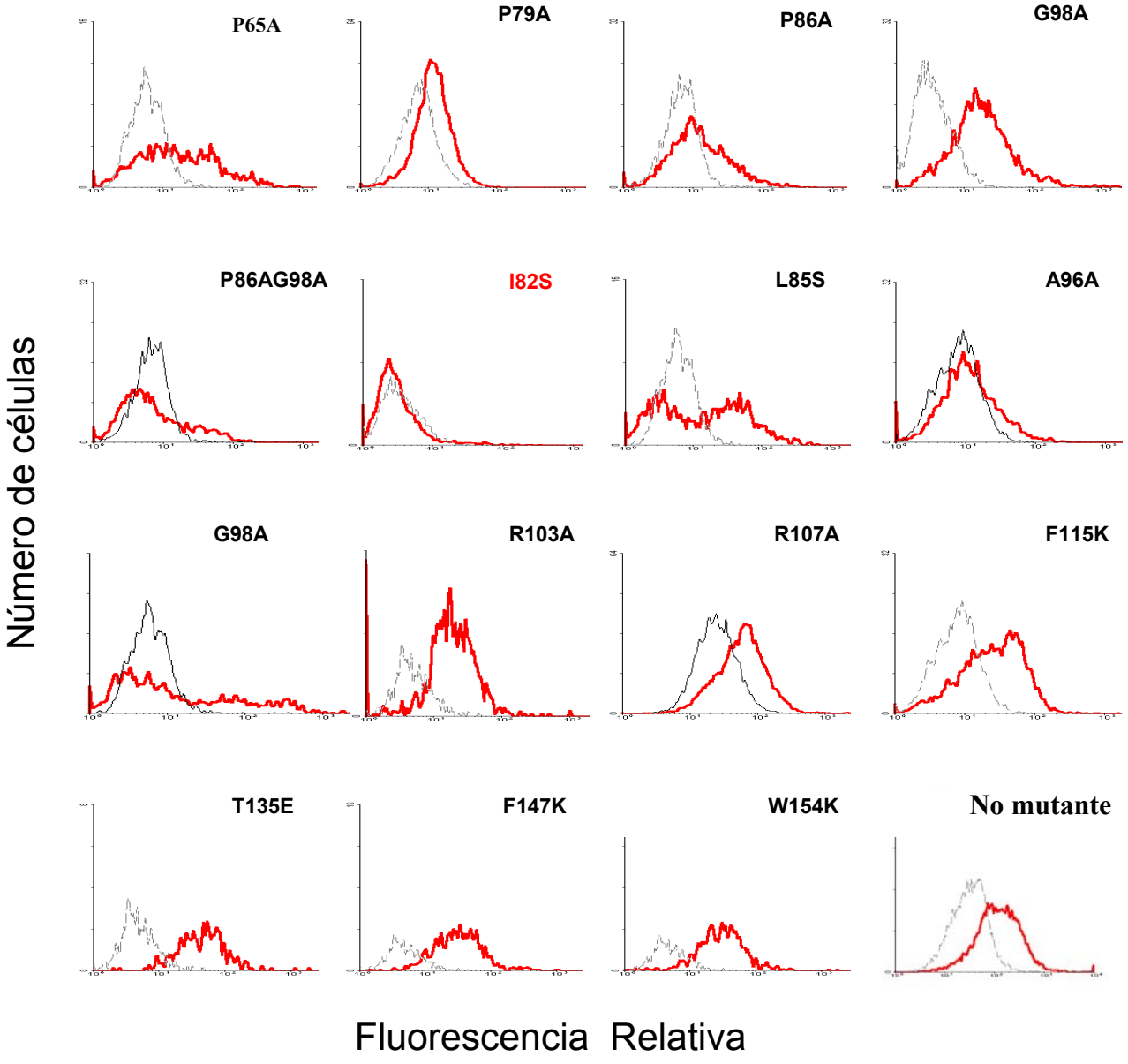



**Figura 24. Estimación de la expresión de pG en membrana por citometría de flujo de células EPC transfectadas con los plásmidos pMCV1.4-G mutantes** . Se transfectaron células EPC con plásmidos pMCV1.4 codificando los distintos mutantes de la pG de VSHV. Dos días después se tiñeron con AcP obtenidos en conejo anti-G de VSHV y anti- IgG de conejo obtenidos en cabra y marcados con FITC (GAR-FITC). Gris, células EPC transfectadas con los distintos mutantes y no teñidas con anti-pG VSHV pero si con GAR-FITC. Rojo, células EPC transfectadas con los distintos mutantes y teñidas con anti-pG VSHV y GAR-FITC. La expresión de cada mutante en las membranas de las células EPC transfectadas se estimó en 2-3 experimentos (Tabla 11), en la figura se muestra el más representativo. El mutante P148K se ha omitido de la figura para mayor claridad. Nótese que el mutante I82S no se expresaba en membrana.

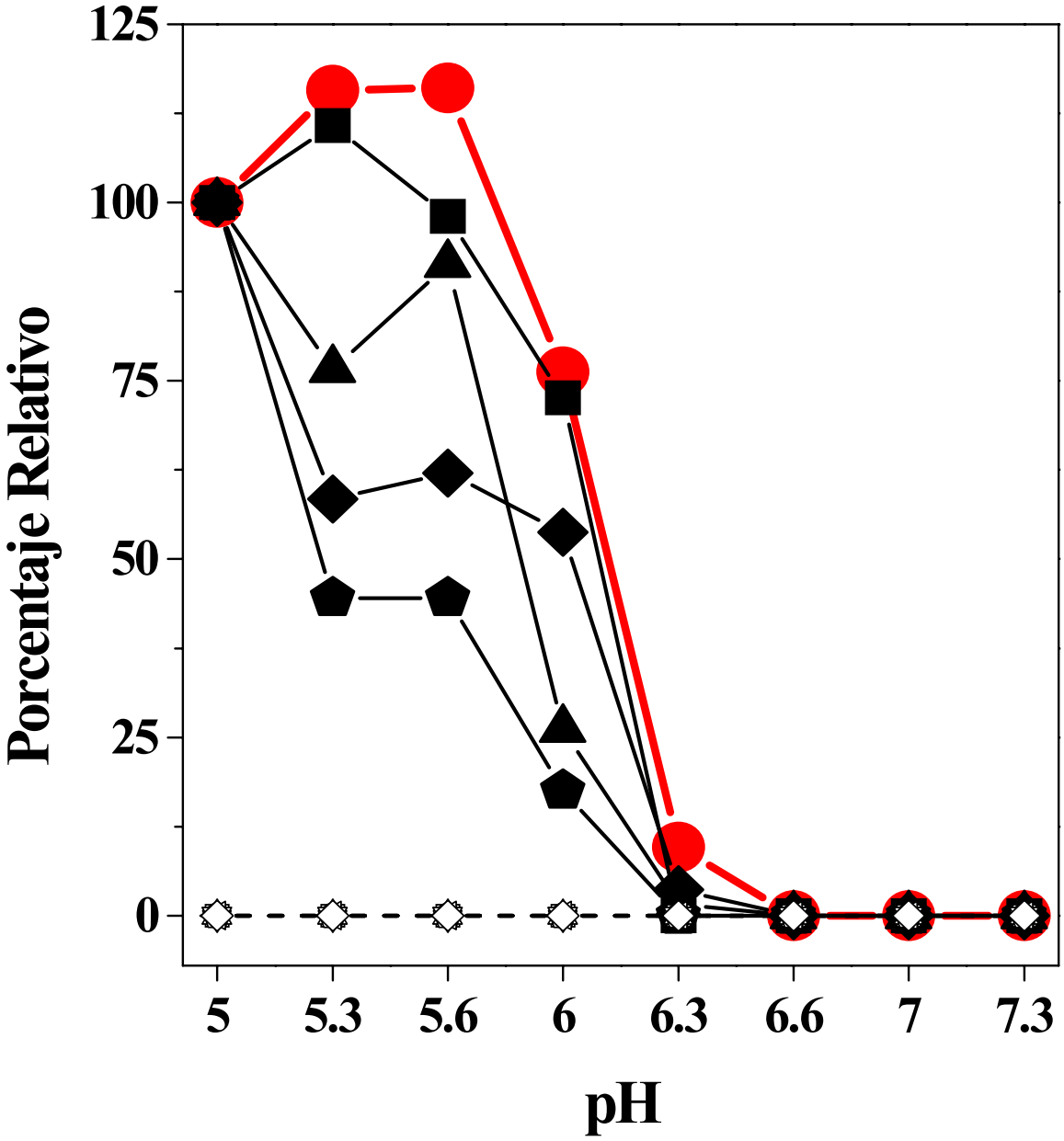



**Figura 25. Estimación de la fusión de células EPC transfectadas con los plásmidos mutantes a distintos pHs.** Se transfectaron células EPC con plásmidos pMCV1.4 con los distintos mutantes. Dos días después las monocapas se sometieron a los pHs que se muestran en la figura. Después de teñir se contaron los porcentaje de núcleos en sincitios > 3 células / sincitio (n=1300). El porcentaje relativo de fusión se ha calculado para cada mutante con la siguiente formula: % de núcleos en sincitios a los distintos pHs / % de núcleos en sincitios a pH 5 x 100. Los números representados son las medias de, al menos 2 experimentos por punto. Las desviaciones estándar se han omitido para una mayor claridad. ●, no mutante. ■, P79A. ◆, R103A. ▲, L85S. ⬟, T135E. ○, P65A. △, P86A. ☆, P86AG98A. ◇, R107A. □, F115K. ⬠, F147K. ▽, W154K. ⊠, P148K. ⬗, I82S. ⊕, A96E.

# 5. DISCUSIÓN

## 5.1. PUESTA A PUNTO DE UN ENSAYO DE FUSIÓN

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

Las condiciones óptimas de transfección para células de pez se estudiaron en la línea celular EPC (derivadas de carpa), dado que: es una línea celular bien caracterizada que crece a 28 ºC, es el mejor modelo pronosticador de la actividad de construcciones plasmídicas en peces transgénicos [Moav, 1992 #1923] y se transfectan mejor que las líneas celulares RTG-2 o RTH (derivadas de trucha que crecen a 20 ºC) [Bearzotti, 1992 #1387].

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

Aunque estudios recientes realizados en nuestro laboratorio seleccionaron como mejor agente de transfección para células EPC al fugene (Roche) [Lopez, 2001 #1942], se reevaluó su selección volviendo a ensayarlo junto con nuevos agentes de transfección comerciales aparecidos en los últimos años. Los resultados obtenidos volvieron a demostrar que el fugene seguía siendo el agente transfectante más eficaz, tanto por inducir las mayores actividades de

ßgal como por ser de manipular sencilla. Después de mezclar el fugene y el plásmido, la mezcla se añade a las monocapas de EPC en presencia de medio de cultivo celular.

El estudio reveló la importancia de la relación de concentraciones entre el pCMVß y el reactivo transfectante. Los mejores resultados se obtuvieron con una relación fugene/pCMVß de ~ 3 µl/µg. La concentración del pCMVß es también muy crítica. Un exceso en la concentración de pCMVß disminuye la actividad de ßgal obtenida después de la transfección debido a mecanismos de naturaleza desconocida. Para obtener los mejores resultados la concentración final de pCMVß en contacto con las células EPC debía mantenerse en ~ 1.5 µg/ml. Fuera de estos estrechos límites de concentración del pCMVß/fugene, el nivel de transfección desciende a valores de fondo.

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

**5.1.2. Mejora de las eficiencias de transfección.** Inicialmente partíamos de una eficiencia de transfección media del 16% con un rango de 5-37% (n=60) [Lopez, 2001 #1942]. Se hizo un esfuerzo para aumentar esta eficiencia de transfección de cara a usar el ensayo para fusión después de transfectar EPC con plásmidos codificando mutantes de pG.

Dado que el 90-100% de los complejos ADN-liposoma transfectados entran en las células [Tseng, 1999 #2095; Scherman, 1998 #2113] pero no todos translocan a través del endosoma/lisosoma y núcleo, se han estudiado métodos para aumentar la eficiencia de transfección y su reproducibilidad en estos 2 pasos. Se han ensayado: la adición de agentes lisosomotrópicos que controlan la disminución de pH en los lisosomas [Luthman, 1983 #2096; Ciftci, 2001 #2145; Lam,

2000 #1941] y el control de la mitosis para facilitar la entrada del ADN al núcleo [Tseng, 1999 #2095; Brunner, 2000 #2158; Mortimer, 1999 #2159; Chan, 1998 #2149; Escriou, 2001 #2156].

Ya que los agentes lisosomotrópicos evitan la disminución de pH del lisosoma y la posible degradación del ADN introducido en células de mamífero [Morales, 1999 #2150], se ensayó el uso de: calcio [Haberland, 1999 #2154; Lam, 2000 #1941], cloroquina [Luthman, 1983 #2096; Bettinger, 2001 #2148] y cloruro amónico [Ciftci, 2001 #2145] en la eficiencia de transfección de células EPC. Sin embargo ninguno de los compuestos mencionados aumentaba reproduciblemente el porcentaje de células EPC teñidas con Xgal. Este resultado sugiere que los complejos ADN-fugene no pasan por la ruta endosoma/lisosoma, no hay degradación del ADN a través de esa ruta o no hay efecto de los compuestos analizados en esa degradación.

Los primeros experimentos demostraron que la eficiencia de transfección era dependiente tanto de la concentración celular como del tiempo transcurrido desde que se inicia el cultivo (Figura 13AB), lo que sugería una dependencia directa del ciclo celular. Dicha dependencia fue demostrada por el aumento de unas 2 veces en la eficiencia de transfección cuando se añadían antes de la transfección tanto colchicina durante 15 h (34 % del ciclo celular) como timidina durante 5 h (11 % del ciclo celular) (Figura 14). Resultados muy similares aunque diferentes en el número de h de los tratamientos con colchicina o timidina se habían encontrado ya en células de mamífero [Tseng, 1999 #2095; Brunner, 2000 #2158; Escriou, 2001 #2156; Mortimer, 1999 #2159].

**5.1.3. Eficiencia de distintos promotores.** Utilizando el promotor de citomegalovirus (CMV) se consiguieron mayores eficiencias de transfección que con el de SV40 (datos no mostrados). Ahora bien, aunque todos los promotores comerciales de CMV poseen un mínimo de 100 pb, difieren en la longitud de sus secuencias 5' (Tabla 4), por lo que se ensayaron distintos promotores de CMV. Al ensayar los plásmidos pCMVß y pMOKßgal, se demostró un aumento de 2-3 veces en la expresión de ßgal cuando se utilizó el plásmido con mayor longitud de secuencias 5' (pMOKßgal). El aumento de expresión de ßgal estimado por luminiscencia podía llegar a ser de 10 veces (Figura 15), sugiriendo que el uso del promotor largo no solo aumentaba el porcentaje de

células que expresaban ßgal sino también la expresión por cada célula transfectada. Además, en algunos experimentos el aumento de transfección permitía visualizar monocapas azules. Sin embargo, el porcentaje de células transfectadas permanecía variable de experimento a experimento.

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

Por lo tanto, usando el gen ßgal insertado en pMCV1.4 y efectuando la transfección con células tratadas con cloroquina o timidina se ha aumentado 2-4 veces la eficiencia de transfección de partida. Los estudios de expresión heteróloga en peces transgénicos [Chen, 1995 #1092; Chourrout, 1986 #1010; Walker, 1995 #1025], los ensayos cuantitativos de fusión viral con pG transfectada objeto de este estudio tal y como se hace en mamíferos [Shokralla, 1999 #1884; Fernandez-Alonso, 1999 #1904; Coll, 1999, #1905; Nussbaum, 1994 #1917] y la síntesis de rabdovirus ARN negativo de peces infeccioso a partir de su cADN [Biacchesi, 2000 #1956; Biacchesi, 2000 #2002; Biacchesi, 2002 #2324; Estepa, 1999 #1903; Biacchesi, 2002 #2393], se beneficiarán de la optimización de la eficiencia de transfección de la línea celular EPC (la más utilizada para estos tipos de experimentación). Por otra parte, la aplicación de estos resultados pueden servir para optimizar vectores para su uso en vacunación ADN tanto por inyección [Anderson, 1996 #1217; Lorenzen, 1998 #1378], como por inmersión [Fernandez-Alonso, 1998 #1506; Fernandez-Alonso, 1999 #1882, Fernandez-Alonso, 2000 #2074; Fernandez-Alonso, 2001 #2039].

**5.1.4. Métodos ensayados para cuantificar la fusión.** Tras la unión a su receptor celular a través de la pG, el VSHV es endocitado y su membrana fusionada con la de las células [Bearzotti, 1999 #1516; Gaudin, 1993 #545; Coll, 1995 #803] al pH 5-6 de los endosomas/lisosomas [Coll, 1999 #1905; Gaudin, 1999 #1914; Gaudin, 1999 #2031]. Dadas las propiedades fusogénicas de la pG cuando esta se expresa en la membrana plasmática de las células infectadas con VSHV [Estepa, 1997 #1284; Fernandez-Alonso, 1999 #1904] o transfectadas con pG [Lecocq-Xhonneux, 1994 #777], tras disminuir el pH se fusionan células adyacentes en la monocapa y se forman sincitios [Estepa, 1997 #1284; Estepa, 2001 #2003; Lecocq-Xhonneux, 1994 #777].

Para cuantificar la formación de sincitios se han ensayado 3 métodos. La transferencia de energía de fluorescencia entre fluoróforos situados en las membranas de las células a fusionar, la transcripción de los genes ßgal/pG bajo el promotor de T7 en una célula por la T7 polimerasa proporcionada por otra célula tras la fusión y la formación de sincitios cuantificables por microscopía óptica.

Los ensayos de transferencia de energía de fluorescencia no generaron señales de fluorescencia que permitieran distinguir entre células fusionadas y sin fusionar. Los ensayos de transcripción con la polimerasa T7 demostraron la importancia de la temperatura para obtener células EPC con actividad T7 polimerasa a las bajas temperaturas necesarias para obtener expresión funcional de la pG (la pG sólo era activa en fusión a < 20 ºC). Para utilizar el sistema dual basado en el virus vacunal y la T7 polimerasa y su promotor [Lawson, 1995 #1532], los protocolos exigen el uso de incubaciones a 37ºC. Sin embargo, la cantidad de ßgal/pG detectada después de transfección de células EPC a 37ºC fue muy baja. La transfección de EPC ocurre con mayor eficiencia a 28-30 ºC, la temperatura óptima de la EPC o a temperaturas inferiores [Fijan, 1983 #1906]. Sin embargo a esa temperatura la expresión de la T7 polimerasa no era suficiente para detectar la expresión de los genes ßgal/pG colocados bajo su control.

Como ni el método basado en transferencia de energía de fluorescencia ni en la activación de la T7-ßgal/pG por la T7 polimerasa fueron útiles para cuantificar la fusión

inducida por la pG en células EPC transfectadas, se optimizó el ensayo basado en la formación de sincitios.

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

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

En presencia de ascitis de ratón o sueros de trucha inmunizados con VSHV, el número de núcleos en sincitios se reducía hasta valores de fondo en contraste con los obtenidos en presencia de ascitis o sueros de animales control. Estos datos demostraban por una parte que la fusión es debida a la expresión de pG en la membrana de las células transfectadas y que el ensayo de formación de sincitios de células transfectadas con pG podía usarse para ensayo de fusión de VSHV así como para ensayo de Ac anti-fusión (de importancia práctica para test de campo).

Aunque los AcP anti-VSHV, los AcP anti-frg#11, los AcM neutralizantes y los sueros de trucha con alto título de neutralización mostraron también los títulos más altos de inhibición de la fusión, fue difícil reducir la fusión al 0 % [Estepa, 2001 #2003]. Este fenómeno podría deberse a que el cambio de conformación inducido por el pH es muy rápido y dificulta el reconocimiento y reacción con los Acs.

**5.1.6. Aplicación a la detección de Ac anti-VSHV en ausencia de VSHV.** Las rabdovirosis de peces, incluyendo la producida por VSHV, son una de las enfermedades infecto-contagiosas más devastadoras en la acuicultura de salmónidos [Lorenzen, 2000 #2009], siendo el transporte de peces vivos una de las maneras más comunes de diseminación de la enfermedad [DeKinkelin, 1995 #882].

Los métodos tradicionales basados en los ensayos de neutralización requieren el uso de rabdovirus vivos y ello no se permite en todos los países [Jorgensen, 1991 #742; Lorenzo, 1996 #833]. Por otra parte, todavía existen problemas técnicos para detectar los Acs anti-VSHV por ELISA basados en captura por VSHV [Olesen, 1991 #390] o por pG/frg#11 recombinantes [Rocha, 2002 #2038] en fase sólida. Por todo ello, el uso de la inhibición de la formación de sincitios podría aplicarse a la detección de Acs anti-VSHV en portadores asintomáticos [Lorenzen, 1999 #1880], sobre todo en aquellos países en los que no se permite usar rabdovirus vivos, por no haberse detectado en ellos estas infecciones.

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

Debido a que los Acs de trucha anti-fusión de VSHV no se han ensayado antes, también se desconoce la importancia que puedan tener en la respuesta defensiva contra la enfermedad. La detección de dichos Acs podría ser útil en unión con otros métodos de detección de Acs neutralizantes y no neutralizantes de VSHV en sueros de trucha para ayudar al desarrollo de nuevas vacunas. La estimación de Acs anti-fusión podría ayudar a diseccionar las complejas respuestas inmunológicas de la trucha a las infecciones de VSHV y a la vacunación ADN [Lorenzen, 2002 #2386]. Ensayos similares también podrían utilizarse en otros rabdovirus de peces tales como el VNHI o el SVCV.

## 5.3 SELECCIÓN DE LOS SEGMENTOS Y MUTANTES

A pesar de las diferencias en las secuencias de aa, el alineamiento de 14 secuencias de pG igualmente representativas de 4 géneros de rabdovirus animales (vesiculovirus, lisavirus, efemerovirus y Novirabdovirus) [Walker, 1999 #2010], puso de manifiesto que existen zonas conservadas en la región del ligamiento de fosfolípidos (frg#11) y peptido de fusión (Figura 5, 6 y 7). Entre las semejanzas más importantes que pueden encontrarse entre todos los rabdovirus están: (i) las regiones de ligamiento de fosfolípidos están flanqueadas por C:I y C:III (C:I unida a C:XII, que en el VSHV se corresponde con C64-C315 y C:III unida a C:V, que en el VSHV se corresponde con C110-C152) [Einer-Jensen, 1998 #1507], (ii) El peptido de fusión tiene una C que le une a otro dominio amino terminal que en el caso de VSHV es el identificado como el de ligamiento de fosfolípidos, (iii) existen G y P conservadas, tales como las C:IP (C64 y P65 en VSHV) y la G (G98 en VSHV) y también está conservado el motivo (F,Y)PXPXXCX(W,Y) en el peptido de fusión, (iv) todas contienen perfiles hidrofílicos/hidrofóbicos similares (Figura 7) y (v) Existe un dominio hidrofílico de 25 a 45 aa, con una media de 26 % aa cargados, localizado entre los dominios de ligamiento de fosfolípidos y del peptido de fusión (Figura 7).

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

Para estudiar la relación de esta región con la fusión de VSHV, se seleccionaron y se sintetizaron por separado 4 segmentos que rodean al principal dominio de ligamiento de fosfolípidos (p2, aa 82-109) identificado en trabajos anteriores [Estepa, 1996 #892]. La selección se efectuó de acuerdo con sus diferentes características de hidrofilicidad/hidrofobicidad y algunas otras propiedades o consideraciones. Los segmentos seleccionados fueron del amino al

carboxilo: p9 (aa 58-80), frg#11 (p9+p2, frg#11 aa 56-110), p2, p3 (aa 110-122) y p4 (aa 123-144). Sus secuencias y posiciones relativas pueden encontrarse en las Figuras 3A, 3B, 7 y 8.

El p9 se eligió por contener la otra mitad de las heptadas repetidas parcialmente presentes en el p2 y por poseer una cabeza amino terminal polar con características simétricas a la del p2. Los peptidos p9 y p2 se encuentran separados por la posición 81, intermedia entre ambos y una de las pocas posiciones variables entre las cepas de VSHV. El frg#11 (aa 56-110) se eligió como la unión del p9 y del p2. El p3 constituye un pico hidrofóbico cuya secuencia es idéntica en todos los rabdovirus de peces de agua fría (VSHV, VNHI y HIRV) [Walker, 1999 #2010]. El p4 se corresponde con un pico hidrofílico que contiene uno de los sitios (K140) que cambian en los mutantes resistentes a la neutralización con el AcM C10 [Bearzotti, 1995 #883; Gaudin, 1999 #1914] y 3 sitios (E133, A134 y T135) que aparecen en el peptido incrementador de fusión [Mas, 2002 #2385].

Una vez seleccionados los segmentos en los que se dividió la región estudiada se analizaron las posibles mutaciones a introducir en el dominio p2 de ligamiento de fosfolípidos (ensayo de ligamiento de PS marcada en fase sólida) [Estepa, 1996 #1204] y en toda la región (ensayos de fusión de células transfectadas con plásmidos mutados en la pG) [Shokralla, 1998 #1426; Shokralla, 1999 #1884] (Figura 8).

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

Para las mutaciones en toda la región potencialmente implicada en la fusión se eligieron las P59A, P79A, P86A y G98A, debido a su importancia en una estructura de proteinas y a que formaban “codos” según indicaban los modelos construidos con la secuencia con programas de ordenador. Además se obtuvieron los mutantes: en R103A y R107A en las posiciones

potencialmente implicadas en las interacciones iónicas entre el p2-PS, en varias posiciones de las heptadas hidrofóbicas repetidas del frg#11, potencialmente implicadas en una estructura de hélice alfa anfipática (aa hidrofóbico a S), en F115K por ser una de las 3 posiciones más hidrófobicas y más conservadas en todos los rabdovirus del dominio p3 (Figura 6), en T135E debido a que era una de las posiciones con homología al peptido incrementador de fusión del VSHV [Mas, 2002 #2385] y en F147K, P148K y W154K situados en el peptido de fusión debido a que en VSV se habían obtenido mutantes deficientes en fusión en posiciones homólogas [Li, 1993 #571; Whitt, 1990; Zhang, 1994; Shokralla, 1998 #1426; Shokralla, 1998 #1426; Jeetendra, 2002 #2395] y a que estaban localizadas en el motivo conservado en todos los peptidos de fusión de rabdovirus animales (**F**,Y)**P**XPXXCX(**W**,F) (Figura 6).

## 5.4 PROPIEDADES DE LOS SEGMENTOS SELECCIONADOS

**5.4.1. Evidencias anteriores de las relaciones de los segmentos con la fusión.** Varias líneas de evidencia sugieren que los dominios homologos al p2 en otros rabdovirus están relacionadas con la fusión. Por ejemplo, entre los dominios que se han encontrado fotomarcados por lípidos reactivos incorporados a membranas, se encuentran los aa 74-237 de VSV y los aa 122-198 de RV [Durrer, 1995 #920; Gaudin, 1995 #834]. Estos dominios fotomarcados incluyen a las heptadas hidrofóbicas repetidas amino terminales en ambos rabdovirus [Coll, 1995 #775]. Además, el mapeo de los mutantes defectivos en fusión de VSV identificó el segmento aa 123-137 como el peptido de fusión [Whitt, 1990 #575; Li, 1993 #571; Zhang, 1994; Fredericksen, 1995 #1071]. El que la región de maxima interacción con fosfolípidos aniónicos de la pG podría ser relevante para la fusión del VSHV [Coll, 1995 #814], lo sugirió el requerimiento de bajo pH de AcP anti-p2 para: reconocer p2 y VSHV [Estepa, 1996 #1204], inhibir el ligamiento de PS a VSHV [Estepa, 1996 #892] e inhibir la fusión célula-célula de EPC infectadas con VSHV [Estepa, 1997 #1284]. Por otra parte, p2 inducía agregación de vesículas, aposición de membranas y desestabilización de bicapas de fosfolípidos aniónicos, todos los

pasos que se requieren para la fusión [Nuñez, 1998 #]. Además el ligamiento de fosfolípidos aniónicos y la fusión mostraban perfiles de dependencia de pH idénticos [Estepa, 1996 #892]. Por otra parte las mutaciones en los aa hidrofóbicos de las heptadas repetidas de la pG de varios paramixovirus [Sergel-Germano, 1994 #1126; Rapaport, 1995 #1124; Reitter, 1995 #1122], baculovirus [Monsma, 1995 #1123], HIV [Wild, 1994 #1125] y virus de la leucemia murina [Ramsdale, 1996 #1121], inhibían la fusión sugiriendo que no solo el peptido de fusión es importante para la fusión sino también los segmentos adyacentes a él [Reitter, 1995 #1122]. Aunque todavía no existe evidencia de que la interacción PS-p2 sea relevante en la entrada viral, todos los descubrimientos anteriores soportan la hipótesis de que los dominios p2 de la pG de rabdovirus podrían jugar un papel central en los procesos fusogénicos de los rabdovirus.

**5.4.2. Participación del frg#11/p2 en la fusión del VSHV.**. De todos los segmentos seleccionados para este estudio: p9, p2, p3, p4 y frg#11 (p9+p2), el frg#11 fue el único capaz de inducir fusión de monocapas de células EPC (Figura 10). A los datos, obtenidos en este trabajo, se añade su actividad específica más alta en su interacción con fosfolípidos aniónicos y su capacidad de translocar PS en la membrana desde la cara más interna [Mas, 2002 #2385]. La inhibición con anti-frg#11 de la fusión célula-célula de monocapas celulares transfectadas con pG a bajo pH confirmaba la implicación del frg#11 en la fusión (Figura 20).

Además, en trabajos en colaboración, se ha demostrado por IR y DC [Estepa, 1996 #892; Nuñez, 1998 #1251], que el frg#11 adopta diferentes conformaciones dependientes del pH, tal y como sugería la disminución de su solubilidad al aumentar el pH, fenómeno que resultó reversible (datos no mostrados). Además, aunque el ligamiento de PIPP (Figura 9A) confirmó la especificidad de p2 en el ligamiento de fosfolípidos aniónicos [Estepa, 1996 #892; Nuñez, 1998 #1251], el frg#11 era más activo en la agregación de fosfolípidos aniónicos que el p2 [Mas, 2002 #2385]. Estas interacciones no tenían lugar con fosfolípidos neutrales indicando la especificidad de la agregación y la importancia de sus componentes electrostáticos.

La importancia del p2 en la interacción con fosfolípidos se confirmó por espectroscopia IR y DC, pasando su conformación ß de un 5.8 % a pH neutro a un 25.4 % a pH bajo y a un 84.4 % en presencia de fosfolípidos aniónicos [Nuñez, 1998 #1251]. A pesar de la continuación de las heptadas hidrofóbicas repetidas del p2 en p9, el DC del frg#11, p2 y p9 demostró que el p9 no interaccionaba con PS, sugiriendo además que las heptadas hidrofóbicas repetidas no participan en la interacción con los fosfolípidos sino en otras interacciones estructurales de la pG [Nuñez, 1998 #1251].

Todos los resultados comentados con anterioridad demuestran que mientras que el p9 en la parte amino-terminal del frg#11, añade las interacciones peptido-peptido causantes de la agregación del frg#11 a pH neutro, las interacciones con fosfolípidos aniónicos están restringidas al p2 en la parte carboxi-terminal del frg#11. Los resultados obtenidos en este trabajo junto a los descritos anteriormente también sugieren que la correspondiente estructura del frg#11 en la pG podría estar enterrada en la estructura global de la pG o implicada en la formación de los trímeros de pG a pH neutro. Cuando el pH disminuye, los cambios conformacionales en la pG no solo afectan al frg#11 adoptando una estructura ß, sino que además deben de afectar a regiones más amplias de la pG debido a que el frg#11 está flanqueado por C64 y C110 formando puentes disulfuro con otras regiones distantes [Einer-Jensen, 1998 #1507]. En VSV se han demostrado cambios más amplios de conformación durante la fusión que los del peptido de fusión aa 117-137 [Zhang, 1994 #582]. Dichos cambios se han confirmado para los dominios aa 395-418, aa 451-461 y secuencia transmembranal carboxi terminal de la pG [Odell, 1997 #1368; Jeetendra, 2002 #2395; Shokralla, 1998 #1426].

Los cambios conformacionales inducidos por la disminución de pH exponen el p2 a la superficie de la pG, tal y como demuestran la dependencia de pH ~ 5 de: (i) su reconocimiento por Ac anti-p2 [Estepa, 1996 #892] y (ii) de la inhibición de la formación de sincitios en células transfectadas con AcM anti-G (Figura 12A), AcP anti-VSHV (Figura 12B), Ac de trucha anti-VSHV (Figura 21) y los Ac anti-p2 y anti-frg#11 (Figura 20). A bajo pH, el dominio del frg#11 en la pG puede convertirse en una estructura totalmente extendida, toda ß, al interaccionar con los

fosfolípidos de la membrana tal y como se demuestra que ocurre en el frg#11 recombinante [Estepa, 1996 #892; Nuñez, 1998 #1251]. La transición del frg#11 hacia el estado de bajo pH podría explicarse por el atrapamiento de protones por las histidinas presentes en posiciones 66, 84, 99 y 102. La exposición de una estructura hidrofóbica no identificada enterrada en la estructura nativa de la pG con la disminución del pH, se ha descrito también en RV [Gaudin, 1999 #2031] y en VSV [Lenard, 1993 #626].

El peptido p2 tiene muchas características de los peptidos de fusión. Por ejemplo, los peptidos de fusión: (i) poseen entre 15 a 25 aa de longitud, (ii) son relativamente hidrofóbicos, (iii) pueden modelarse como alfa hélices anfipáticas (heptadas repetidas), (iv) tienen residuos de P que rompen las alfa hélices en su centro y (v) los peptidos sintéticos derivados de los peptidos de fusión adoptan estructuras de alfa-hélice o ß cuando se encuentran dentro de las membranas [White, 1992 #804]. Todo lo antes mencionado sugiere que en VSHV y probablemente en otros rabdovirus, existen 2 peptidos de fusión o un peptido de fusión constituido por 2 dominios unidos por un puente disulfuro, el p2 y el peptido de fusión homologo al ya identificado por mutantes defectivos en fusión en la pG de VSV.

Hay que resaltar el hecho de que la adición de frg#11 a monocapas de EPC a bajo pH sea capaz de causar fusión celular en ausencia del resto de la molécula de pG (Figura 10E). Aunque la adición de p2 a bajo pH a una monocapa de EPC expandía las células (probablemente debido a su inserción en la membrana)[Nuñez, 1998 #1251], solo la adición del frg#11 inducía tanto la expansión (Figura 10A) como la fusión célula-célula (Figura 10C, E), sugiriendo que la diferencia observada es causada por la presencia del p9. Por otra parte, es difícil imaginar como el frg#11 sin la ayuda del p9, podría translocar PS de uno a otro lado de la membrana [Mas, 2002 #2385]. Ahora bien, el frg#11 era 200 veces menos eficiente que la pG en inducir fusión aunque esta actividad específica es probablemente 3-6 veces mayor debido a la insolubilidad del frg#11. Es decir, los resultados comparativos de eficiencia de fusión entre frg#11 y pG, también sugieren que la fusión del VSHV requiere no solo el frg#11 sino también otros dominios de la pG, confirmando

lo comentado con anterioridad para el VSV [Zhang, 1994 #582; Shokralla, 1998 #1426; Odell, 1997 #1368].

Puesto que una molécula de p2 interacciona con 15-17 moléculas de fosfolípidos aniónicos [Nuñez, 1998 #1251] y ~ 1/20 es la relación molar para formar agregados entre el frg#11 y los fosfolípidos aniónicos [Mas, 2002 #2385], podemos especular sobre el número de moleculas que podrían participar en el proceso de fusión a través de los trímeros de pG. Si en VSHV ocurre lo mismo que en RV en que el complejo mínimo de fusión se ha estimado en 6 trímeros [Gaudin, 1999 #2031; Roche, 2002 #2397], la penetración de p2 en las membranas provocaría una concentración local de 6x3 dominios de p2 y por lo tanto de 270 a 360 fosfolípidos aniónicos por cada complejo de fusión. La translocación de todas esas moléculas de fosfolípidos aniónicos de la membrana interior a la exterior causaría una poderosa desestabilización local en la membrana que ayudaría al proceso de fusión [Budker, 1996 #1154].

**5.4.2. Respuesta inmunológica de la trucha al frg#11.** A pesar de diferentes estrategias de inmunización con diferentes formas de preparación del antígeno pG de VSHV y la variación de títulos de neutralización de los correspondientes antisueros, el análisis de reactividad frente al pepscan de la pG puso de manifiesto que la región alrededor del aa 100 es antigénica en un 40% de las truchas ensayadas [Fernandez-Alonso, 1999 #1373].

Complementando trabajos iniciados anteriormente [Fernandez-Alonso, 2000 #2074], en este trabajo se ha confirmado que los sueros de truchas inmunizadas contra el VSHV generan una respuesta inmunológica frente al frg#11, sugiriendo que las mutaciones en esa región podrían utilizarse no solo para atenuar el VSHV sino también para inmunizar las truchas correspondientes. Sin embargo es de hacer notar que los sueros de trucha inmunizada contra VSHV que reaccionan más fuertemente frente al frg#11 son precisamente aquellos que tienen una menor actividad neutralizante (Figura 21A). Además aunque la mayoría de los 46 sueros de truchas inmunizadas con G3-pcDNAI/Amp tenían Acs anti-frg#11 (Figura 21B), ninguno tenía títulos de neutralización detectables (resultados no mostrados) aunque el 50% de estas truchas quedaban protegidas frente a

la contraprueba con VSHV [Fernandez-Alonso, 2001 #2039]. Todos estos resultados sugieren por lo tanto, la complementariedad de los 2 tipos de respuesta (neutralizante y anti-frg#11) para la inmunización de las truchas frente a VSHV.

Desde un punto de vista práctico, el frg#11 podría usarse para detectar Acs anti-frg#11 en vez del G4 recombinante que se había empleado en estudios anteriores [Estepa, 1994 #663]. La producción de frg#11 recombinante es más fácil y reproducible que la de G4. Por ejemplo, la disolución de los cuerpos de inclusión que la G4 forma en la levadura es complicada y la pureza obtenida es de sólo un 48 % [Estepa, 1994 #663] frente a un 90 % que puede obtenerse fácilmente en el frg#11. Junto con las mencionadas razones, el ELISA utilizando frg#11 tiene una alta sensibilidad y un bajo fondo, por lo que se podría poner a punto un método reproducible de estimación de Acs anti-frg#11.

Efectivamente, debido a que los sueros de trucha se ligan inespecifícamente a muchas superficies y proteinas [Jorgensen, 1991 #742; Olesen, 1991 #390], ha sido imposible el desarrollo de ELISAS basados en VSHV purificado o capturado por AcM para la detección de Acs anti-VSHV. Además, la utilización del frg#11 (peso molecular de 10355 Da) aumenta la densidad epitópica respecto a la utilización de VSHV o incluso de G4 (50000 Da), por lo que la sensibilidad aumenta 4-5 veces.

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

### 1.5 ANALISIS DE LOS MUTANTES

El análisis de los mutantes en la región estudiada incluye: peptidos p2 sintéticos mutantes y pG alterada por mutagénesis dirigida. Los 15 peptidos mutantes se obtuvieron en el dominio p2 de ligamiento de fosfolípidos entre las posiciones 93 a 107. Se analizaron sus propiedades por ensayo de ligamiento de PS marcada en fase sólida [Estepa, 1996 #1204] (Figura 22). Los 15

mutantes en la pG en el frg#11, en p3, p4 y en el peptido de fusión se analizaron por expresión en el citoplasma (Figura 23) y membrana (Figura 24) y por ensayos de formación de sincitios (Figura 25) de células transfectadas con plásmidos mutados [Shokralla, 1998 #1426; Shokralla, 1999 #1884] (Tabla 11).

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

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

Los mutantes localizados en el peptido de fusión (**F**,Y)**P**XPXXCX(**W**,F) (posiciones F147, P148 y W154 en VSHV) homólogo al identificado en VSV [Li, 1993 #571; Whitt, 1990; Zhang, 1994; Shokralla, 1998 #1426; Shokralla, 1998 #1426; Jeetendra, 2002 #2395], fueron incapaces de formar sincitios, tal y como se esperaba (Figura 25 y Tabla 11). Este triple dato aporta un importante control para la interpretación de los resultados de formación de sincitios obtenidos con el resto de los mutantes en el dominio de ligamiento de fosfolípidos donde nunca antes habían sido ensayados ni en VSHV ni en ningún otro rabdovirus.

Por primera vez, se describen en este trabajo mutantes defectivos en fusión (P86A, G98A, A96E, R107A, P86AG98A y G98AH99S), situados en el dominio de ligamiento de fosfolípidos. Tal y como se describió en trabajos anteriores, el domino p2 del VSHV se localiza dentro de la membrana durante la fusión a pH 5 [Nuñez, 1998 #1251]. Todos estos resultados sugieren que las mutaciones que afectan a la fusión podrían ser aquellas localizadas en posiciones que se mantienen dentro de la membrana durante la fusión. Confirma esta hipótesis, la no alteración de la fusión en el mutante T135E, situado en el p4 altamente hidrofílico y que por lo tanto tiene muy bajas probabilidades de interaccionar con los lípidos de la membrana. La posición T135 junto con las posiciones aa 88-96 son homologas al peptido incrementador de la fusión-infección del VSHV [Mas, 2002 #2385], pero se necesita una mayor experimentación para esclarecer una posible relación entre ambos hechos.

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

En la región del p3 la defectividad de la fusión en la posición 115 (mutante F115K), una de las 3 posiciones más hidrófobicas y más conservadas en todos los rabdovirus (Figura 6), sugiere su localización dentro de la membrana, tal y como es necesario suponer si tanto el p2 como el peptido de fusión están dentro de la membrana.

### 5.6. MODELO PROPUESTO

Del estudio de: los mutantes defectivos en fusión del VSV [Zhang, 1994; Shokralla, 1998 #1426], los AcM neutralizantes a bajo pH en RV [Flamand, 1993 #580] y la variación del pH optimo de fusión en mutantes MAR de VSHV [Gaudin, 1999 #1914], se ha podido identificar la

posible localización del peptido de fusión en otros rabdovirus por alineamiento de secuencias [Walker, 1999 #2010].

Del estudio de ligamiento de PS en fase sólida se ha identificado en VSHV el dominio p2 de ligamiento de fosfolípidos en la región amino terminal de la pG de VSHV [Estepa, 1996 #892; Nuñez, 1998 #1251]. Basándose en estos datos y por alineamiento con otros 14 rabdovirus animales se han localizado dominios homologos en otros rabdovirus incluido el VSHV [Walker, 1999 #2010]. Sin embargo, hasta este trabajo no existía todavía una confirmación para la función precisa de estos dominios o de otros adyacentes a ellos en VSHV, ni un mecanismo o modelo para explicar los cambios de conformación en la estructura durante la fusión en cualquier otro rabdovirus [Delos, 2000 #2045], debido a la falta de mutantes en las regiones adyacentes al peptido de fusión.

Cualquier modelo de cambios en la estructura de la región amino terminal de la pG durante la fusión tiene que tener en cuenta que contrariamente a otros virus con envuelta, la pG de VSHV (como la pG de cualquier otro rabdovirus) no sufre procesamiento proteolítico para insertar su peptido de fusión en la membrana y que por lo tanto el peptido de fusión permanece interno a la estructura de la pG durante la fusión. Como consecuencia, los cambios conformacionales inducidos por la disminución del pH son reversibles al neutralizar el pH. Además el peptido de fusión contiene una C [Walker, 1999 #2010] lo que indica la existencia de un puente disulfuro con otro dominio [Einer-Jensen, 1998 #1507] y por lo tanto la probable participación de este otro dominio en la fusión.

Una inserción reversible de un peptido de fusión interno requiere una estructura en forma de U durante la fusión para poder penetrar en la membrana. Según la construcción de modelos con programas de ordenador, la estructura ß del frg#11 (aa 56-110) cumple estas expectativas para un peptido de fusión interno debido a que la localización de sus P induce los dobleces necesarios. Puesto que por alineamiento de secuencias con el peptido de fusión identificado en VSV, la región aa 142-159 del VSHV es el peptido de fusión más probable [Walker, 1999 #2010] y el dominio p2 del frg#11 penetra en la parte hidrofóbica de la membrana con una estructura ß extendida [Nuñez,

1998 #1251], la penetración del p2 arrastrará tanto al p3 como al peptido de fusión debido al puente disulfuro C110-C152 [Einer-Jensen, 1998 #1507]. Lo mismo sucedería si fuera la penetración del peptido de fusión la que arrastrara al dominio de ligamiento de fosfolípidos. Los resultados obtenidos por ligamiento de PIPP al pepscan de la pG en fase sólida confirman que tanto el p2 como el p3 y el peptido de fusión interaccionan con fosfolípidos (Tabla 11). Por otra parte, las regiones p9 y p4 deberían permanecer fuera de la membrana de acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla 12). La falta de efectos en la fusión de los mutantes P79A y L85S (localizados al extremo carboxi terminal del p9 y del p2 respectivamente), confirma que el p9 y la parte carboxi terminal del p2 no participan activamente en la penetración de la membrana durante la fusión.

Todos estos resultados incluyendo los obtenidos con los mutantes sugieren que 2 dominios de la región amino terminal de la pG unidos por un puente disulfuro formando una doble U están implicados en la fusión: el de ligamiento de fosfolípidos y el peptido de fusión (Figura 26).

Puesto que la presencia de heptadas repetidas predice una estructura de $\alpha$-helice para el frg#11 a pH 7 y los estudios biofísicos han demostrado que el frg#11 penetra en las membranas con una estructura ß a pH 5 [Nuñez, 1998 #1251], el frg#11 podría adoptar una conformación de $\alpha$-helice en la pG a pH 7 y adoptar una estructura ß una vez que el p2 ha penetrado en la parte hidrofóbica de la membrana a pH 5. Aunque no existen evidencias directas de que esto sea así, esta hipótesis estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en este y en anteriores trabajos.

La atracción electrostática entre los aa positivamente cargados del p2 y las cabezas negativamente cargadas de los fosfolípidos aniónicos internos de la membrana podrían favorecer la estructura ß del frg#11 a pH 5. Debido a que ni el p9 ni el p4 interaccionan con los fosfolípidos (no hay ligamiento de PIPP) (Figura 9A), solo el p2 [Nuñez, 1998 #1251], el p3 (aa hidrofóbicos y ligamiento de PIPP) y el peptido de fusión (aa hidrofóbicos y ligamiento de PIPP) podrían entrar en el interior de las membranas. La interferencia con la penetración de las membranas por el frg#11/p2 podría explicar la inhibición de la formación de sincitios por Ac anti-frg#11/p2, mientras que la

inhibición de cambios conformacionales necesarios para la fusión en p4 podría explicar la inhibición de la formación de sincitios por anti-p4 (Figura 20).

La existencia de este primer modelo de penetración de la región amino terminal de la pG de VSHV en la membrana puede utilizarse para diseñar nuevos experimentos que ayuden a entender mejor como realizan la fusión los rabdovirus sin proteolisis de su pG tal y como sucede en otros virus. Tal conocimiento ayudaría a diseñar moleculas que interfirieran con la entrada de los rabdovirus en las células. Además la información obtenida con los mutantes puede utilizarse para diseñar vacunas atenuadas o de ADN.

**Tabla 12 . Evidencias experimentales publicadas y obtenidas en este trabajo que sustentan el modelo propuesto de interacción con la membrana de la región amino terminal de la pG de VSHV.**

| Tipo | Conclusión | Dato | Referencias |
|---|---|---|---|
| Alineamiento de secuencias | P59, P79, P86 y G98<br>C(frg#11)-C(PepFus)<br>p4 hidrofílico<br>p9,p2,p3,p4,Pfus<br>PepFus localizado en aa 142-159<br>Frg#11+PFus función importante | Presencia conservada en rabdos<br>Puente disulfuro conservado en rabdos<br>25-45 aa con 23 % aa cargados<br>Hidrofilicidad/hidrofobicidad conservada<br>(F,Y)PXPXXCX(W,F) conservado<br>Muy conservados en 22 cepas de VSHV | Figura 5<br>Figura 5<br>[Walker, 1999 #2010]<br>Figura 7<br>Figura 6<br>Figura 10 |
| Interacción con FFLA | p2 se inserta en la Mem<br>p2 máximo ligamiento de PS<br>p9+p4 no interacción con PS<br>p2 y PepFus intervienen en fusión<br>Frg#11>p2 interacción con PS<br>p2 máximo ligamiento PIPP/PI<br>p3+Pfus ligamiento PIPP/PI<br>p9+p4 no ligamiento PIPP/PI | Calorimetría de barrido<br>Ligamiento en fase sólida<br>DC<br>Peptidos incrementadores de fusión<br>Interacciones en fase liquida<br>Ligamiento en fase sólida<br>Ligamiento en fase sólida<br>Ligamiento en fase sólida | [Nuñez, 1998 #1251]<br>[Estepa, 1996 #892]<br>[Estepa, 2001 #2003]<br>[Mas, 2002 #2385]<br>[Estepa, 2001 #2003]<br>Figura 9A<br>Figura 9A<br>Figura 9A |
| Cambios de conformación | p2 a pH 5 todo ß<br>Frg#11 a pH 5 todo ß<br>Frg#11 solubilidad solo a pH 5 | DC<br>DC<br>Solubilidad | [Estepa, 1996 #892]<br>[Estepa, 2001 #2003]<br>Datos no mostrados |
| Propiedades biológicas | Frg#11 capaz de fusión<br>Frg#11 capaz de fusión en pG | Inducción de la formación de sincitios<br>Inhibición de sincitios por Acs anti-frg#11 | Figura 10E<br>Figura 11 |
| Mutantes peptidos p2 | p2 interacciona con PS<br>CaPo de p2 interacciona con PS | S97N y H102A aumentan ligamiento PS<br>EE y KK disminuyen ligamiento PS | Figura 22A<br>Figura 22B |
| Mutantes Frg#11+PFus | p9 fuera Mem<br>HelAnf estructura a pH 7<br>PepFus implicado en Fsin | P67A: pGM +, Fsin -<br>Mutantes en aa hidrofóbicos: pGM -,Fsin -<br>F147K: pGM +, Fsin - | Tabla 11<br>Tabla 11<br>Tabla 11 |

**FFLA**, fosfolípidos aniónicos. **Mem**, membrana celular. **PIPP**, fosfatidil inositol bis fosfato. **PepFus**, peptido de fusión. **DC**, dicroismo circular. **pGM**, pG en membrana. **Fsin**, formación de sincitios. **HelAnf**, hélice anfipática. **CaPo**, cabeza polar. **Rabdos**, 4 géneros de rabdovirus animales.

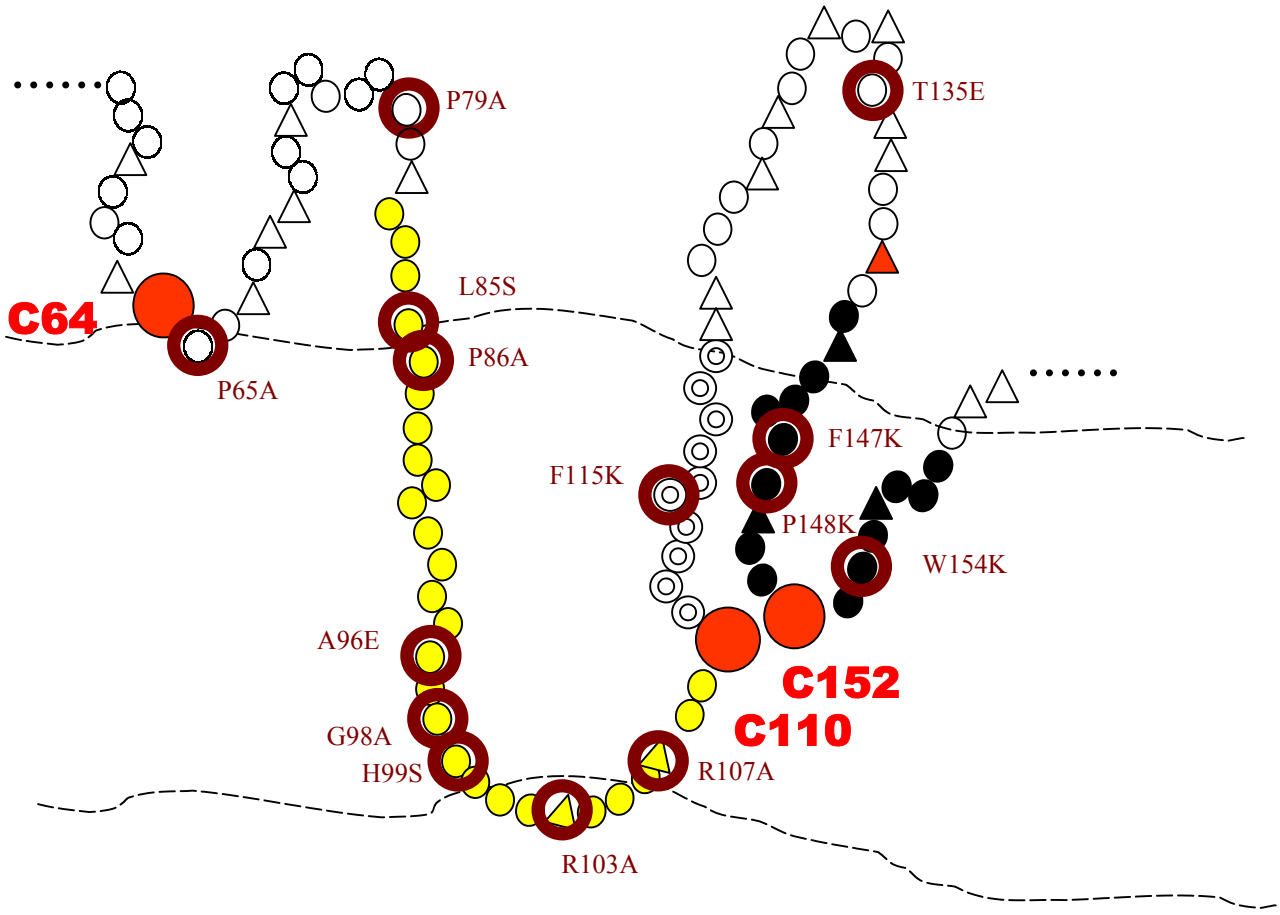



**Figura 26 . Modelo propuesto para la región del aa 56-159 de la pG de VSHV cuando interacciona con la membrana de la célula huésped para su fusión posterior.** Este modelo utiliza cada aa representado por un circulo o triangulo para esquematizar la siguiente hipótesis: i) el p2 coloreado de amarillo es lanzado a la membrana impulsado por el cambio conformacional de la pG a bajo pH y por su afinidad por los fosfolípidos aniónicos en la parte interior de la membrana plasmática (esquematizada por dos líneas de puntos), adopta una estructura en lamina ß extendida. ii) el p2 arrastra al peptido de fusión [Gaudin, 1999 #1914] en negro debido al puente disulfuro C110-C152, causando de esta forma una gran concentración de aa hidrofóbicos en el sitio de penetración. iii) el p9 y el bucle hidrofílico entre C110-C152 no penetran en la membrana. La proximidad del aa K140 ( ) al frg#11 podría explicar la inhibición de la infectividad por el AcM C10. Solo se ha representado un monómero, en realidad esta estructura sería trimérica. Los círculos rojos son las cisteinas C64 (CI), C110 (CII) y C154 (CV). ■, G98. Amarillo, dominio p2 que interacciona con fosfolípidos. Negro, peptido de fusión. , aa del p3. △, aa cargados.

◎

# 6. CONCLUSIONES

El trabajo realizado permite extraer las siguientes conclusiones:

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

La importancia de este estudio estriba en las posibilidades que ofrece de diseño de métodos terapeúticos y/o de vacunas. Se podrían diseñar productos químicos que interfirieran en la fusión, llegando a poder utilizarse como productos terapeúticos. Por otra parte, algunas de las mutaciones detectadas puede utilizarse en el diseño de mutantes multiples que resultaran en la atenuación del virus y que se podrían utilizar para el desarrollo de vacunas vivas o de ADN.

# 7. BIBLIOGRAFÍA

# 8. TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

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

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

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

- López, A., Fernandez-Alonso, M., **Rocha, A**., Estepa, A. y Coll, J.M. Transfection of ephitelioma papulosum cyprini (EPC) carp cells. Biotech. Letters 23 (2001)481-487

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

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

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

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

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

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

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

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

- **Rocha,A.I**., Ruiz, S. y Coll, JM. Characterization of the syncytia formed by VHS salmonid rhabdovirus G-gene transfected cells (sometido).

- Mas,V. **Rocha, A**., Coll,J.M. y Estepa, A. Inhibition of cell to cell spreading of infection by viral haemorrhagic septicemia rhabdovirus of salmonids at low pH (sometido)