

Tesis de Doctorado
Área: Biología
Sub Área: Biología Celular y Molecular

PEDECIBA

**Estudio de la interacción entre el Virus de la Leucemia Bovina y la
célula hospedera**

MSc. Lorena Tomé

Director: **Dr. Otto Pritsch**

Co-director: **Dr. Juan Arbiza**

Laboratorio de Ejecución: Unidad de Biofísica de Proteínas,
Institut Pasteur de Montevideo.

Fecha de defensa: 25 de setiembre de 2014

“..., but was engaged, heart and soul, in the pursuit of some discoveries which I hoped to make. None but those who have experienced them can conceive of the enticements of science. In other studies you go as far as others have gone before you, and there is nothing more to know; but in a scientific pursuit there is continual food for discovery and wonder.”

Mary Shelley, “Frankenstein or, The Modern Prometheus”, 1818

Resumen

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad infecciosa que afecta principalmente al ganado lechero. El agente causal de la LBE es un deltaretrovirus oncogénico denominado Virus de la Leucemia Bovina (BLV), que infecta a los linfocitos B bovinos. Por un lado, esta enfermedad es muy relevante a nivel nacional por el impacto económico y sanitario que tiene sobre la industria lechera y sobre la exportación de ganado en pie. Por otro lado, el BLV resulta un excelente modelo para el estudio de aspectos básicos involucrados en el ciclo replicativo de los retrovirus. En suma, esta tesis de doctorado aborda la interrelación virus-célula hospedera haciendo foco en los siguientes objetivos:

i) el análisis de las proteínas que componen a las partículas retrovirales de BLV. Se optimizó un protocolo preliminar para la obtención y purificación de partículas virales derivadas del BLV a partir de la línea celular persistentemente infectada. Las principales proteínas virales estructurales que se deducen de la secuencia genómica del BLV han sido identificadas por espectrometría de masa. Se han logrado identificar un importante número de proteínas virales estructurales cuyos ORFs se deducen a partir de la secuencia nucleotídica: p24, p12, p15, gp51, PRT, y algunos de sus precursores como Gag y Env. Por su parte la identificación de dos de las principales proteínas presentes en BLV como son p24 y gp51 permitió comenzar con el estudio de modificaciones postraduccionales presentes en las mismas. Con este procedimiento no fue posible identificar nuevas proteínas virales (no deducidas a partir del análisis genómico) o proteínas reguladoras. Con el fin de optimizar la producción y la calidad de las partículas virales se adquirió la línea celular de linfocitos B denominada BL3.1 en particular para analizar la presencia de proteínas del hospedero en las partículas virales purificadas. Esta línea celular se empleó para establecer de forma preliminar y por primera vez la presencia de biofilms en BLV contribuyendo al conocimiento acerca de la transmisión de BLV y su interrelación con la célula hospedera.

ii) la caracterización bioquímica, biofísica, estructural y antigénica de la proteína Env. Por primera vez se logró expresar y purificar la proteína Env de BLV tanto salvaje como mutante (sin el sitio de procesamiento proteolítico) con alto rendimiento. Se determinó por SEC-MALLS el peso molecular absoluto del ectodominio de la proteína con un valor de 63kDa y posee una estructura oligomérica que presenta al menos 3 estados: monómero, trímero y un oligómero de mayor peso molecular. Estos datos se obtuvieron a partir de la proteína mutante dado que la incorporación de la mutación estabilizó a la proteína en una conformación más estable (similar al estado prefusión) que la proteína Env salvaje que se expresó adecuadamente pero resultó ser inestable formando especies oligoméricas de alto peso molecular. De todos modos la presencia de la cisteína reactiva (en posición 212 en ambas proteínas) impidió contar con una proteína completamente estable dificultando el abordaje estructural. Finalmente se determinaron las propiedades antigénicas e inmunogénicas de la proteína Env-BLV mutante recombinante habilitando el empleo de esta proteína como reactivo diagnóstico así como para el estudio de respuesta inmune frente a esta proteína.

iii) el análisis bioquímico mediante el estudio de la glicosilación de la proteína Env-BLV. Este es el primer trabajo analítico realizado en una glicoproteína de fusión viral perteneciente a un deltaretrovirus. A partir de la proteína Env-BLV mutante recombinante expresada en insectos fue posible confirmar por primera vez y de forma analítica los 9 sitios potenciales de N-glicosilación (7 en gp51 y 2 en gp30) en la proteína recombinante y extrapolable a la proteína nativa. Asimismo se realizó por primera vez la caracterización de los N-glicanos presentes en la proteína Env del BLV (tanto recombinante como nativa) mediante deglicosilación, purificación de N-glicanos y posterior análisis de N-glicanos por HPLC y confirmación por espectrometría de masa y exoglicosidasas. Se confirmó que el grado y tipo de glicanos presentes en ambas proteínas es diferente: mientras que la proteína nativa posee glicanos complejos con gran presencia de ácido siálico, la proteína Env recombinante sólo presenta estructuras oligomanosídicas, con residuos de fucosa. La información acerca de los glúcidos presentes es fundamental tanto para el abordaje estructural como también para el potencial uso como inmunógeno y antígeno. Asimismo determinamos la importancia de los glicanos en el reconocimiento de los sueros bovinos apoyando nuestra hipótesis inicial de que es altamente probable que esta proteína presente determinantes antigénicos constituidos únicamente por glicanos. Esta es la primera vez que se determina la estructura N-glicánica en la proteína Env de BLV (recombinante y nativa) y a su vez esta información es escasa en retrovirus. Los resultados obtenidos en esta tesis permiten aportar al conocimiento general sobre proteínas Env retrovirales para poder extrapolarlo a otros retrovirus con impacto en salud humana y animal.

Abreviaturas

AcMo: anticuerpo monoclonal

ADN: ácido desoxirribonucleico

AL: estado aleucémico

AP4: *proteína 4 de unión a potenciador activador*

ARN: ácido ribonucleico

ATF: factor activador de la transcripción

BCR: receptor de células B

BLV: virus de la leucemia bovina

BoLA: antígeno leucocitario bovino

BSA: seroalbumina bovina

CaMKIV: proteína quinasa IV dependiente de Ca²⁺/Calmodulina

CCB: azul de Coomassie coloidal

CD: cluster de diferenciación

Cels: células

CHCA: ácido α :ciano hidroxinámico

CIAP: fosfatasa alcalina intestinal de ternero

cm: centímetros

CRE: elemento de Respuesta a AMPc

CREB: proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico

DIC: microscopía de contraste diferencial interferencial

DMSO: *dimetil* sulfóxido

DTT: *Ditiotreitol*

EDTA: ácido etilendiamminotetracético

ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas

Env: proteína Env (gp51:gp30)

ER (o RE): Retículo endoplasmático

ESCRT: Complejo de clasificación endosomal requerido para transporte – endosomal sorting complex required for transport.

FMDV: virus de la enfermedad de pies y boca

Gag, Pr44: proteína Gag

gp30, TM: glicoproteína de fusión

gp51, SU: glicoproteína de unión al receptor

gp72, Pr72: precursor Env

GRE: *elemento* de respuesta a glucocorticoides

HPLC: cromatografía líquida de alta performance

hs: horas

HTLV: virus linfotrópico de células T humanas

IAA: iodoacetamida

IEF: isoelectroenfoque

Ig: inmunoglobulina

IN: integrasa

IPG: gradientes de pH inmovilizados

LBE: leucosis bovina enzootica

LS: linfosarcoma

LTR: repetidos largos terminales

mA: miliamperes

MALDI: *Desorción-Ionización láser asistida por una matriz-Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*

mg: miligramos

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

min: minutos

mL: mililitros

mM: milimolar

MS: espectrometría de masa

NFkB: *factor nuclear de la cadena Kappa en células B*

nM: nanomolar

ORF: marco abierto de lectura

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS: buffer fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pl: punto isoeléctrico	p14, PRT o PR: proteasa de BLV	TNE: buffer Tris NaCl EDTA
<i>PIC: complejo de preintegración</i>	p15, MA: proteína de matriz	TNF: factor de necrosis tumoral
<i>PIP2: fosfatidilinositol 4,5:difosfato</i>	p24, CA: proteína de capsida	TOF: tiempo de vuelo-time of flight
PKA: protein quinasa A	RT: retrotranscriptasa	TR: tiempo de retencion
PL: linfocitosis persistente	SEC:MALLS: cromatografía de exclusión molecular acoplada a un detector de dispersión de luz laser a multiples angulos	TxRE: <i>elemento</i> de respuesta a Tax
PM (o MW): peso molecular	SDS: dodecilsulfato de sodio	V: Volts
PMA: phorbol:12:myristate:13:acetate (forbol ester)	SFB: suero fetal bovino	WB: western blot
ppm: partes por millón	STLV: virus linfotrópico de células T de simio	µg: microgramos
p12, NC: proteína de nucleocapsida	TA: temperatura ambiente	µL: microlitros
		µM: micromolar
		µm: micrómetros

1) Introducción General

Las infecciones virales con impacto en sanidad animal representan un alto porcentaje de las infecciones presentes en animales con tres aspectos a resaltar, i) por un lado el impacto a nivel económico en aquellas infecciones que afectan animales vinculados a la producción (bovinos: FMDV, rotavirus bovino, BLV; ovinos: parapoxvirus; cerdos: hepatitis E, virus Nipah, etc), ii) como foco de potencial riesgo para la aparición de enfermedades zoonóticas (ej: virus de la encefalitis equina del oeste y virus Hendra en equinos, virus influenza en cerdos y aves de corral, etc) y iii) estos virus están presentes en casi todas las familias virales con características replicativas diversas siendo en muchos casos utilizados como modelo viral para el estudio del ciclo replicativo, proteínas, respuesta inmune y patogénesis de virus que afectan humanos (BLV, rotavirus bovino, etc). El Virus de la Leucemia Bovina, objeto de esta tesis de doctorado reúne la mayoría de estas características en particular el hecho de constituir un excelente modelo para el estudio de retrovirus.

1.1 El Virus de la Leucemia Bovina.

El Virus de la Leucemia (o leucosis) Bovina (VLB o BLV del inglés “bovine leukemia virus”) es un retrovirus oncogénico, competente a nivel replicativo, perteneciente a la familia *Retroviridae* (subfamilia *Orthoretrovirinae*) que comparte el género *Deltaretrovirus* junto con virus que causan leucemia en células T en humanos (HTLV-1-4) y en simios (STLV-1-3). Los retrovirus son virus envueltos que contienen un genoma ARN diploide y presentan como característica más saliente la capacidad de convertir su genoma ARN en ADN doble hebra luego de infectada la célula hospedera. El genoma viral del BLV se integra de forma persistente al genoma de la célula infectada causando desórdenes en la proliferación de linfocitos B, principal célula blanco de este virus *in vivo*. Algunos animales infectados con BLV pueden generar linfomas y/o proliferación de linfocitos B (denominado linfocitosis persistente) pero la mayoría del ganado infectado son portadores sanos del virus³⁹. Los deltaretrovirus exhiben linfotropismo *in vivo* y son caracterizados por las propiedades transformantes de una proteína viral reguladora única denominada Tax, la cual puede transactivar tanto genes virales como celulares²¹¹.

1.2 LBE: etiología, transmisión y patogénesis.

El BLV es el agente causal de la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) enfermedad neoplásica (la más común) presente en el ganado bovino. Esta enfermedad de etiología viral se caracteriza por una incubación prolongada, y un curso crónico e inaparente. La infección por BLV puede derivar en tres estadios diferentes pero no necesariamente consecutivos^{39, 158}: i) permanecer clínicamente silente, con el ganado en un estado aleucémico (AL) y se evidencia por presencia de antígenos virales y ADN proviral en los linfocitos B infectados (el 60% del ganado infectado permanece en esta fase asintomática), ii) puede emerger como una linfocitosis persistente (PL) caracterizada por un incremento permanente y estable

en el número de linfocitos B, este estadio es considerado una forma benigna de la enfermedad que resulta de la acumulación de linfocitos B sin transformar (expansión policlonal no maligna de células B CD5⁺ -30% de la población infectada) y iii) más raramente puede derivar en la formación de linfomas de células B en varios nodos linfáticos (linfosarcomas-fase LS) luego de un largo período de latencia que llevan a la muerte del animal; esta se conoce como la enfermedad tumoral propiamente dicha o forma clínica (5-10% de la población infectada)^{39, 280}.

El BLV se transmite horizontalmente a través de la transferencia de células infectadas vía contacto directo, a través de la leche o posiblemente por insectos hematófagos. De todos modos los procedimientos veterinarios iatrogénicos contribuyen significativamente a la propagación del virus, por este motivo las producciones intensivas como los tambos son las más afectadas ya que utilizan animales de mayor edad que a su vez son altamente manipulados desde el punto de vista veterinario.^{29, 38, 74, 111, 135, 163}. Por su parte la transmisión vertical tiene lugar por vía trans-placentaria o por células germinales¹¹¹. Los animales adultos y las hembras presentan con mayor frecuencia formas severas de la enfermedad. Dado que el ganado doméstico son los hospederos naturales para la infección por BLV es de suma importancia tener un buen sistema de manejo intensivo de ganado, en particular en tambos en los que exista un estrecho contacto físico de los animales evitando la transmisión causada por la mala praxis en el manejo por parte del ser humano⁷⁵.

Los linfocitos B infectados con BLV circulan a través de la sangre del ganado infectado y están presentes en la carne bovina. El BLV también se encuentra integrado en los linfocitos presentes en la leche de vacas infectadas y puede ser transmitido a los terneros a través de la misma⁷⁵. Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de leche proveniente de vacas infectadas con BLV no incrementa la frecuencia de leucemia en el hombre. Por tanto es improbable que BLV infecte, replique e induzca cáncer en humanos a pesar de que esta posibilidad no pueda ser formalmente excluida^{35, 37, 41, 207}. En este sentido un estudio reciente³⁴ permitió la identificación de ADN de BLV utilizando PCR anidada en fase líquida y secuenciación de ADN en tejido mamario humano junto con técnicas *in situ* complementarias como PCR, hibridación e inmunohistoquímica. Si bien estos resultados son controversiales y deben confirmarse, este trabajo representa el único donde se demuestra que la presencia de ADN proviral de BLV no deriva de reactividad cruzada con otros virus (o retrovirus endógenos), no representa un contaminación de laboratorio o reacción artefactual.

Con respecto a la epidemiología este es un retrovirus que presenta una distribución mundial excepto en Europa Occidental donde se realizaron importantes y exitosas campañas de erradicación y control en ausencia de vacunas efectivas contra esta infección^{1, 78, 195}. Este plan de erradicación se continúa realizando en Australia y Nueva Zelanda donde en el año 2005 más del 98% de los rodeos eran negativos para BLV¹⁸⁸. En el resto del mundo sin embargo existen prevalencias del 20-50% en individuos así como más del 80% en rodeos^{8, 55, 165, 186, 189, 237, 250, 252}.

En Uruguay la LBE se conoce desde hace varios años y mientras que los primeros estudios realizados hace 20 años revelaban una prevalencia del 20-25% de establecimientos infectados, hoy en día se encuentran animales positivos prácticamente en el 100% de los establecimientos. En un estudio realizado en nuestro país sobre 53 establecimientos lecheros del Departamento de Florida, donde se analizaron serológicamente 1060 animales se obtuvo una prevalencia de 47%. En este estudio, el 61% de los productores estimaron que la LBE puede afectar la producción. En el año 2003, la seroprevalencia (por ELISA) en 60 establecimientos de los departamentos de San José, Florida y Colonia fue de 77 %, 72 % y 57 %, respectivamente²⁸⁷. Recientemente en 2011 nuestro grupo confirmó la prevalencia de más del 50% en individuos mediante el desarrollo de una PCR en tiempo real²¹⁶.

La LBE tiene un impacto significativo desde un punto de vista económico en el descenso de la productividad doméstica y la pérdida de mercados internacionales, relacionado con: a) la mortalidad causada directamente por la patología tumoral; b) la alteración del sistema inmune del ganado infectado y el aumento concomitante de otras patologías infecciosas; c) la restricción de la exportación de ganado en pie infectado; y d) la restricción de la exportación de semen y de embriones infectados. Varios trabajos muestran una clara asociación entre la infección con BLV y la disminución de la producción de leche (2,5 a 3,5%), la disminución de los tiempos de sobrevida y el aumento de enfermedades infecciosas (mastitis, diarrea y neumonía)^{28, 71, 231}. Muchos países poseen programas voluntarios de control, además de políticas restrictivas a la importación de animales en pie.

Como se mencionó anteriormente la transmisión viral tiene lugar a través de la transferencia de células BLV positivas presentes en la sangre o leche de un animal infectado a un nuevo hospedero. Allí el virus replica activamente e infecta una población de nuevas células blanco. Luego de algunas semanas una fuerte y efectiva respuesta inmune limita la infección hacia nuevos linfocitos B²⁴⁵. Los linfocitos infectados luego proliferan y se expanden (expansión clonal o ciclo mitótico) siendo la mayoría de los animales infectados portadores asintomáticos del virus. Luego del período de latencia que varía de pocos meses hasta varios años los animales infectados con BLV desarrollan una proliferación policlonal de células B (linfocitosis persistente) lo que significa que distintos clones de linfocitos B con el virus integrado proliferan durante esta etapa. Esta etapa clínica se caracteriza por un aumento en el número absoluto de linfocitos B de sangre periférica, y se vuelven más abundantes que los linfocitos T. Se produce entonces una desregulación inmune que aumenta la expresión de moléculas inhibitoras de receptor en linfocitos T, inducidas por BLV y que pueden jugar un papel en la progresión de la enfermedad y la susceptibilidad a otras infecciones oportunistas. Esta etapa clínica puede durar años pero también podría progresar a la fase tumoral. Asimismo se observó una relación entre la cantidad de linfocitos B circulantes y la progresión de la enfermedad tumoral⁹⁴ donde aparentemente el número de copias de ADN proviral aumenta con la severidad de la enfermedad. Interesantemente en general el genoma proviral completo se mantiene durante el curso de la infección siendo las deleciones eventos raros a diferencia de lo que ocurre con HTLV-1 (presenta una alta proporción de genoma proviral

defectivo)^{139, 246}. En la condición tumoral o de linfoma la expansión de células infectadas tiene origen mono u oligoclonal lo cual implica que solo una o pocas células generan el tumor luego de múltiples divisiones. Esta es la fase terminal que lleva a la muerte del animal¹⁰⁴ (**Figura 1.1**).

El BLV es capaz de expandir la población pre-neoplásica de células B, generando la posibilidad de cambios celulares secundarios que pueden llevar a su transformación maligna, pudiendo provocar una hiperlinfocitosis⁹⁴.

El mecanismo de leucemogénesis en BLV difiere del resto de los retrovirus animales, dado que no posee un oncogen viral o activación insercional, en su lugar la función de la proteína Tax estaría vinculada a la activación transcripcional induciendo proliferación policlonal e inmortalización en parte de las células infectadas. La proteína Tax presenta también un potencial oncogénico, actuando en cooperación con la oncoproteína Ha-ras en la transformación completa de fibroblastos embrionarios de rata primarios²⁷⁶. Las funciones de transactivación y de inmortalización pueden ser disociadas mediante la introducción de mutaciones inducidas *in vitro* en regiones específicas de la proteína. Además, la transactivación del promotor LTR no es requerida para que Tax transforme células primarias *in vitro*²⁷⁷. De todos modos la función de esta proteína no sería suficiente para el establecimiento del desarrollo tumoral y algunos autores aseguran que se requiere de mutaciones en p53, de la actividad en el promotor de TNF α así como la fosforilación de alelos particulares asociados al complejo mayor de histocompatibilidad bovino clase II (BoLA)⁵ (a diferencia de otros alelos BoLA que se asocian con la resistencia a la infección viral¹²¹, **Figura 1.1**).

El tipo de infección que presenta el BLV posee características aparentemente contradictorias dado que la infección que establece es latente y silente pero sin embargo las primeras etapas son de replicación activa de las células infectadas e incluso luego de la integración el provirus de BLV sufre rondas sucesivas de transcripción activa seguidas finalmente de silenciamiento génico. A su vez la expresión de antígenos virales de BLV es raramente observada *in vivo* o en linfocitos aislados frescos^{94, 212}.

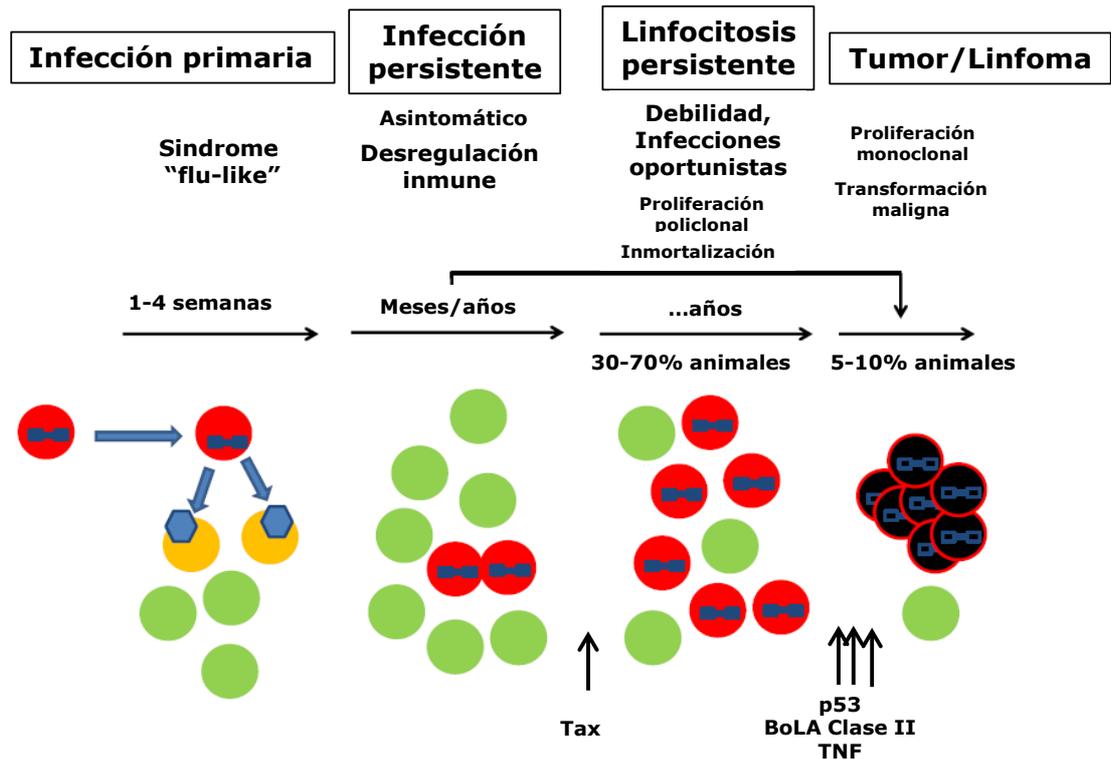


Figura 1.1: Curso clínico de la infección por BLV. Célula infectada (roja) con el provirus integrado (azul) es transmitida a un nuevo animal. Durante la infección primaria el provirus es expresado en partículas virales (hexágonos) que posteriormente infectan linfocitos B (naranjas). La replicación activa es responsable del síndrome tipo gripe ("flu-like") como el que se observa en la infección primaria por HIV-1. Durante la infección persistente las células con los provirus (rojas) se expanden por mitosis debido a la presencia de una fuerte respuesta inmune. Esta fase se caracteriza por una desregulación inmune. Durante la linfocitosis persistente (promovida por la acción de Tax) se observa un aumento de las infecciones oportunistas. Finalmente en la fase tumoral una célula infectada sufre mutaciones genéticas (negra) y forma linfomas dentro o fuera de los nódulos linfáticos (con participación de mutaciones en p53, fosforilación de alelos BoLA específicos y actividad en el promotor TNF α). Los tumores también pueden aparecer directamente en animales con infección persistente sin pasar por el estadio de linfocitosis persistente (flecha). Adaptado de Gutierrez y cols¹⁰⁴ y Aida y cols⁵

Aparentemente la señal inicial que da lugar a la expresión viral es la estimulación a través del receptor de linfocito B (BCR)^{45, 142}. Una vez iniciado la expresión viral es activada a través de la proteína Tax que interactúa a través de CREB con el 5' LTR^{60, 275}. La expresión proteica se regula postranscripcionalmente por Rex y R3^{7, 61}. Luego de la traducción de todas las proteínas estructurales se da el ensamblaje y brotamiento de la partícula viral. La vida media de esta célula presentando antígeno viral es muy corta dado que la respuesta inmune es altamente eficaz durante todo el proceso de la infección, razón por la cual la viremia está ausente en animales infectados²¹⁴. La estimulación permanente por antígenos virales refuerza la respuesta citotóxica y humoral efectiva. Además de la producción de viriones, proteínas como Tax, G4 y quizás microRNAs estimulan la proliferación celular y la duplicación del clon proviral^{95, 130, 221}. Dado que la célula escapa a la respuesta inmune luego del silenciamiento de la expresión viral, el provirus integrado puede replicar por mitosis de su célula hospedera. En general la expresión de antígenos virales está silenciada siendo por tanto una estrategia para reducir la inmunogenicidad, evadiendo la respuesta inmune y promoviendo una eficiente

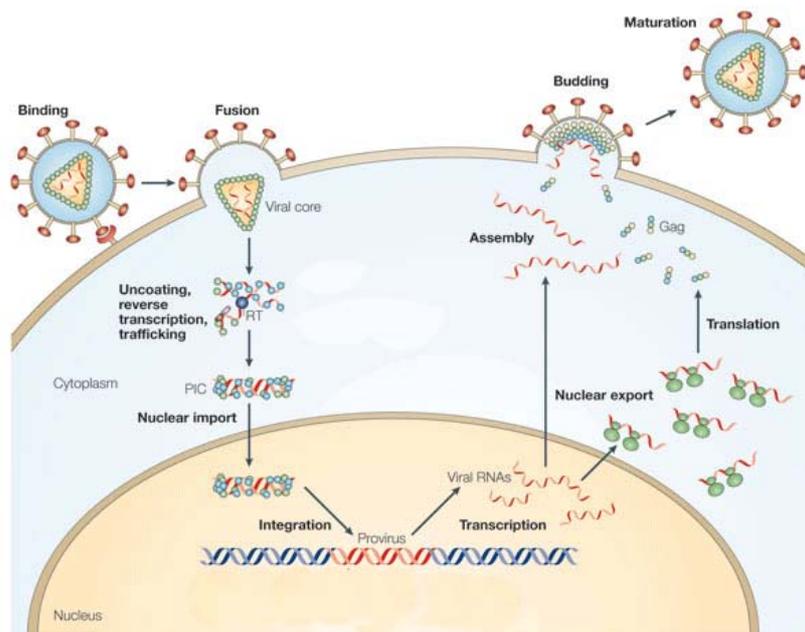


Figura 1.2: Ciclo replicativo de retrovirus donde se esquematizan los procesos de unión, entrada, retrotranscripción, integración, síntesis de proteínas, ensamblaje y liberación de nuevas partículas virales las cuales maduran fuera de la célula hospedera . Adaptado de Nisole y cols¹⁹²

propagación en vacas infectadas con BLV. En este sentido existe la hipótesis de que al menos dos poblaciones de linfocitos B conteniendo provirus estarían presentes durante la infección por BLV: una población de linfocitos B silentes para BLV caracterizadas por marcadores IgM^{low} (pueden proliferar sin ser atacadas por el sistema inmune) y otra población que expresa BLV caracterizadas por marcadores IgM^{high} (estas pueden transmitir el BLV a linfocitos B no infectados y serían detectadas por el sistema inmune, activándolo dando lugar a la eliminación de células infectadas. De hecho sería la población que mantendría la fuente de la infección)^{94, 114}. Las células B infectadas (tanto con LP como células de linfoma) frecuentemente expresan los marcadores CD5, IgM, IgG, CD11b, MHCII y CD25^{94, 173}. Asimismo dadas las características de su mecanismo de patogénesis el BLV ha sido utilizado como modelo de enfermedad tumoral presentando aspectos similares con la leucemia linfocítica crónica en humanos a tal punto que aún hoy se establece como hipótesis una posible etiología viral para esta enfermedad.

1.3 Ciclo replicativo, organización y estructura general del provirus.

En este capítulo inicial se describe el ciclo replicativo clásico de BLV que da lugar a la formación de partículas virales. Más adelante (capítulo 4) se describen otros mecanismos de transmisión descritos para HTLV-1 como la transmisión célula-célula (sinapsis virológica) así como la presencia de biofilms que seguramente tengan lugar también en el BLV. Estos mecanismos que inicialmente se describen como alternativos probablemente ocurran con una mayor proporción que lo inicialmente esperado contribuyendo a los mecanismos de evasión presentes en este virus^{20, 112, 198}.

Brevemente el ciclo replicativo comienza con la interacción de las glicoproteínas presentes en la envoltura viral (complejo trimérico Env formado por las subunidades gp51-gp30). En particular gp51 media la interacción con el receptor aún desconocido para BLV seguido de la fusión entre las

membranas viral y celular donde participa la subunidad gp30. Esto genera la liberación de la cápside conteniendo el genoma viral (ARN diploide de polaridad positiva en complejo con la proteína de nucleocápside) al citoplasma. Luego del desnudamiento el ARN viral se retrotranscribe en ADN formando el complejo de preintegración (PIC) el cual es importado posteriormente al núcleo del linfocito B. Una vez allí se integra por acción de la integrasa y queda constituido como provirus. En BLV no existirían sitios de integración preferenciales por parte del virus aunque aún es tema de debate. El provirus forma parte del genoma celular siendo por tanto estable y puede transcribirse gracias a la maquinaria de la célula hospedera dando lugar por un lado a ARN mensajeros virales que permiten la síntesis de distintas proteínas estructurales y reguladoras y también generando ARN genómicos necesarios para la formación de nuevas partículas virales²²⁷. La traducción de los ARN mensajeros da lugar a la producción de precursores poliproteicos estructurales Pr145 gagprtpol, Pr66gagprt, Pr44gag y gp72.

Las proteínas virales citoplasmáticas (los precursores poliproteicos) permanecerán en este compartimiento mientras que la glicoproteína Env (precursor que posteriormente dará lugar a gp51-gp30) seguirá la ruta RE-aparato de Golgi para la posterior oligomerización, glicosilación y exportación de la proteína a la membrana plasmática de la célula infectada. Finalmente el ensamblaje de la partícula viral tiene lugar en zonas particulares de la membrana plasmática que contienen las glicoproteínas de superficie gp51 y transmembrana gp30 (microdominios ricos en lípidos requeridos para reclutar componentes virales) donde las 2 copias de ARN genómico se asocian a las proteínas enzimáticas junto con las proteínas estructurales Gag dando lugar a la formación de las partículas virales. El precursor gag Pr44 se une a la membrana vía el motivo miristoilo (adquirido co-traduccionalmente) y a través de interacciones entre una región básica presente en MA (perteneciente a Gag) y PIP2. Estos viriones salen por brotamiento pero como formas inmaduras no infectivas. La formación de partículas virales inmaduras está mediada por la oligomerización de Pr44 que interactúa con la membrana plasmática y el ARN genómico viral, junto con la incorporación de Pr145gagprtpol que codifica para las tres enzimas: RT, integrasa y proteasa. Estas partículas inmaduras poseen un arreglo de Gag de modo que los dominios correspondientes a CA forman una malla hexamérica mientras que los dominios NC apuntan hacia el centro del virion interactuando con el genoma viral y otras moléculas Gag via NC. El brotamiento tiene lugar en sitios discretos de la membrana plasmática (lipid rafts) y en este proceso se reclutan mediante los llamados dominios tardíos (presentes en MA motivo PPPY) la maquinaria celular ESCRT (del inglés "endosomal sorting complex required for transport") que asisten el brotamiento y liberación de las partículas virales²⁶⁶. La liberación de la partícula viral da lugar a la activación de la proteasa la cual procesa tanto Pr44 gag como Pr145gagprtpol dando lugar a las proteínas individuales. Esto dispara el paso principal de maduración de la partícula viral en la cual Gag sufre procesamiento proteolítico (desensamblándose) dando lugar a las proteínas estructurales: i) matriz, que se asocia a las glicoproteínas de superficie y tapiza la envoltura viral permaneciendo unida a la misma, ii) cápside que tiene propiedades de autoensamblaje formando un core cónico de aprox 1500 copias de CA y iii)

nucleocápside que permanece asociada al genoma viral formando un complejo NC/ARN el cual condensa hacia el centro de la partícula junto con la estabilización del genoma de ARN dimérico. La partícula viral de BLV con Gag completamente clivada es la forma madura del virión y por consiguiente posee capacidad infectiva⁷⁶ (**figura 1.2**).

El genoma viral no sólo posee los genes estructurales clásicos de los retrovirus (*gag*, *prt*, *pol*, *env*) sino que además presenta una región suplementaria X que codifica para las proteínas de regulación. El provirus está flanqueado por dos secuencias idénticas de repetidos largos terminales LTRs (U3-R-U5). Los LTRs contienen los elementos de regulación necesarios para la expresión. Si bien la estructura de ambos LTRs es idéntica, su función es totalmente diferente. El LTR en 5' contiene los promotores necesarios para la regulación del inicio de la transcripción e interactúa con los factores específicos. Por su parte el LTR en posición 3' contiene las secuencias necesarias para la poliadenilación de los mensajeros virales^{17, 159}. Existen 3 tipos principales de transcritos del ARN mensajero: los que presentan *splicing* doble, *splicing* simple y los que no requieren *splicing*. El ARN mensajero que no necesita *splicing* codifica para las proteínas estructurales Gag (MA, CA, NC) y para las enzimas proteasa (Prt) y polimerasa (Pol). Las proteínas Prt y Pol son expresadas como proteínas de fusión Gag-Prt y Gag-Prt-Pol. Prt se separa del precursor Gag-Prt-Pol de forma autocatalítica y es responsable del procesamiento proteolítico para la maduración de Gag y Pol. Pol posee 3 dominios funcionales que son la transcriptasa reversa (ADN polimerasa- ARN dependiente) que permite la transcripción del ARN viral en ARN proviral; la ARNasa H que degrada el ARN del heteroduplex ARN/ADN presente durante la retrotranscripción y la integrasa la cual es necesaria para la integración del provirus en el ADN celular. El ARN mensajero que presenta un único evento de *splicing* codifica para las proteínas de la envoltura viral. Env es precursor glicoproteico que genera, luego del procesamiento proteolítico, las dos glicoproteínas de la envoltura: SU que es una proteína de superficie fuertemente glicosilada implicada en el reconocimiento del receptor celular y TM que es una proteína transmembrana que permite anclar el complejo SU-TM a la membrana viral^{90, 119, 120, 235}. Finalmente el ARN mensajero que sufre dos procesos de *splicing* codifica para las proteínas regulatorias: Tax, Rex, R3 y G4 (**figura 1.3**).

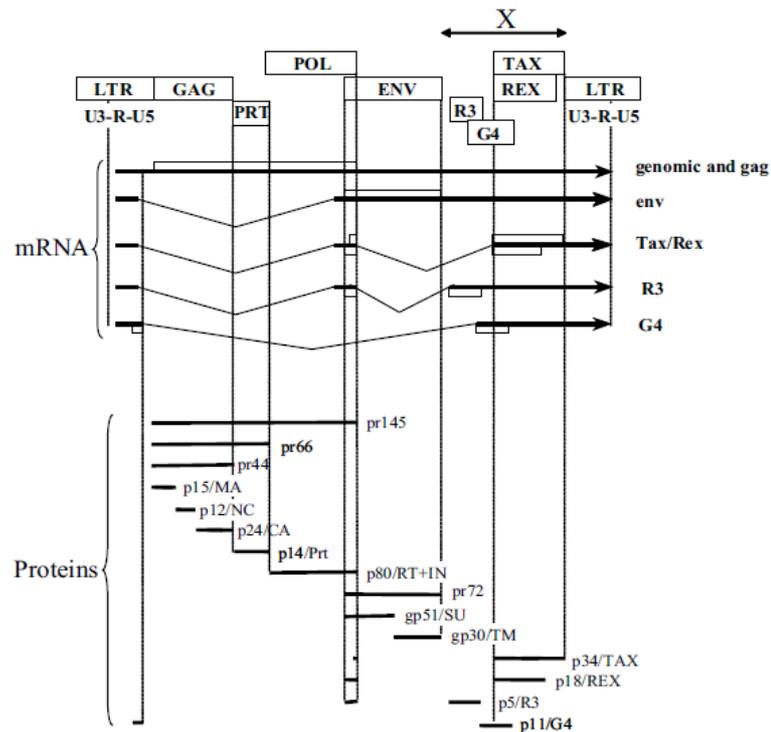


Figura 1.3: Estructura del provirus de BLV: genes, transcritos de ARN y proteínas virales. Una vez integrado este ADN proviral sirve como molde para la expresión de los precursores de gag-prt-pol (pr145), gag-prt (pr66) y gag (pr44) que son procesados en proteínas estructurales y enzimáticas: matriz (MA) p15, cápside (CA) p24, nucleocápside (NC) p12, proteasa (PRT) p14 y p80 (RT/IN) que posee actividad retrotranscriptasa, ARNasa H e integrasa. Un gran intrón correspondiente a gag-prt-pol es escindido para dar lugar al ARN que codifica para el gen env. Luego de la traducción, el precursor pr72 es procesado proteolíticamente en dos subunidades: la glicoproteína gp51 (SU) extracelular y la glicoproteína transmembrana gp30 (TM). Para generar el ARN mensajero Tax/Rex, un segundo intrón es procesado proteolíticamente. Este ARN con dos sitios de *splicing* codifica tanto la proteína Tax p34 utilizando el codón de iniciación presente al final del gen pol y la proteína Rex que comparte el mismo AUG que Env pr72. Dos ARNs menores identificados por RT/PCR codifican para las proteínas p5 (R3) y p11 (G4). El ARN de R3 es similar al mensajero Tax/Rex (que presenta doble *splicing*) pero el segundo intrón es más corto y el *splicing* ocurre en el extremo 5' del marco de R3. La proteína R3 comparte su extremo amino terminal con Rex y pr72. En el mensajero que codifica para G4 un gran intrón es escindido entre un sitio donador de *splicing* particular diferente del resto de los presentes en otros ARNs virales y un aceptor en 5' al marco de lectura de G4. La proteína G4 inicia en un codón CUG subóptimo localizado en el R presente en el LTR 5. Tomado de Gillet 2007⁹⁴

!

La región U3 del promotor de BLV, localizado en el repetido largo terminal (LTR) en posición 5' contiene varios elementos importantes de actuación en *cis* además de la caja CAAT, la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción^{59, 127}. Los principales elementos reguladores son tres copias de una secuencia no estrictamente conservada de 21pb secuencia llamada elemento de respuesta a tax (TxRE). Los TxREs son esenciales para la respuesta del promotor a la proteína transactivadora Tax codificada en el extremo 3' del genoma proviral⁶⁰. Estos elementos en *cis* contienen motivos similares a los elementos de respuesta al AMP-cíclico (CRE) así como secuencia E box. Que los elementos potenciadores no sean 100% conservados con respecto a los celulares sugiere que la activación por Tax no hace que CREB y otros factores estén continuamente activando la transcripción que exponga al virus a la eliminación por sistema inmune. Existe entonces una modulación de la transcripción mediante la represión de la misma.

La represión podría estar mediada por epigenesis o por proteínas tipo HBZ descritas para HTLV-1²⁷⁸. Tax no se une directamente al TxRE sino que interactúa con proteínas celulares que reconocen el CRE incluyendo los factores de transcripción CREB, ATF-1 y ATF-2^{2, 3, 278}. Tax es un activador transcripcional viral que aumenta la unión de CREB al ADN. Los factores de transcripción CREB/ATF regulan la transcripción directa del LTR al ser activados por dos protein quinasas celulares (Ej PKA y CaMKIV).

De este modo se resumen las características generales del virus, su patogénesis y ciclo replicativo así como las proteínas virales codificadas por el BLV para en los capítulos subsiguientes realizar un abordaje teórico específico de cada uno de los objetivos planteados.

2) Hipótesis de Trabajo

Las hipótesis de trabajo de esta tesis son las siguientes:

- 1)- Por homología con otros retrovirus (en particular HIV-1) consideramos que el análisis proteómico de partículas virales purificadas de BLV, aspecto aún no caracterizado, nos permitirá avanzar en la elucidación del componente proteico exacto de los viriones de BLV y la vez establecer si dentro del conjunto de proteínas presentes en los viriones se encuentran proteínas reguladoras (por ejemplo Tax) así como proteínas derivadas de la célula hospedera incorporadas de forma específica dado que participan en la interacción virus-célula hospedera. Asimismo consideramos este abordaje experimental el punto de partida para el estudio de modificaciones postraduccionales presentes en estas proteínas virales.
- 2)- Las glicoproteínas de fusión retrovirales (Env) presentan características bioquímicas y estructurales conservadas que determinan su mecanismo funcional, responsable de la entrada del virus a la célula hospedera. La caracterización bioquímica, biofísica y estructural de la glicoproteína Env-BLV permitirá establecer aspectos claves del mecanismo de acción de esta proteína de la cual no se tiene conocimiento previo a la vez que sería la primer glicoproteína de fusión caracterizada en deltaretrovirus contribuyendo al conocimiento en proteínas de fusión virales clase I. La purificación de la proteína Env de BLV en un sistema heterólogo en grandes cantidades permitirá analizar estas características bioquímicas, biofísicas y estructurales evaluando a su vez el uso de este tipo de proteínas recombinantes como reactivo diagnóstico y como plataforma para un futuro diseño racional de vacunas empleando esta proteína como inmunógeno.
- 3)- Por homología con la glicoproteína Env de HIV-1 el componente glucídico de la glicoproteína Env de BLV posee glicanos que permiten la evasión de la respuesta inmune así como otros que funcionan como determinantes antigénicos siendo un componente crucial en la interacción con la

célula hospedera. Este componente es el principal componente que contribuye al peso molecular de la proteína y la composición de glicanos será diferencial dependiendo del tipo de célula donde esta proteína se sintetice.

3) Objetivos de la Tesis

El **Objetivo General** de esta tesis consiste en ampliar el conocimiento existente sobre la biología del Virus de la Leucemia Bovina (BLV) mediante el análisis de su componente proteico, haciendo foco en la caracterización del proteoma del virión y en el estudio bioquímico, biofísico y estructural de la glicoproteína de envoltura Env. Dadas sus características funcionales y estructurales es una proteína que participa en un aspecto crucial de la infección viral como es la entrada del virus a la célula blanco, y por consiguiente es uno de los actores principales en la interacción virus-célula hospedero.

En este sentido los **objetivos específicos** son:

1. **Analizar el proteoma de partículas virales purificadas de BLV, obtenidas a partir de una línea celular persistentemente infectada.**
2. **Caracterizar a nivel bioquímico, biofísico y estructural la glicoproteína de superficie Env-BLV recombinante, y analizar sus propiedades antigénicas.**
3. **Caracterizar el componente glucídico de la proteína Env-BLV nativa y recombinante, y determinar los sitios de N-glicosilación.**

4) Análisis Proteómico del Virus de la Leucosis Bovina

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 Estructura general del virión, estequiometría y proteínas.

Como se mencionó en el capítulo 1 el genoma viral del BLV es un dímero de dos moléculas de ARN simple hebra de polaridad positiva poliadeniladas de aproximadamente 8,7 kb. Este ARN se encuentra asociado tanto a la proteína de nucleocápside como a la transcriptasa inversa constituyendo un complejo ribonucleoproteico que es protegido por una cápside viral (constituida por proteínas de la cápside). Rodeando esta estructura se encuentra la envoltura viral que se une a la cápside por las

proteínas de matriz. La envoltura viral, de origen celular, es adquirida durante su egreso de la célula infectada por brotamiento. En esta bicapa fosfolipídica se insertan las glicoproteínas virales de superficie (trímero de heterodímeros: complejo trimérico glicoproteico formado por las subunidades TM-SU) de origen viral que intervienen en la unión y entrada del virus a la célula hospedera (**figura 4A**).

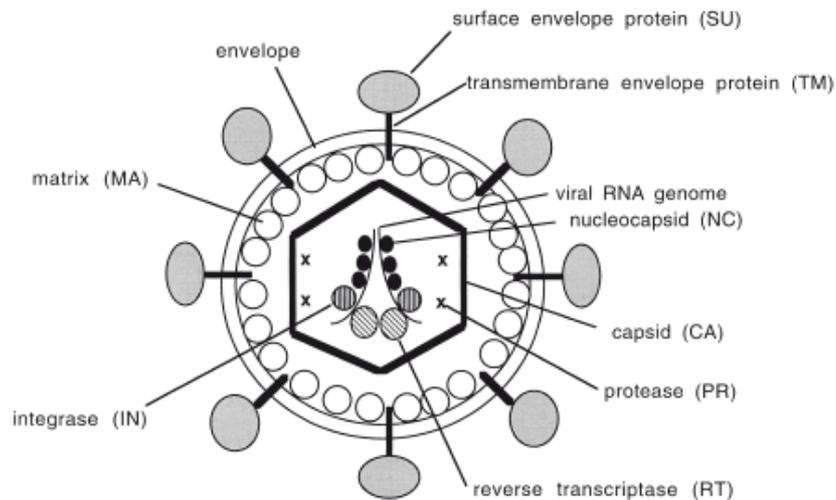


Figura 4A: Representación esquemática de la partícula viral de BLV. Dos copias de ARN genómico se empaquetan en el virión. Las proteínas de cápside CA (p24) forman la cápside que contiene el ARN viral y la proteína de nucleocápside junto con proteínas enzimáticas como la retrotranscriptasa RT, la integrasa IN y la proteasa PR (que también podría encontrarse fuera de la cápside). La proteína de matriz MA (p15) conecta la cápside con la cara interna de la bicapa lipídica que forma la envoltura viral. En ella se inserta el complejo Env formado por las subunidades (gp51 SU y gp30 TM). Tomado de Florins y cols⁷⁶

Los viriones de BLV poseen una morfología mayoritariamente esférica, con un diámetro muy variable, entre 60-125 nm^{73, 77}. La determinación más precisa se realizó en HIV-1 mediante crioelectrón-microscopía (145 nm de diámetro)^{80, 155, 226} dado que es el retrovirus mejor estudiado a nivel estructural y del cual se tienen detalles del proceso de maduración de las partículas virales, la distribución y abundancia relativa de proteínas virales que podrían ser extrapolables para BLV (**figura 4B**).

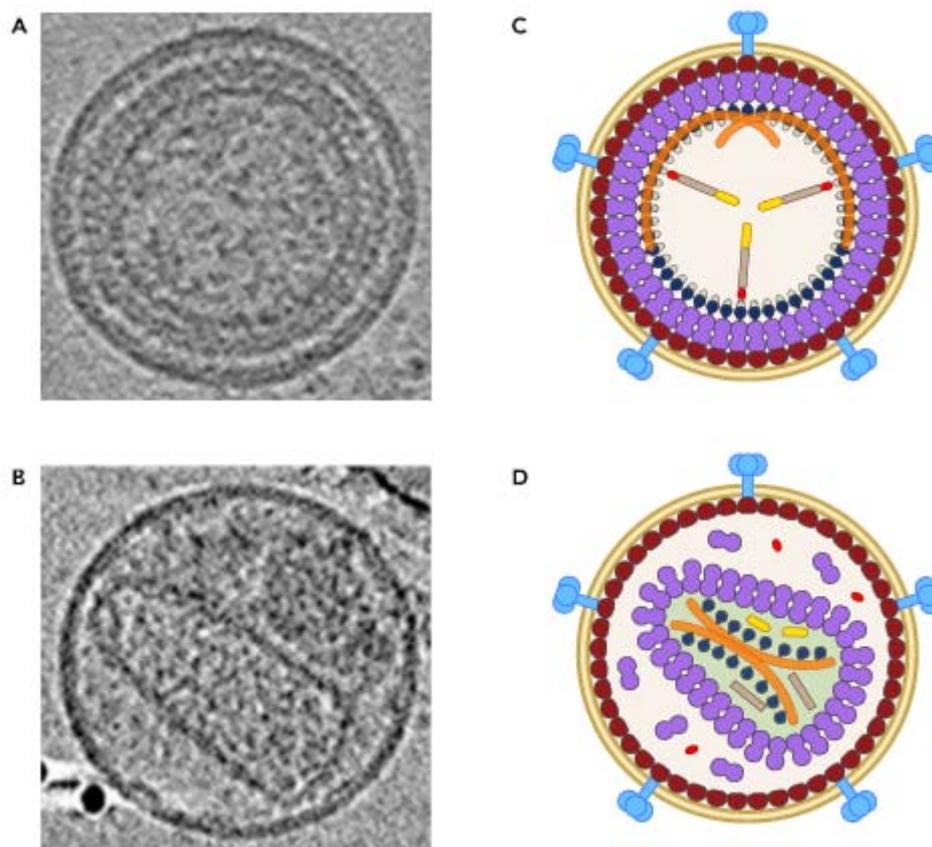


Figura 4B: Crio electrón tomografía de partículas virales de HIV inmaduras (A) y maduras (B) y modelos esquemáticos de los viriones correspondientes en C (inmaduro) y D (maduro)⁸⁶. Celeste: proteína Env; marrón: MA; violeta: CA; rojo: PRT; azul: NC; amarillo: IN; gris: RT; naranja: ARN genómico viral

4.1.1.1 Proteínas estructurales.

Todos los retrovirus competentes a nivel replicativo codifican al menos tres marcos abiertos de lectura principales: *gag*, *pol* y *env*. *Gag* se encuentra en el extremo amino terminal del genoma. El principal producto de la transcripción de este gen es el precursor Gag, una poliproteína que es procesada proteolíticamente por una proteasa viral (PR o PRT) para generar las proteínas de matriz (MA), de cápside (CA) y la proteína de nucleocápside (NC). Las proteínas Gag forman el core proteináceo dentro del cual se empaqueta el genoma de ARN viral. La expresión de Gag es suficiente para la formación de la partícula. Corriente abajo del gen *gag* se encuentra el marco de lectura abierto del gen *pol*. *Pol* es inicialmente expresado como un precursor poliproteico Gag-pol el cual es procesado por la proteasa PR para generar la transcriptasa reversa (RT) y la integrasa (IN). La región que codifica para PR ubicada entre *gag* y *pol* posee en el caso de BLV/HTLV un marco de lectura abierto individual. La RT media la conversión del genoma de ARN viral a ADN doble hebra y la proteína IN cataliza la integración del ADN doble hebra en el genoma de la célula hospedero⁸².

En el extremo 3' del genoma viral se encuentra el marco abierto de lectura del gen *env* que codifica para las glicoproteínas de la envoltura viral (Env). Al igual que los productos Gag y Pol, Env es sintetizada

como un precursor poliproteico, el cual es procesado proteolíticamente por una proteasa, en este caso de la célula hospedera, para dar lugar a las proteínas de superficie (SU) y la proteína transmembrana (TM). Durante el transporte el precursor de Env oligomeriza en trímeros. SU posee los determinantes para la unión al receptor celular mientras que TM está involucrado en catalizar la fusión de membranas entre la membrana de la envoltura viral y la membrana de la célula hospedera. Además de los genes estructurales *gag*, *pol* y *env* requeridos para la síntesis de la partícula viral, el genoma de BLV contiene una región X localizada entre la región *env* y el LTR en posición 3´.

4.1.1.2 Proteínas reguladoras.

Son cuatro las proteínas reguladoras que son codificadas por el genoma viral: Tax, Rex, R3 y G4. Rex es una fosfoproteína nuclear que regula a nivel post transcripcional que estabiliza y permite la exportación hacia el citoplasma de los ARNs genómicos y de los ARNs mensajeros que codifican para las proteínas estructurales Gag, Prt, Pol y Env.

Por su parte R3 y G4 están presentes a muy bajos niveles *in vivo*, R3 podría al igual que Rex estar implicada en la regulación postranscripcional de la expresión viral. R3 se localiza en el núcleo y en las membranas celulares G4 por su parte está localizada en el núcleo y la mitocondria, esta proteína se cree está implicada en la transformación celular. R3 y G4 no son indispensables para la infectividad *in vivo* pero la integridad de estos genes es esencial para la propagación eficiente dentro del hospedero.

Con respecto a la estequiometría de la partícula viral de BLV, los datos que se infieren acerca del número de copias de las distintas proteínas estructurales provienen de resultados obtenidos para HIV-1. En este sentido se estableció que la proteína mayoritaria sería la del precursor Gag cuya masa representaría el 50% de la masa total del virión inmaduro, con aproximadamente 5000 copias (2% ubiquitiniladas). Por su parte una vez maduro el virión posee el genoma viral formando un complejo ribonucleoproteico con NC, proteína básica que permite el empaquetamiento compacto del ARN (función tipo histona). Las moléculas de nucleocápside estarían en el entorno a las 1,500-2,000^{31, 257} mientras que las 2 copias de ARN representan las 2/3 partes de la masa de la partícula viral. Este complejo es encerrado completamente por la cápside viral compuesta por aproximadamente 1,500 moléculas de la proteína CA. La cápside contiene además moléculas pertenecientes a las proteínas enzimáticas estimando en unas 250 las moléculas de RT e IN presentes en el virión. Por su parte la proteasa se encuentra tanto dentro como fuera de la cápside con un total aproximado de 100 moléculas/virión. Finalmente la proteína Env también contribuye a la masa total del virión. Sin embargo y contrariamente a lo esperado el número de trímeros de Env presentes en la superficie de la partícula viral son extremadamente escasos: aproximadamente 10 trímeros/virión³⁰ cuya distribución no es uniforme en la envoltura viral (**figura 4B y 4C**).

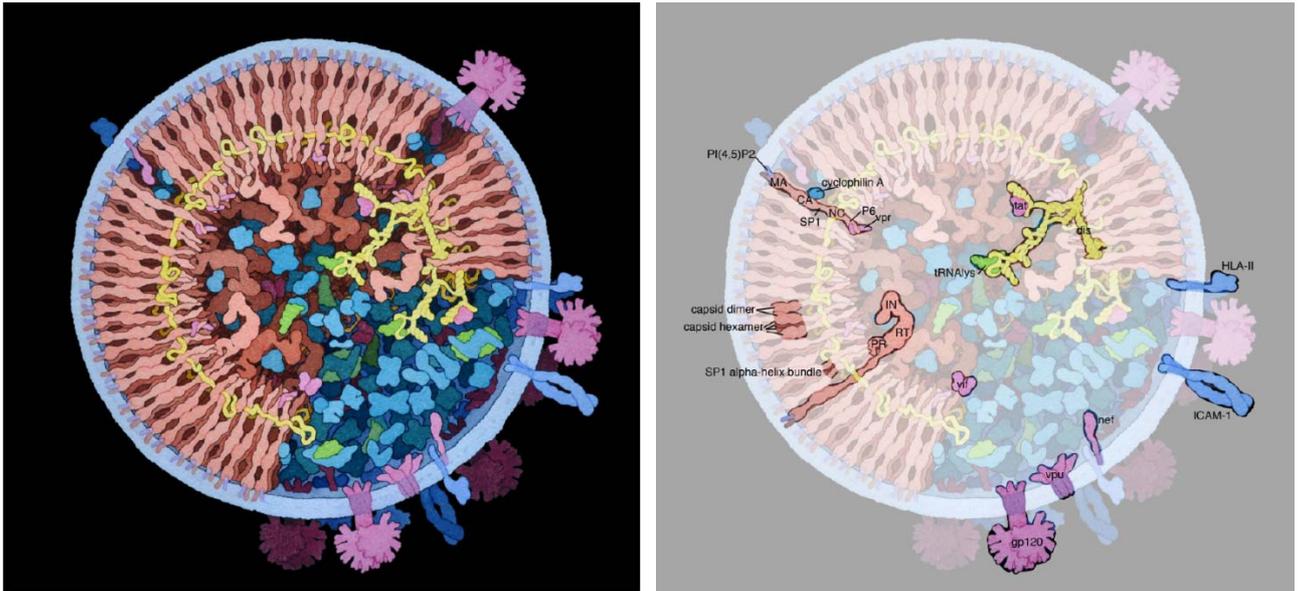


Figura 4C: Ilustración de la cápside inmadura de HIV en la cual se incorporan las proteínas virales y celulares encontradas en estas partículas virales. Tomado de www.scripps.edu/hive_center/pdfs/ImmatureHIV.pdf (Goodsell, 2014).

Con respecto a la presencia de proteínas reguladoras varias de estas proteínas son incorporadas en las partículas virales de HIV-1. La proteína accesoria vpr se encuentra en cantidades relativamente grandes, con unas 200 moléculas por partícula¹⁸⁵. La proteína Nef (de 5-10 moléculas por virión) aparentemente se halla unida a la membrana del virión inmaduro pero la mayoría 50-70% se cliva en su forma soluble en el virión maduro^{201, 273}. También se incorporan las proteínas Vpu, TAT/TAR y Vif (7-100 moléculas por virión).

Además de las proteínas virales las partículas virales de retrovirus, nuevamente en su mayoría estudiado para HIV-1 incorporan componentes de la célula hospedera de forma específica^{87, 93, 128, 179}. Uno de estos componentes es una única molécula de ARN transferencia (ARNt) incorporado en cada partícula retroviral, la cual permanece asociada vía su extremo 3' terminal, al extremo 5' del ARN retroviral. Este ARNt cumple un papel clave en la replicación actuando como cebador para la síntesis de ADN por la RT¹⁵⁵. Asimismo se incorporan otros ácidos nucleicos como ARNt, ARN ribosomales, y algunos ARNm.

Con respecto a las proteínas de origen celular son varias las proteínas del hospedero que se incorporan de forma específica en los viriones de HIV-1. En la **figura 4C** se observa una ilustración de la partícula inmadura de HIV-1 donde se observa la densidad de la partícula viral sin formación de la cápside, con escasas glicoproteínas de superficie y donde se observan las proteínas de origen celular que se incorporan de forma específica en los viriones. Entre ellas encontramos la ciclofilina A (relación 1:10 con Gag⁸¹ interactúa con CA favoreciendo el desensamblado), Hsp70 (relación 1:20 con Gag¹⁹⁷ interactúa con Gag estabilizando la estructura madura del virión), INI1 (unida a la integrasa¹⁹⁷ y participa

del ensamblaje), ubiquitina (relación 1:10 con Gag¹⁹⁷ y proteínas monoubiquitiniladas relación 1:50 con Gag, podrían participar en el brotamiento¹⁹⁷), TIP47 (unida a MA, función aun desconocida pero es una proteína vinculada al transporte lipídico⁴⁹), ABCE1 (se une a NC⁶⁶), Staufen1 (proteína de unión a ARN doble hebra que se une a NC⁴⁶ y coopera en la formación de la cápside), ICAM1 (interactúa con Gag y aumenta la infectividad viral dado que promueve la unión del virus¹⁹⁷), HLA-II (mecanismo para regular a la baja la respuesta de linfocitos T con inducción de anergia y apoptosis¹⁹⁷), APOBEC 3G (factor de restricción que evita la replicación viral y cuyo efecto es contrarrestado por Vif que provoca su degradación)¹⁵¹, tetraspaninas, tioltransferasa, etc.

4.1.2 Estudios proteómicos de partículas virales y retrovirales

El estudio detallado de la composición proteica de las partículas virales resulta central para poder comprender la infectividad viral, su unión y entrada a la célula hospedera, así como los mecanismos involucrados en la evasión al sistema inmune del hospedero. Tradicionalmente el análisis de las proteínas presentes en los viriones se realizó a partir de la purificación de los mismos, la separación por electroforesis y la identificación de bandas mediante anticuerpos específicos o mediante la secuenciación N-terminal por degradación de Edman¹²⁵.

En los últimos años se han desarrollado una combinación de posibilidades analíticas que integran entre otros la electroforesis bidimensional y la separación molecular por HPLC, con la utilización de enzimas proteolíticas específicas, el análisis final por espectrometría de masa y el acceso a bancos públicos de secuencias, lo cual permite la rápida identificación y caracterización de proteínas con diferentes patrones de expresión en las diversas situaciones estudiadas. Esto llevó a acuñar el término **Proteoma**, el cual puede definirse como el conjunto de proteínas expresadas por un genoma en condiciones definidas²⁰⁴. Se denomina proteoma de una partícula viral al conjunto de proteínas presentes en la misma sean de origen viral o de la célula hospedera. El conocimiento de este conjunto proteico y de sus modificaciones resulta de central importancia para entender una serie de complejos mecanismos relacionados con la biología viral, así como permitir la generación de nuevas herramientas para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Sin embargo, aunque podría esperarse que los proteomas de las partículas virales deberían ser mucho más simples de determinar que los proteomas de las células eucariotas, sólo unos pocos proteomas virales han sido definidos hasta el momento¹⁶⁹. En particular, considerando los virus a ARN con envoltura, solamente alguno de ellos (SARS, HIV-1, NDV) han sido estudiados en detalle por análisis proteómico^{220, 230, 286}. Del análisis de los mismos puede destacarse la identificación a nivel proteómico de nuevas proteínas virales que no habían sido deducidas a partir del genoma (ej Kappes y cols¹²⁶), así como la presencia en la partícula viral de proteínas de la célula hospedera. Como se mencionó

anteriormente en el caso de las partículas virales purificadas de HIV-1 pudieron detectarse varias proteínas de la célula infectada, entre las que se encuentran: MHC-II, ICAM-1, APOBEC 3G y ciclofilina A^{51, 290}. Estas proteínas podrían jugar un rol importante en la evasión a la inmunovigilancia durante la infección y a la susceptibilidad a anticuerpos neutralizantes.

En el caso específico de BLV, aunque la información genómica está disponible desde hace más de dos décadas, al día de hoy no existe ningún trabajo sobre el análisis proteómico de los viriones en este virus por lo que es de relevancia establecer cuáles son las proteínas virales presentes en el virión, confirmando las deducidas a partir de la secuencia genómica, identificando proteínas que presenten modificaciones post-transcripcionales y/o post-traduccionales e isoformas y también permitiendo la caracterización de proteínas cuyo marco abierto de lectura aún no haya sido identificado. Asimismo la identificación de proteínas de la célula hospedera puede ser muy informativa en relación a la biología de este retrovirus. Para ello se requiere de un buen sistema de purificación de partículas virales para evitar confundir proteínas que efectivamente se incorporan al virión con aquellas que quedan como contaminantes luego de la purificación. La obtención de partículas virales altamente purificadas es sumamente complejo, particularmente en casos donde existe bajo título viral y las partículas virales son inestables como es el caso de los retrovirus²³⁹.

4.2 OBJETIVO ESPECIFICO

Analizar el proteoma de partículas virales purificadas de BLV, obtenidas a partir de una línea celular persistentemente infectada.

La hipótesis de trabajo de este objetivo específico establece que la utilización de un análisis proteómico permitirá: i) identificar y caracterizar el conjunto de proteínas presentes en las partículas virales de BLV provenientes del genoma viral así como de la célula hospedera, ii) identificar y caracterizar modificaciones postraduccionales en las proteínas presentes en la partícula viral y iii) estudiar la respuesta inmunológica individual de diferentes animales infectados midiendo la inmunoreactividad de sueros pertenecientes a animales infectados al enfrentarse a una misma preparación de proteínas presentes en partículas virales purificadas, lo cual podría generar información importante para el desarrollo de nuevas metodologías diagnósticas para esta enfermedad.

4.3 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para alcanzar este objetivo específico las actividades realizadas fueron las siguientes:

4.3.1 Purificación de partículas virales de BLV.

4.3.1.1 Producción de partículas virales a partir de una línea celular persistentemente infectada con BLV.

4.3.1.1.1 Condiciones de cultivo para la obtención y purificación de partículas virales de BLV: La producción de partículas virales se realizó empleando la línea celular **FLK-BLV** persistentemente infectada con el virus²⁵¹. La línea celular FLK-BLV proviene de células de riñón de cordero fetal que posee integrado el ADN proviral de BLV (cepa belga) como resultado de la transformación de un cultivo primario para el establecimiento de la línea celular transformada. Esta línea celular adherente fue crecida con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco Invitrogen), suplementado con: L-glutamina (2mM), penicilina/estreptomicina 1%, piruvato de sodio 1%, HEPES (10mM) y suero fetal bovino inactivado (SFB-Gibco Invitrogen) al 10% para crecimiento celular y 1% para la obtención de partículas virales a partir del sobrenadante. Las células se incubaron a 37°C en estufa con saturación de CO₂ al 5%. La propagación de la línea se realizó empleando una solución de tripsina-EDTA 0,05%. La línea celular se almacenó en nitrógeno líquido (-196°C) en una mezcla 9:1 de SFB y DMSO. Previamente las células fueron pre-enfriadas a -20 y -70°C antes de colocarlas en nitrógeno líquido.

4.3.1.1.2 Inmunofluorescencia indirecta para evidenciar presencia de antígenos virales en línea celular persistentemente infectada: Previo a la producción a gran escala de los cultivos celulares de FLK-BLV se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) si las células efectivamente expresaban antígenos virales de BLV. Para la IFI las células FLK-BLV fueron sembradas en cámaras de 8 pocillos (Labtek), 5x10⁴ células/pocillo crecidas en RPMI 1% SFB, luego de 48 hs las células se fijaron con PFA 4% durante 30 min a 37°C, posteriormente se lavaron 3 veces con PBS (10 minutos/lavado). Se incubó durante 10 min con NH₄Cl 50mM diluido en PBS, se lavó con PBS y luego se permeabilizó con 0,3% Tritón-X100 diluido en PBS durante 5 min. Luego de 3 lavados con PBS, se bloqueó con PBS-leche 5% durante 1h a 37°C. El anticuerpo monoclonal anti-p24 (BLV3 VMRD) fue diluido 1/1000 en PBS-BSA1% y se incubó 30 min a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente los pocillos se lavaron 3 veces con PBS (10 minutos/lavado) previo a la incubación con un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a Alexa 488 diluido 1/500 en PBS. Este anticuerpo secundario se incubó 30 min a 37°C en cámara húmeda y se repitió el esquema de lavado. Finalmente se realizó una incubación a TA con DAPI (1ug/mL-DAKO), se lavó con PBS 3 veces.

4.3.1.1.3 Optimización de las condiciones de cultivo para la obtención de partículas virales: Para la producción de partículas virales se realizaron 10 cultivos en botellas de 150cm² a partir de los cuales se obtuvo el sobrenadante de cultivo con las partículas virales en suspensión. La densidad celular de partida fue de 2x10⁵ células en 25mL de medio por botella T150. Una vez que las monocapas llegaron a confluencia se cambió el medio a RPMI con 1% SFB. La colecta de sobrenadante se realizó diariamente durante 7-10 días, conservando el sobrenadante a 4°C hasta su procesamiento. El volumen de sobrenadante para la purificación de partículas virales fue de aproximadamente 1,5L. La presencia de

partículas virales en suspensión se evidenció mediante western-blot utilizando anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra las proteínas virales p24 (BLV3, VMRD-USA) y gp51 (BLV2, VMRD-USA).

4.3.1.1.4 Adaptación de la línea celular FLK-BLV al crecimiento en ausencia de SFB para la producción de partículas virales de BLV: Uno de los principales componentes del suero fetal bovino es la proteína seroalbúmina bovina y debido a que su peso molecular (66KDa) se encuentra en el entorno del PM de una de las principales proteínas virales presentes en las partículas virales (como gp51 o su precursor Env). Su presencia como contaminante en las preparaciones purificadas de partículas virales dificulta la identificación de las proteínas virales de interés. Por este motivo decidimos adaptar el cultivo de FLK-BLV para su crecimiento en ausencia de SFB. Para ello se prepararon 10 botellas T150cm² con la misma cantidad de células que en el protocolo descrito anteriormente y para el crecimiento exponencial del cultivo se agregó 10% SFB hasta que las monocapas fueran confluentes. Una vez alcanzada la confluencia se cambió el medio a RPMI con 1%SFB. De forma gradual este medio se fue sustituyendo únicamente con RPMI suplementado sin SFB hasta que las células quedaron en medio sin suero durante algunos días previo al comienzo de la colecta de sobrenadante.

4.3.1.2 Concentración y purificación de las partículas virales a partir del sobrenadante de cultivo obtenido.

Se optimizó un protocolo de concentración y purificación de partículas virales mediante la siguiente serie de pasos experimentales, el cual se esquematiza en la **figura 4.1:**

4.3.1.2.3. Ultrafiltración con ultrafiltros Vivaspín: con valor de corte de 1kDa (GE Healthcare) mediante centrifugación a 6,000 xg durante 15 minutos. Este sistema no se utilizó en todas las purificaciones.

4.3.1.2.4. Ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa: El gradiente discontinuo se formó con 0,8mL de 60% sacarosa y 1,7 mL de 25% sacarosa (ambas soluciones en buffer TNE). La suspensión concentrada de partículas virales (2,4mL) se depositó sobre la solución de 25% sacarosa y se ultracentrifugó a 270,000 xg a 4°C durante 140 minutos en micro-ultracentrífuga Sorvall Discovery M120, usando el rotor S52T (tubos de 5mL-**figura 4.3**). Alternativamente se utilizó un gradiente discontinuo de iodixanol (Optiprep™, Axis-Shield) al 50% y se ultracentrifugó a 160,000 xg durante 60 minutos. Posteriormente se obtuvo la banda (o halo) correspondiente a las partículas virales con pipeta automática.



Figura 4.3: Ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa (25/60%) para la purificación de partículas virales. Esta foto fue tomada luego de la ultracentrifugación y se observa un halo blanquecino (raya negra) correspondiente a las partículas virales que enfocan en la interfase del gradiente.

4.3.1.2.5. Ultracentrifugación en colchón de sacarosa al 20%: Para ello la muestra obtenida en 4.3.1.2.4. fue diluida 1:4 en buffer TNE previo a colocarse en el colchón de sacarosa al 20%. La ultracentrifugación se realizó a 190,000 xg durante 60 minutos.

4.3.1.2.6. Ultracentrifugación en gradiente continuo de sacarosa: La muestra obtenida en 4.3.1.2.4. fue diluida 1:5 en buffer TNE y se depositó en gradiente continuo de sacarosa (15-60%) para su posterior ultracentrifugación. Para la generación del gradiente continuo de sacarosa se utilizó un generador de gradientes (Amersham) con las soluciones de sacarosa al 15% y al 60% y se ultracentrifugó a 265,000 xg a 4°C durante 150 minutos en micro-ultracentrífuga Sorvall Discovery M120, usando el rotor S52T.

4.3.1.2.7. Pelleteo de las fracciones purificadas de partículas virales mediante ultracentrifugación: a 190,000 xg a 4°C durante 60 minutos en micro-ultracentrífuga Sorvall Discovery M120, usando el rotor S52T. Para ello la muestra proveniente del paso 4.3.1.2.5. o 4.3.1.2.4. fue diluida 1:4 en buffer TNE y se colocó en tubos conteniendo buffer TNE. Una vez obtenidas las partículas virales purificadas se les agregó inhibidor de proteasas (Complete-Roche) y se almacenaron a -20 o -80°C.

4.3.1.3 Control de calidad de las partículas virales purificadas obtenidas.

Las partículas virales purificadas fueron analizadas por:

4.3.1.3.1. Microscopía electrónica de transmisión: usando el equipo instalado en la Facultad de Ciencias (marca JEOL Modelo JEM-1010). Se prepararon las muestras diluidas en buffer TNE (o PBS en algunos casos), se colocaron en la grilla (10uL de muestra), se dejaron secar para drenar el líquido y se incubaron con ácido fosfotúngstico o acetato de uranilo durante 2 minutos para permitir el contraste por tinción negativa. Posteriormente se lavaron con H₂O para remover las trazas del diluyente de la muestra y se observaron.

4.3.1.3.2. SDS-PAGE y western blot de las partículas virales purificadas. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. La dosificación de proteínas presente en los preparados concentrados y purificados de partículas virales se realizó utilizando ácido bicinonínico (BCA) empleando BSA como proteína estándar de concentración conocida. Las muestras fueron sembradas en buffer de Laemmli en condiciones de reducción (6x), para obtener una concentración final de proteína por muestra de 1µg/µL, incubándose previamente a 100°C durante 5 minutos. Para evaluar el tamaño de las bandas obtenidas se incluyó un marcador de peso molecular de proteínas pre-teñido el cual también fue incubado a 100°C durante 5 minutos previo a su siembra en el gel. Se utilizaron 20µg de proteína para los geles de SDS-PAGE para tinción con azul de Coomassie y 8µg de proteína para los geles de SDS-PAGE para Western Blot. La corrida electroforética se realizó en buffer Tris-Glicina pH 8,3 en las siguientes condiciones: 20mA/gel para el gel concentrador (aproximadamente 20 minutos) y 25mA/gel para el gel separador (el tiempo necesario para que el frente de corrida alcance el borde del gel). Para el western blot la electrotransferencia se realizó en cuba de transferencia Amersham-Pharmacia sobre filtro de nitrocelulosa (Hybond-C) durante 1h 30 minutos a 300mA. Una vez finalizada la transferencia se evaluó la concentración de proteínas totales presentes en la membrana mediante tinción con rojo ponceau, la nitrocelulosa fue escaneada y luego se lavó con PBS. Posteriormente la membrana fue bloqueada con una solución de PBS-BSA 3% durante toda la noche. Una vez bloqueada, se incubó en primera instancia con los anticuerpos primarios diluidos en PBS-BSA 3%-Tween 20 0,3%. Para el revelado se utilizó un set de anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos dirigidos contra las proteínas virales p24 (BLV-3, 1:1000) y gp51 (BLV-2, 1:2000) (VMRD, USA) y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente. Los AcMo fueron removidos mediante 3 lavados con PBS-Tween 20 0,3% con agitación vigorosa durante 5 minutos. Los anticuerpos específicos se detectaron mediante un anticuerpo anti-Ig murinas conjugado a la peroxidasa, el cual se incubó diluido 1/5000 en PBS-BSA 3%-Tween 20 0,3%, durante 1h a temperatura ambiente. Las mismas condiciones de lavado fueron realizadas para la remoción del anticuerpo secundario conjugado no unido. Finalmente el revelado se realizó utilizando el sustrato quimioluminiscente ECL (GE-Amersham), basado en luminol, para la detección de la peroxidasa de rábano presente en el conjugado y se reveló mediante exposición de films (Hyperfilm ECL Amersham-GE Healthcare) durante un tiempo de exposición de 1, 2 y 20 minutos. Los films revelados se escanearon y analizaron con un software de análisis de imágenes.

4.3.2. Identificación mediante espectrometría de masa de las proteínas presentes en las partículas virales purificadas.

4.3.2.1. Separación de las proteínas presentes en las partículas virales mediante electroforesis bidimensional.

Todas las técnicas que se detallan a continuación fueron realizadas conjuntamente con la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UBYP A) del Institut Pasteur de Montevideo.

Las fracciones obtenidas después de la purificación de partículas se separaron electroforéticamente en una primera dimensión por isoelectroenfoque y en una segunda dimensión en un gel poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. El revelado de los geles se realizó utilizando técnicas de tinción con azul de Coomassie coloidal (CCB) y plata (AgNO_3) ambos compatibles con el análisis posterior por espectrometría de masa (MS, MALDI-TOF-TOF). En todos los casos los geles 2D se realizaron por duplicado: uno para la tinción y el otro se transfirió a membrana de nitrocelulosa para realizar Western Blot (se emplearon los mismos anticuerpos monoclonales antes mencionados).

En primera instancia las muestras fueron purificadas empleando el kit comercial 2-D Cleanup Kit (GE-Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta etapa de purificación es importante dado que ayuda a eliminar posibles contaminantes que pudieran interferir en el isoelectroenfoque. Para ello se emplearon 2-8 μg de proteína (para geles 2D SDS-PAGE/WB) y 30-100 μg de proteína (para geles 2D SDS-PAGE/ AgNO_3 y CCB) según el ensayo. En general para los ensayos de partículas virales la cantidad de proteína en todos los casos fue de 100 μg . En la etapa final de la purificación las proteínas precipitadas fueron resuspendidas en 125 μL de buffer de rehidratación (2M tiourea, 7M urea, 4% CHAPS, 0,5% anfólitos del rango de pH correspondiente, 40mM DTT y 0,002% azul de bromofenol). Se utilizaron 125 μL de buffer de rehidratación por muestra para tiras IPG de 7cm de longitud (GE-Healthcare). Posteriormente se clarificaron por centrifugación a 12,000 $\times g$ durante 5 min y el sobrenadante se cargó en las tiras IPG con gradientes inmovilizados de pH por el método de rehidratación pasiva durante 16hs a 20°C. Se utilizaron tiras de 7cm con 2 rangos de gradiente de pH diferentes según el ensayo: 3-11 no lineal (NL) y 4-7 lineal (L) (estas últimas se incorporaron en los ensayos de glicoproteómica-capítulo 6 tesis). Para ello la muestra en buffer de rehidratación se colocó en los canales de la bandeja de rehidratación en el sistema “manifold” (o en “strip holders”) y posteriormente se colocaron las tiras con el gel en la cara inferior permitiendo la absorción de las proteínas al gel. Las tiras se colocaron en contacto con los electrodos y se cubrieron con aceite mineral quedando preparadas para los procesos de rehidratación pasiva e IEF. En el caso de utilizar las bandejas de rehidratación (o manifold) se colocaron papeles de filtro humedecidos entre el gel y el electrodo.

La primera dimensión se realizó en un equipo Ettan IPGphor II (Amersham-Pharmacia). Se empleó el siguiente programa con diferentes condiciones eléctricas en función del rango de pH de las tiras IPG

utilizadas (a 20°C y una intensidad de corriente máxima de 50 μ A/tira). Para las tiras de rango 3-11NL las condiciones del IEF fueron las siguientes: 300V 30min/300-1000V 30min/1000-5000V 1h 20min/5000 V/h hasta 2000 V/h. Para las tiras de rango 4-7L las condiciones del IEF fueron las siguientes: 300V 30min/300-1000V 30min/1000-5000V 1h 20min/5000 V/h hasta 3000 V/h. A continuación se realizó la equilibración de las tiras a temperatura ambiente y con agitación suave empleando 2,5mL solución de equilibración/tira, primero con una solución de DTT para reducción de puentes disulfuro (urea 6M, Tris 75mM pH 8,8, SDS 2% y glicerol 29,3%, azul de bromofenol 0,002% + DTT 10 mg/ml) durante 15 min y luego se colocaron en una solución conteniendo iodoacetamida (IAA) (urea 6 M, Tris 75mM pH 8,8, SDS 2% y glicerol 29,3%, azul de bromofenol 0,002% + IAA 25mg/mL) para alquilación de grupos tiol y así prevenir su reoxidación durante la electroforesis, durante 15 min.

Una vez completado el proceso de equilibración las tiras se colocaron en la parte superior de geles de poli(acrilamida) al 12,5% (geles de 10x10cm). Las tiras se colocaron en contacto directo con el gel y se colocó papel de filtro conteniendo 5-8 μ L marcador de peso molecular preteñido (Page Ruler Fermentas). Por convención el PM se colocó hacia el extremo (-) de la tira. Para evitar que la tira de IEF se desplace durante la segunda dimensión, se colocó agarosa fundida conteniendo buffer de corrida al 1% (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%), a la cual se añadió azul de bromofenol para visualizar el frente de corrida. La electroforesis se realizó a 10mA/gel durante 30 minutos y luego a 20mA/gel hasta el final. Finalmente los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (en el caso de revelado por WB) o teñidos con azul de coomasie coloidal o AgNO₃. Para la tinción con azul de coomasie coloidal (G-250) se utiliza una solución conteniendo: Azul de Coomasie 0,08%, sulfato de amonio 8%, ácido fosfórico 0,8% y metanol 20%. Previo a la tinción con CCB los geles se fijaron en etanol 40%/ácido acético 10% durante al menos 30 minutos. La tinción con CCB se realizó durante toda la noche (como mínimo) y el exceso fue eliminado mediante lavados con agua destilada. Por su parte para realizar la tinción con plata se realizó el siguiente protocolo: a) lavado (etanol 50%/ácido acético 5% 20 min, etanol 50% 10 min, agua destilada 10 min), b) sensibilización (tiosulfato de sodio 0.02% 1min, agua destilada 2x1 min), c) teñido (nitrato de plata 0,1% 20 min a 4°C, agua destilada 2x1 min), d) revelado (formaldehído 0,04%/carbonato de sodio 2% durante 1-10 minutos con agitación, e) finalización (ácido acético 5% 1min), f) almacenamiento (ácido acético 1%).

4.3.2.2. Visualización de geles 2D teñidos y adquisición de imágenes

Los geles se escanearon utilizando el scanner (Amersham) y analizadas mediante el software Melanie 6.0 (Genebio, Swiss Institut of Bioinformatics). Se ajustaron los parámetros para la detección automática de spots, se asignaron valores de pI para cada uno de ellos y los valores de pH de la tira correspondiente. Para elegir los spots específicos a cortar (por ej. pertenecientes a la proteína gp51) la imagen correspondiente a la 2D SDS-PAGE con tinción con CCB (o AgNO₃) se superpuso con la imagen correspondiente al duplicado de la 2D SDS-PAGE pero revelado como WB utilizando el programa

Photoshop (**figura 4.4**). Una vez seleccionados los spots estos se cortaron en el 2D SDS-PAGE teñido con CCB o AgNO_3 .

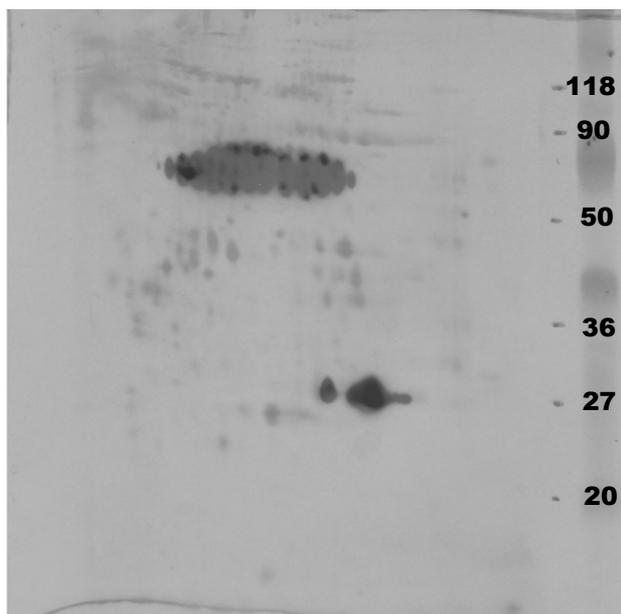


Figura 4.4: Las partículas virales se corrieron en paralelo en 2D SDS-PAGE para tinción con CCB (o AgNO_3) y para WB. Para elegir los spots a enviar para la identificación de proteínas, ambas imágenes (CCB/WB) fueron superpuestas, se marcaron los spots de interés y posteriormente se cortaron en el gel 2D para el análisis por MS.

4.3.2.3. Análisis e identificación de las proteínas seleccionadas a partir de 1D o 2D SDS-PAGE por espectrometría de masa (MS).

Los diferentes “spots” o bandas obtenidos a partir de los geles bidimensionales o unidimensionales, respectivamente, fueron cortados en condiciones libres de queratina y otras fuentes de contaminación. Los spots obtenidos de la 2D (así como las bandas derivadas de geles 1D) fueron cortados y colocados en buffer bicarbonato de amonio 0.2M/50% acetonitrilo (en caso de que sean teñidos con CCB) se incubó durante 30min a 30°C con agitación, se repitió el procedimiento y finalmente se realizó un lavado con acetonitrilo puro. Se secaron las bandas y posteriormente se realizó la digestión con tripsina (calidad de secuenciado, Promega, USA) en bicarbonato de amonio 50mM pH 8,3, se incubó toda la noche a 37°C. La digestión se detuvo con ácido trifluoroacético al 1%, el cual se emplea para la extracción de los péptidos del gel. Se guardó sobrenadante y el gel fue incubado con 0.1%TFA/60%Acetonitrilo durante 1h con agitación. Finalmente se concentraron los sobrenadantes en speedvac (para evaporar acetonitrilo) y los péptidos fueron purificados mediante micro cromatografía en fase reversa (C18, Ziptips, Millipore, USA). Una vez extraídos, los péptidos se sembraron y cristalizaron junto a la matriz CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico) en una placa de medida (Applied Biosystems, MDS sciex, USA).

El análisis por MS (huella peptídica y espectros de fragmentación peptídica) se realizó utilizando el equipo “4800 MALDI TOF-TOF analyzer” (Applied Biosystems, MDS sciex, USA) perteneciente a la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas (UBYPA) del Institut Pasteur de Montevideo. Los espectros de masa se midieron en modo reflector positivo (o negativo únicamente en el caso de la confirmación de N-glicanos por MALDI). Se realizó una calibración interna empleando como referencia m/z

correspondientes a la autólisis de la tripsina obteniéndose una precisión típica para la medida de masa de ± 25 ppm. Posteriormente se eliminaron las señales conocidas provenientes de tripsina y queratina. Las m/z de los péptidos tripticos encontrados fueron trabajadas en el programa Data Explorer. La identificación de las proteínas presentes en cada muestra se realizó mediante comparación de los datos obtenidos experimentalmente con los datos teóricos depositados en bases de datos de uso público (Swiss Prot, NCBI, etc.) y mediante la utilización de motores de búsqueda específicos (Mascot, Matrix Science Ltd., USA).

Los datos de fragmentación (MS/MS) fueron combinados con los datos de MS provenientes de la identificación (huella peptídica) para llevar a cabo las búsquedas en bases de datos y un margen de error de 0,5Da. Los parámetros de búsqueda incluían además modificaciones por ej cisteínas modificadas (como producto de la alquilacion por IAA) y modificaciones variables por ej oxidación de metioninas, deamidacion (NQ).

4.3.3. Análisis de modificaciones postraduccionales de proteínas incorporadas a la partícula viral de BLV.

4.3.3.1. Tratamiento con fosfatasa para analizar fosforilación en proteína de cápside de BLV.

La muestra conteniendo partículas virales purificadas de BLV fue tratada con inhibidor de proteasas (Complete-Roche) previo al tratamiento con la fosfatasa. La muestra se dividió en dos: 100 μ g se emplearon como control y a los otros 100 μ g se les agregó fosfatasa alcalina (CIAP-Roche). Se utilizaron 25U de enzima cada 100 μ g de proteína. Ambas fracciones se incubaron 1h a 37°C. Se realizaron geles bidimensionales para ambas muestras tanto para tinción con CCB y posterior identificación de spots por espectrometría de masa así como geles bidimensionales para la identificación por SDS-PAGE/WB empleando tanto anticuerpos monoclonales como policlonales comerciales (como se describe arriba). Los spots de interés fueron elegidos por superposición de imágenes correspondientes al 2D SDS-PAGE/CCB y 2D SDS-PAGE/WB (con y sin fosfatasa) como se describe en la **figura 4.4**.

4.3.4. Análisis de la inmunoreactividad de las proteínas presentes en las partículas virales frente a un grupo de sueros seropositivos para BLV.

A partir de partículas virales purificadas se realizó 2D SDS-PAGE/WB, estas muestras fueron enfrentadas a un suero bovino seropositivo para BLV (suero policlonal comercial α -BLV-VMRD, USA). Los anticuerpos específicos se detectaron mediante un anticuerpo anti-Ig bovinas conjugado a la peroxidasa y se revelaron con el sustrato quimioluminiscente ECL (GE-Amersham). Los films revelados se escanearon y analizaron con un software de análisis de imágenes.

4.3.5. Estudio preliminar de la presencia de biofilms de BLV en la línea celular BL3.1.

Para estos ensayos se empleó la línea celular persistentemente infectada con BLV denominada **BL3.1** (ATCC CRL-2306), proveniente de un linfosarcoma de linfocitos B bovinos generada por irradiación. Las células BL3.1 son una variante que no expresa MHC clase I pero que tiene una alta expresión de MHC clase II y producen activamente BLV. Esta línea celular fue crecida con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco Invitrogen), suplementado con: L-glutamina (2mM), penicilina/estreptomicina 1% y suero fetal bovino **sin** inactivar (SFB- Gibco Invitrogen) al 10% para crecimiento celular. Las células se incubaron a 37°C en estufa con saturación de CO₂ al 5%. Esta es una línea en suspensión por lo tanto la propagación de la línea se realizó mediante centrifugación a 1200 rpm, resuspendiendo las células mediante pipeteo en medio de cultivo nuevo a una densidad celular de 5x10⁵ cels/mL El mantenimiento del cultivo puede realizarse sin centrifugación mediante el agregado de medio fresco; la concentración celular debe estar en un rango de 5x10⁵ - 2x10⁶ células viables/mL. La línea celular se almacenó en nitrógeno líquido (-196°C) en una mezcla 9:1 de SFB sin inactivar y DMSO siguiendo el mismo procedimiento de congelado que para las células FLK-BLV.

Para el estudio preliminar de la presencia de biofilms en BLV las células BL3.1 fueron crecidas en cultivo en presencia y ausencia de activación por forboléster PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) el que actúa como activador policlonal de linfocitos B. La activación se realizó con concentraciones de PMA de 16, 100, 200, 300nM y 1µM y de 200nM de PMA + 565nM de ionomicina (como sugiere la literatura para la activación de BLV ¹⁷⁴). La activación fue realizada en el momento que las células fueron sembradas (t=0). Las células se sembraron en placas de 6 pocillos con una densidad celular de 0.5x10⁶ células/mL en un volumen de 3mL RPMI 10% SFB sin inactivar. La activación se realizó desde t=0 y las células fueron colectadas a t=0, t=24, t=48 y t=72hs.

Para cada condición se tomaron 500µL de cultivo (0.5 x 10⁶ cels/condición), se centrifugaron a 2,000 xg durante 5 minutos y se resuspendieron en 80µL de RPMI sin SFB. Estas células se colocaron en cubreobjetos tratados previamente con 0.002% w/v poli L-lisina (Sigma-Aldrich, durante 1h a TA) y colocados en placas de 6 pocillos. Una vez que la suspensión celular se colocó en los cubreobjetos se incubó durante 5 min a 37°C y posteriormente se centrifugaron durante 1 min a 300 rpm. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a TA y luego se agregó 10mM NH₄Cl 10 min a TA.

El bloqueo se realizó con PBS-BSA 1% para el marcaje de la proteína gp51 y en el caso de p24 se realizó el bloqueo y la permeabilización en el mismo paso empleando PBS-BSA 1%-saponina 0,05%. Los lavados se realizaron en la solución de bloqueo (3 veces, 3min/lavado).

Con el fin de determinar la presencia de biofilms de origen viral que estuvieran en contacto con las células pero no formando parte de ellas se realizaron varios marcajes en simultáneo con el fin de visualizar la constitución de los biofilms, su delimitación y poder diferenciarlo de las células infectadas.

Para ello se evaluó la presencia de componentes virales, membrana plasmática, matriz extracelular y también se incorporaron lectinas de modo de establecer si alguna de ellas reconocía específicamente las estructuras virales tipo biofilm.

Para los **antígenos virales** los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-p24 (BLV3- murino isotipo IgG1- VMRD) que reconoce un epítopo lineal (es el mismo que se utilizó en los WB), anti-gp51 (BLV1- murino isotipo IgG1-VMRD) reconoce un epítopo conformacional. Las diluciones de los anticuerpos primarios se realizó en la solución de bloqueo correspondiente: 1/200 para BLV3 y 1/500 para BLV1, la incubación se realizó a TA durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: anti-IgG1-FITC o anti-IgG1-Cy5 ambos diluidos 1/100 en la solución de bloqueo correspondiente y se incubaron durante 45 min a TA. Finalmente si se empleó el secundario anti-IgG1-FITC, se realiza una última incubación con un conjugado anti-FITC-Alexa 488 (diluido 1/100 en la solución de bloqueo correspondiente y se incubó 30 min a TA).

Para el marcaje de **membrana plasmática** se emplearon los anticuerpos primarios: i) anti-CD98 (murino isotipo IgG2a), CD98 se expresa en linfocitos activados B y T, diluido 1/100; ii) anti-CD45 (murino isotipo IgG2a), CD45 se expresa en linfocitos B, diluido 1/100. Las diluciones de los anticuerpos primarios se realizó en la solución de bloqueo correspondiente y la incubación se realizó a TA durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: anti-IgG2a-Alexa 647 (diluido 1:200) o anti-IgG2a-Cy3 (diluido 1/100) en la solución de bloqueo correspondiente y se incubaron durante 45 min a TA.

Para el marcaje de componentes de **matriz extracelular** se emplearon los anticuerpos primarios anti-agrina (anticuerpo policlonal de conejo, la agrina es un proteoglicano de tipo heparán sulfato) diluido 1/200, y Ace conjugado con Alexa 488 (diluido 1/40). Ace es una adhesina que une colágeno y proviene de la bacteria *Enterococcus faecalis*. En los ensayos en los que se utilizó Ace el marcaje con esta adhesina se realizó con las células en cultivo las cuales se incubaron 2 horas a 37°C con Ace en oscuridad previo a fijar las células. El marcaje con anti-agrina se realizó durante 1 h a TA. El anticuerpo secundario utilizado para la condición donde se empleó anti-agrina fue un anti-conejo-Cy3 diluido 1/100 en la solución de bloqueo y fue incubado 45 min a TA.

Finalmente también se realizó marcaje con **lectinas** utilizándose el siguiente panel (tabla 4.1):

Tabla 4.1. Lectinas utilizadas para la caracterización de biofilms.

Lectinas	Abrev.	Especificidad	Condiciones
Concavalina A-FITC	Con A	α -man, α -glc	1/100 + anti FITC-Alexa 488 (1/100)
Lens culinaris-FITC	LCA	α -man	1/100 + anti FITC-Alexa 488 (1/100)
Ulex europeus-FITC	UEA-1	α -L-fucose	1/100 + anti FITC-Alexa 488 (1/100)
Glycine max-TRITC	SBA	galNAc	1/20
Arachis hypogaeae-FITC	PNA	β gal(1 \rightarrow 3)galNAc	1/100 + anti FITC-Alexa 488 (1/100)
Triticum vulgaris-FITC	WGA	(glcNAc) ₂ , NeuNAc	1/100 + anti FITC-Alexa 488 (1/100)
Hippeastrum hybrid-Biotin	HHL	α -man	1/100 + strep-Alexa 488 (1/100)
Phaseolus vulgaris E-TRITC	PHA-E	oligosacáridos	1/50
Tetragonolobus purpureas-Biotin	LTA	α -L-fucose	1/20 + strep-Alexa 488 (1/100)
Concavalina A-Biotin	ConA	α -man, α -glc	1/100 + strep-Alexa 488 (1/100)
Concavalina A-TRITC	ConA	α -man, α -glc	1/50

En todos los casos luego del agregado de los anticuerpos (entre cada una de las incubaciones) se realizaron lavados en la solución de bloqueo (3 veces, 3min/lavado). El lavado final una vez terminada la incubación de todos los anticuerpos se realiza con PBS-BSA 1%-saponina 0,05% previo a la incubación con DAPI (1 μ g/mL) durante 20 min RT diluida en esta solución de lavado. Finalmente se lava nuevamente con esta solución, luego únicamente con PBS y se realiza el montaje (Fluoromount-Sigma).

4.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este primer objetivo específico, de carácter descriptivo, fue concebido de forma tal que permitiera en base a los resultados obtenidos generar nuevas hipótesis sobre la biología de la interacción virus-célula. Nuestro interés estuvo centrado en primer lugar en poder identificar todas las proteínas estructurales de BLV, a su vez establecer el tipo de modificación postraduccional presente en las proteínas que lo tuvieran y posteriormente establecer si alguna de las proteínas reguladoras, en particular Tax (transactivador transcripcional que además posee gran potencial oncogénico), era incorporada a la partícula viral. Como se mencionó anteriormente esta idea está basada en lo observado para HIV-1 donde se determinó que las partículas virales incorporan no sólo proteínas estructurales sino también proteínas reguladoras como Tat, Nef, Vif, etc.⁵¹.

4.4.1. Obtención y análisis de partículas virales de BLV purificadas.

Para la producción de partículas virales purificadas de BLV se utilizaron sobrenadantes de cultivo de la línea celular FLK-BLV persistentemente infectada con el virus. En la **figura 4.5** se muestra la IFI correspondiente a esta línea celular utilizando anticuerpos dirigidos contra p24.

Como se observa en la figura hay expresión de la proteína p24 aunque no todas las células lo expresan. De todos modos la expresión observada nos permitió proseguir con los ensayos de optimización para la producción y purificación de partículas virales a partir de esta línea celular.

La optimización de dicho protocolo implicó establecer la densidad celular de partida para el inicio de los cultivos (2×10^5 cels/25mL) y el tiempo de colecta del sobrenadante y los pasos de purificación necesarios para obtener partículas virales en alta concentración y con un estado de pureza tal que permitiera realizar ensayos de identificación de proteínas. Con respecto a la concentración de

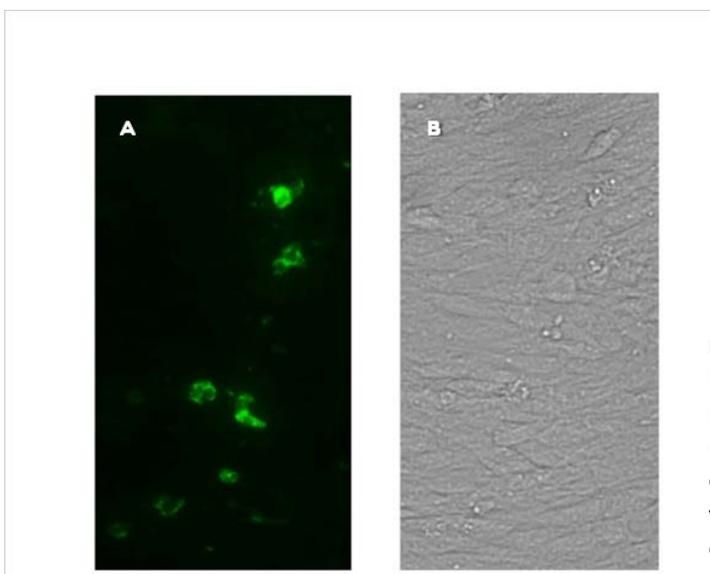


Figura 4.5: Presencia de antígenos virales en la línea celular FLK-BLV utilizada para la producción de partículas virales. **A:** IFI utilizando el AcMo dirigido contra p24, se observan células que expresan dicha proteína viral. **B:** misma captura que en A) Microscopía de Contraste Diferencial interferencial (DIC).

partículas la incorporación de la ultrafiltración tangencial por el dispositivo PelliconXL permitió determinar que puede concentrarse hasta 50 veces el volumen inicial. El tamaño del poro permitió recuperar en el retentato las partículas virales concentradas aunque también concentramos uno de los principales contaminantes como es la albúmina presente en el suero fetal bovino.

En la **figura 4.6** se muestran distintas etapas en la producción, concentración y purificación de las partículas virales. Se observa que con el correr de los días el sobrenadante de FLK-BLV presenta una mayor expresión de la proteína de superficie gp51. La incorporación de una etapa de ultrafiltración mejora enormemente la cantidad de material obtenido y a su vez todas las proteínas virales quedan en el retentato (**ver figura 4.6 retentato vs permeato**).

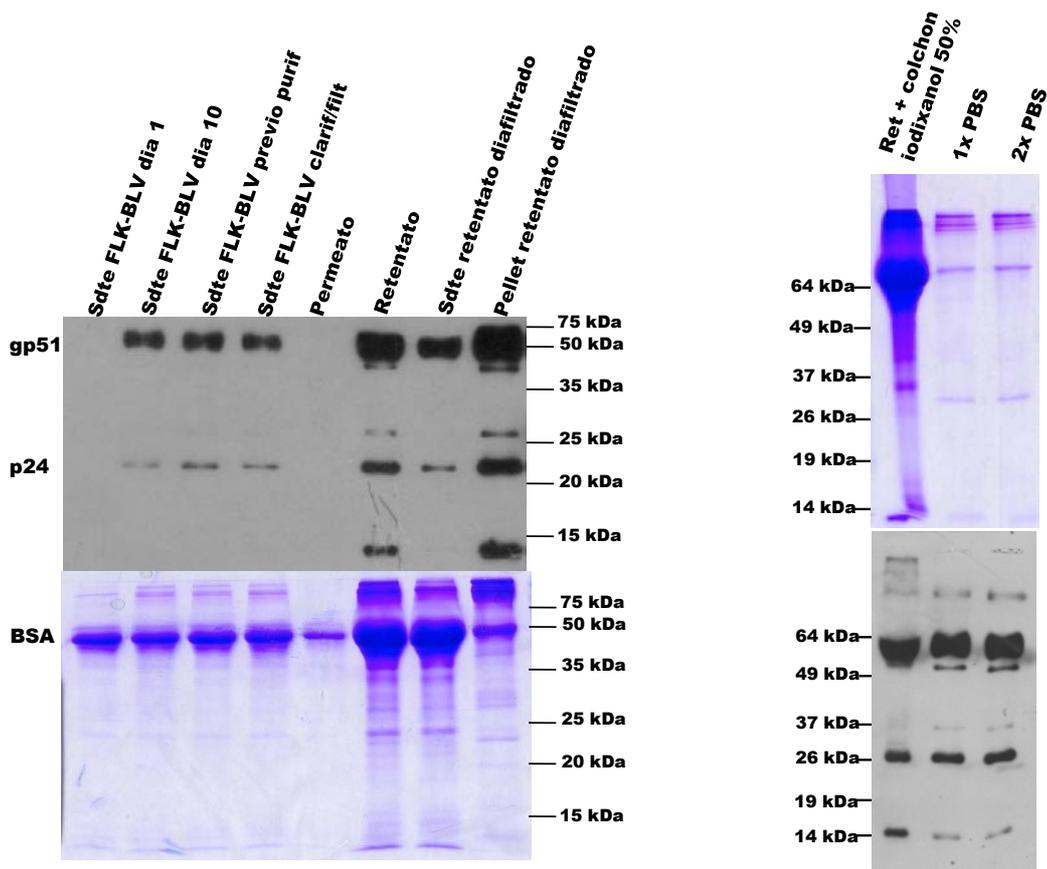


Figura 4.6: **A:** Análisis por SDS-PAGE/WB (AcMos anti-p24 y anti-gp51) del perfil de proteínas de las distintas fracciones obtenidas durante la concentración y purificación de partículas virales de BLV (desde el sobrenadante hasta la ultrafiltración tangencial). **B:** Análisis por SDS-PAGE/WB (AcMos anti-p24 y anti-gp51) de la fracción correspondiente al retentato luego de efectuar 1 (1x PBS) y 2 lavados (2x PBS) con el fin de eliminar la BSA y del retentato luego de la ultracentrifugación en gradiente discontinuo de iodixanol (50%).

En el caso de la **figura 4.6A** el material obtenido en el retentato fue diafiltrado con buffer TNE para eliminar restos de medio de cultivo (moléculas <500kDa) y eliminar el rojo fenol. La diafiltración del retentato no pudo realizarse en todas las purificaciones debido a que el retentato precipitaba y si bien la cantidad de material era abundante, la calidad de las partículas virales era baja ya que se formaba un agregado o pellet que dañaba a las partículas virales (**figura 4.7A**) y a su vez dañaba el PelliconXL. Debido a la precipitación del retentato se pudo separar pellet de sobrenadante donde la mayoría de las partículas virales se encontraban en el pellet. Este pellet se lavó 2 veces con PBS (**figura 4.6B**) con el fin de eliminar la BSA. A su vez en paralelo el retentato (el material original sin diafiltración) fue purificado en un colchón de iodixanol al 50% con el fin de comparar la calidad del material obtenido en ambos casos. Es importante destacar que la proteína de cápside p24 se expresa más intensamente en las fracciones más purificadas mientras que gp51 aparece a lo largo de todo el proceso de purificación si bien su concentración aumenta enormemente con la concentración/purificación (**figura 4.6B**).

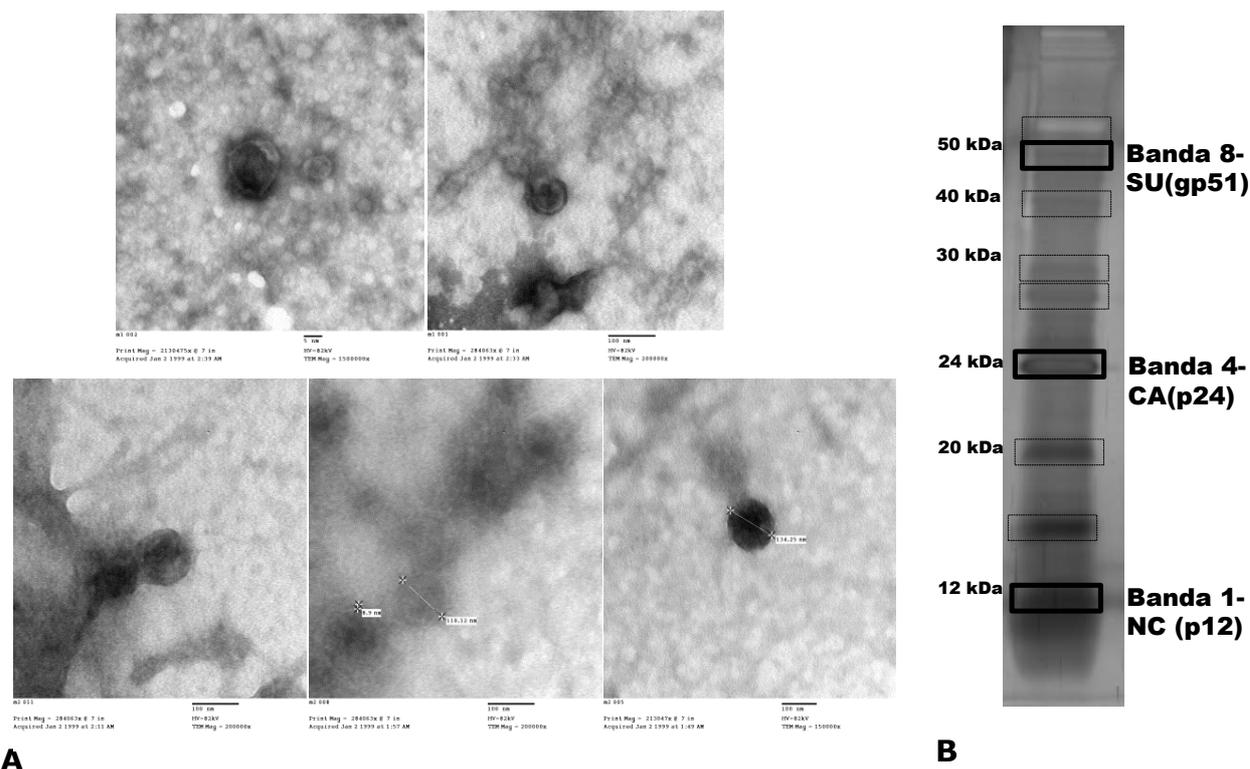


Figura 4.7: **A:** Micrografías electrónicas de transmisión de partículas virales de BLV obtenidas por tinción negativa. Arriba- Fracción recuperada del halo luego de la ultracentrifugación en colchón de iodixanol al 50% (fig 4.6B). Tinción con ácido fosfotúngstico. Abajo- Pellet de retentado diafiltrado luego de 2 lavados con PBS (fig 4.6B). Tinción con ácido fosfotúngstico. **B:** 1D SDS-PAGE/AgNO₃ del pellet de retentado luego de 2 lavados con PBS (fig 4.B). Se cortaron las bandas que se señalan en la figura (línea punteada y continua) para su análisis por espectrometría de masa. Sólo aquellas enmarcadas en línea continua fueron identificadas (gp51, p24 y p12).

Existe una banda por debajo de los 15kDa que aparece únicamente en las fracciones más purificadas de las partículas virales, esta podría representar a un producto de proteólisis de la proteína de cápside, o también podría ser compatible con la proteína de matriz (MA o p15), ya que en un trabajo de tesis²⁶⁷ se describe que el AcMo α -p24 BLV3 también podría reconocer a la proteína MA. Esto implica que estaríamos en presencia de partículas virales altamente purificadas. Cabe destacar que la detección de gp51 *per se* no implica estar en presencia de partículas virales dado que al ser una glicoproteína de superficie su expresión en la membrana hace que pueda detectarse en vesículas extracelulares: microvesículas o exosomas y no únicamente en partículas virales. Por este motivo siempre es importante incluir el AcMo que reconoce p24 y la presencia de ambas proteínas de alguna manera asegura estar en presencia de partículas virales de BLV. Si a eso le sumamos la presencia de una banda correspondiente a la proteína MA (o NC) ello confirma que estamos en presencia de partículas virales maduras.

El material obtenido de la purificación de partículas virales ya sea luego de los lavados con PBS o provenientes del gradiente discontinuo de iodixanol fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión empleando tinción negativa con ácido fosfotúngstico (**figura 4.7A**). De este modo se

obtuvieron microfotografías donde se visualizan estructuras compatibles con partículas virales en tamaño, forma y diámetro de la partícula de aproximadamente 100nm de diámetro (**figura 4.7A**). Se observa sin embargo en algunas imágenes que las partículas no están íntegras siendo éste uno de los problemas encontrados a la hora de la purificación de las partículas virales con el protocolo de concentración y purificación elegido. A su vez la abundancia de partículas virales es escasa. Decidimos incorporar el iodixanol dado que este producto no genera interferencia con la microscopía electrónica. Uno de los principales problemas obtenidos en la muestra proveniente del halo del colchón de iodixanol al 50% (**figura 4.6B**) es la dificultad posterior para eliminar este reactivo con el fin de poder realizar la tinción negativa para la MET. Lo ideal sería correr la muestra en gradiente continuo de iodixanol 10-30% y posteriormente ultracentrifugar la muestra en buffer TNE previo a la MET. Sin embargo debido a que se perdía mucho material se analizó por MET la preparación proveniente del colchón de iodixanol 50%.

Finalmente la muestra correspondiente al pellet de retentato luego de 2 lavados con PBS se corrió en un 1D SDS-PAGE con tinción con AgNO_3 , y se seleccionaron y cortaron bandas (**figura 4.7B**) que se enviaron para análisis por MS y MS/MS. De esta purificación lograron identificarse 3 proteínas, p12 (**figura 4.8**), p24 (**figura 4.9**) y gp51 (**figura 4.10**).

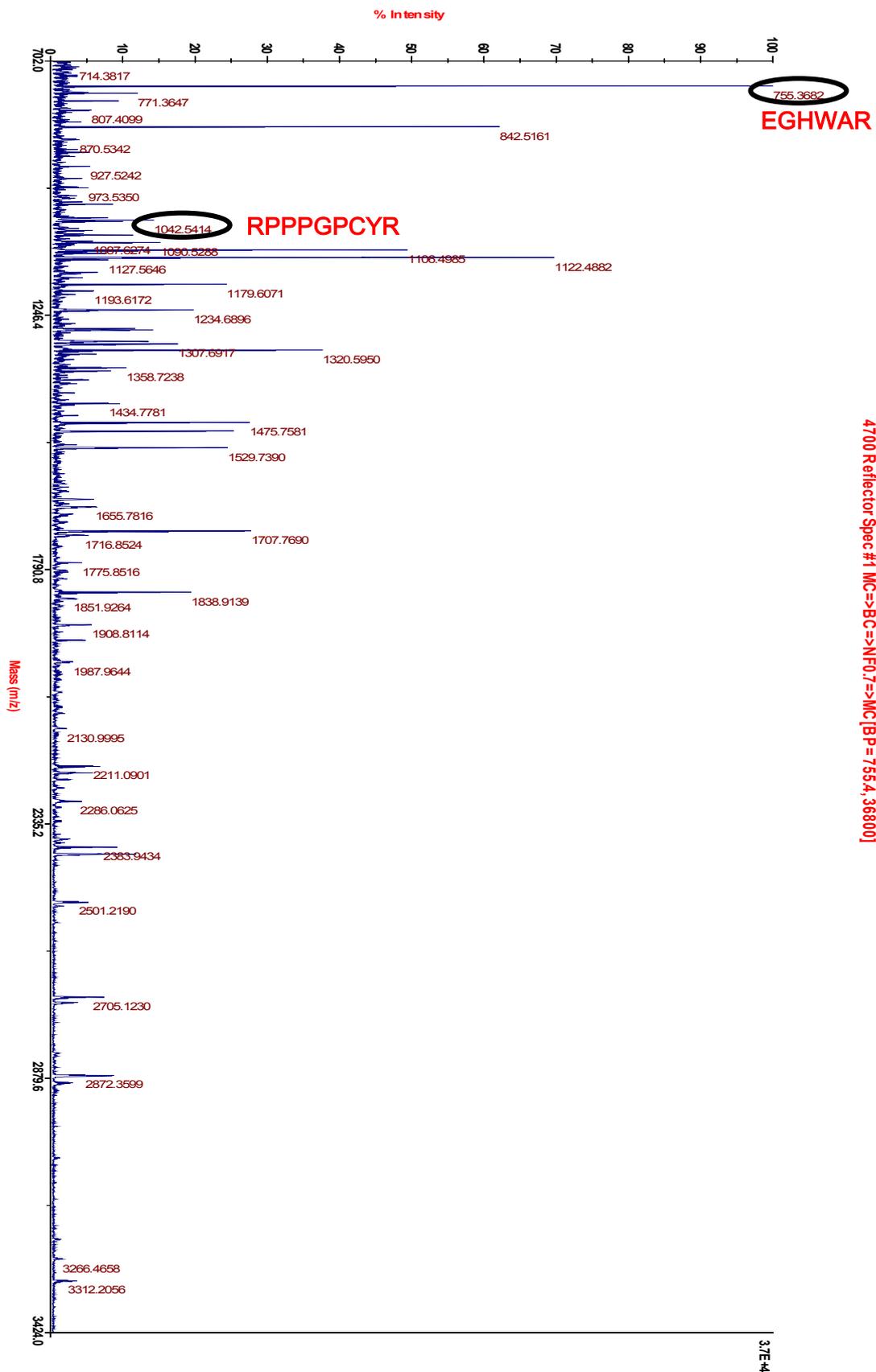


Figura 4.8: Lista de masas de MS (m/z) obtenidas experimentalmente, se señala las m/z y los péptidos correspondientes a NC (p12), proteína identificada en esta muestra (banda1-4.7B). La mayoría de las m/z que identificaron proteínas fueron fragmentadas (MS/MS).

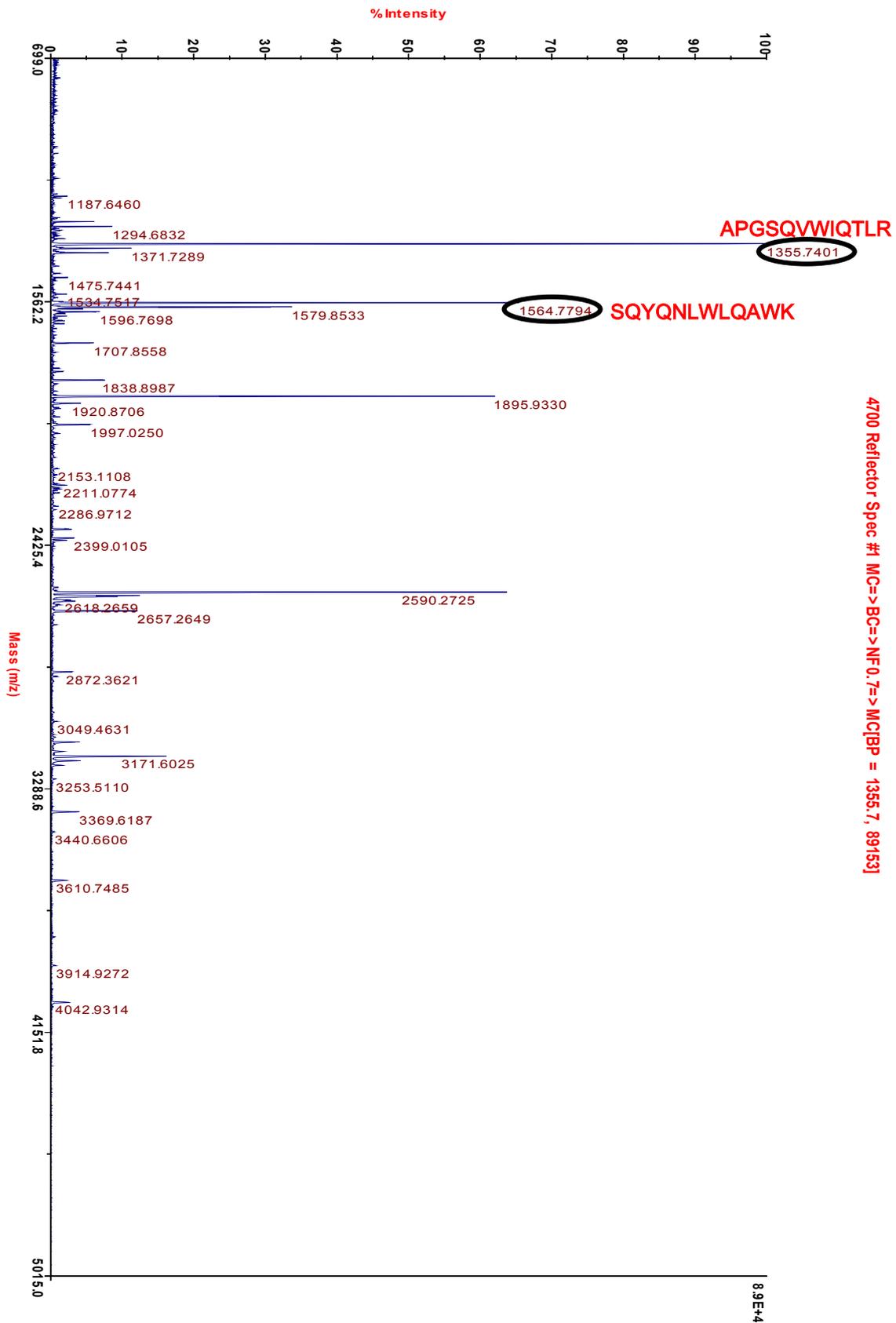


Figura 4.9: Lista de masas de MS (m/z) obtenidas experimentalmente, se señala las m/z y los péptidos correspondientes a CA (p24), proteína identificada en esta muestra (**banda4-4.7B**). La mayoría de las m/z que identificaron proteínas fueron fragmentadas (MS/MS).

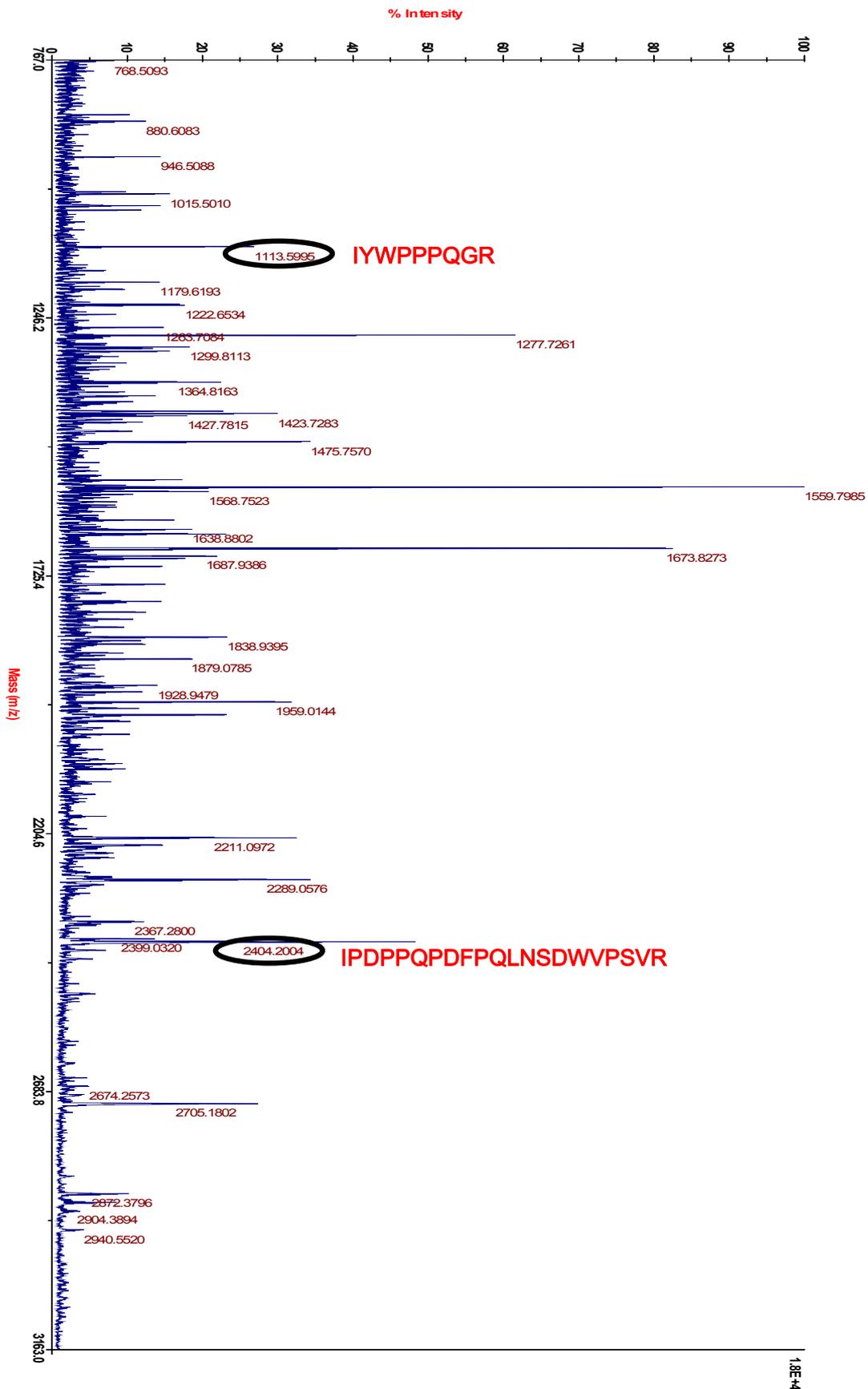


Figura 4.10: Lista de masas de MS (m/z) obtenidas experimentalmente, se señala las m/z y los péptidos correspondientes a SU (gp51), proteína identificada en esta muestra (banda8-4.7B). La mayoría de las m/z que identificaron proteínas fueron fragmentadas (MS/MS).

En todos los casos se identificaron al menos 2 péptidos de cada proteína los cuales se muestran en los espectros. Cabe destacar que en general los péptidos identificados se obtuvieron por fragmentación. La localización exacta de los péptidos en la secuencia primaria de las proteínas identificadas se ilustra en la **figura 4.11**. Se destaca entonces que las 3 proteínas que aparecen mayormente expresadas por SDS-PAGE/WB coinciden con las identificadas por MS lo que implica que se trata de fracciones concentradas de estas proteínas que luego del proceso de concentración y purificación aparecen como proteínas mayoritarias.

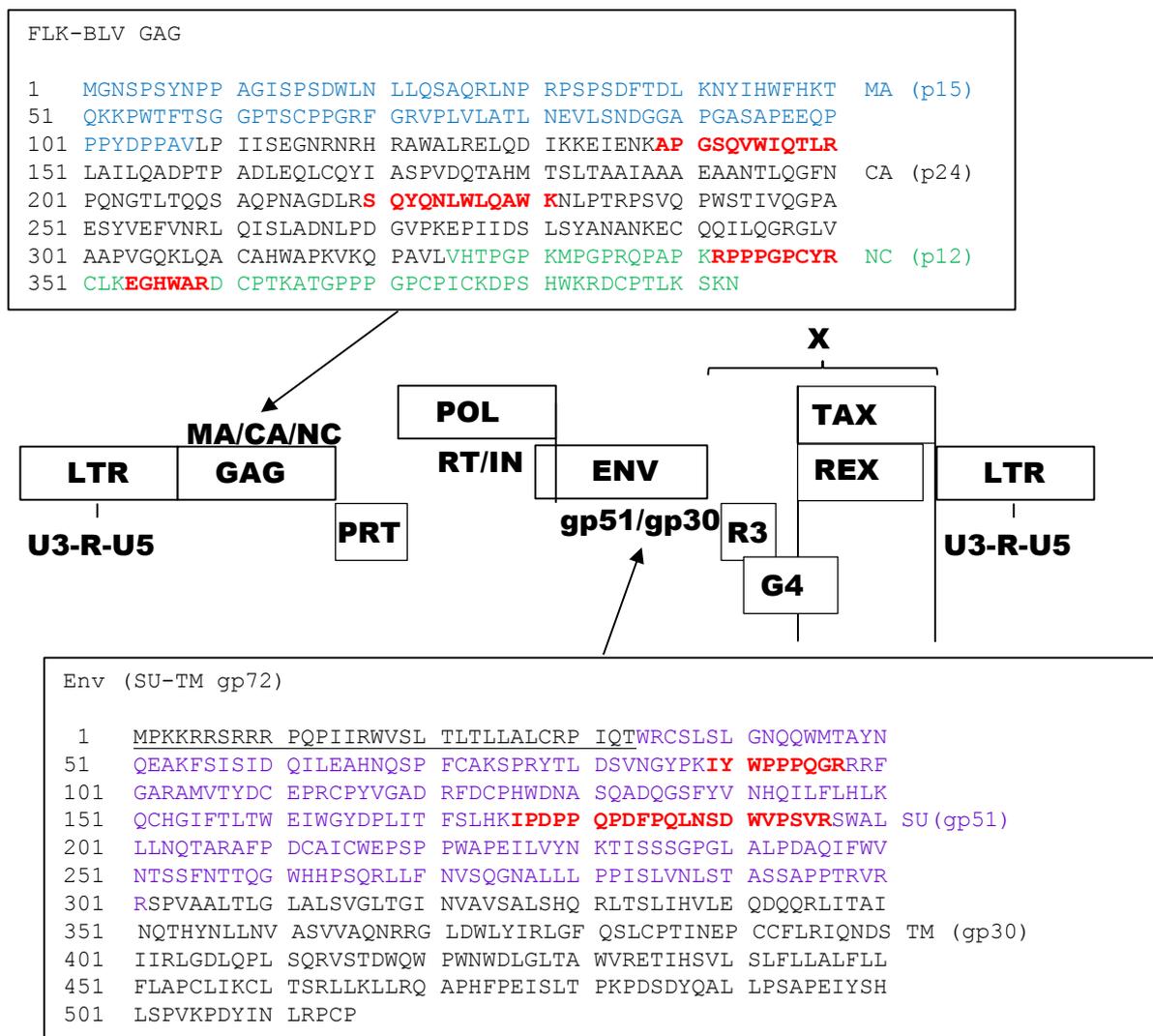


Figura 4.11: Resumen de los péptidos obtenidos en la purificación de partículas virales de BLV a partir del retentado. Arriba: Secuencia del precursor GAG donde se señalan en rojo los péptidos identificados por espectrometría de masa, y se muestra en azul MA, en negro p24 y en verde NC. Abajo: Secuencia del precursor Env donde se señalan en rojo los péptidos identificados por espectrometría de masa en subrayado el péptido señal, en violeta se muestra SU (gp51) y en negro TM (gp30) (adaptada de Gillet 2007⁹⁴)

Posteriormente con el fin de mejorar el protocolo de concentración y purificación se realizó una nueva producción de partículas virales de BLV con las mismas condiciones de cultivo y concentración inicial (ultrafiltración) pero se incorporó un paso más de concentración por ultrafiltración (vivaspin) luego de la ultrafiltración tangencial (pellicon) y en paralelo se realizó una concentración empleando un

gradiente discontinuo de sacarosa 25/60% (**figura 4.12A**) como alternativa al uso del iodixanol empleado inicialmente (**figura 4.6B**). Se observa entonces que la incorporación de un nuevo paso de ultrafiltración no resultó en un aumento de la concentración de partículas virales, por el contrario aparentemente resultó en una disminución de la cantidad de proteínas presentes (**figura 4.12A**). Una posibilidad es que luego de esta nueva etapa de concentración parte del material haya quedado retenido en el filtro no habiendo removido correctamente todo el material concentrado.

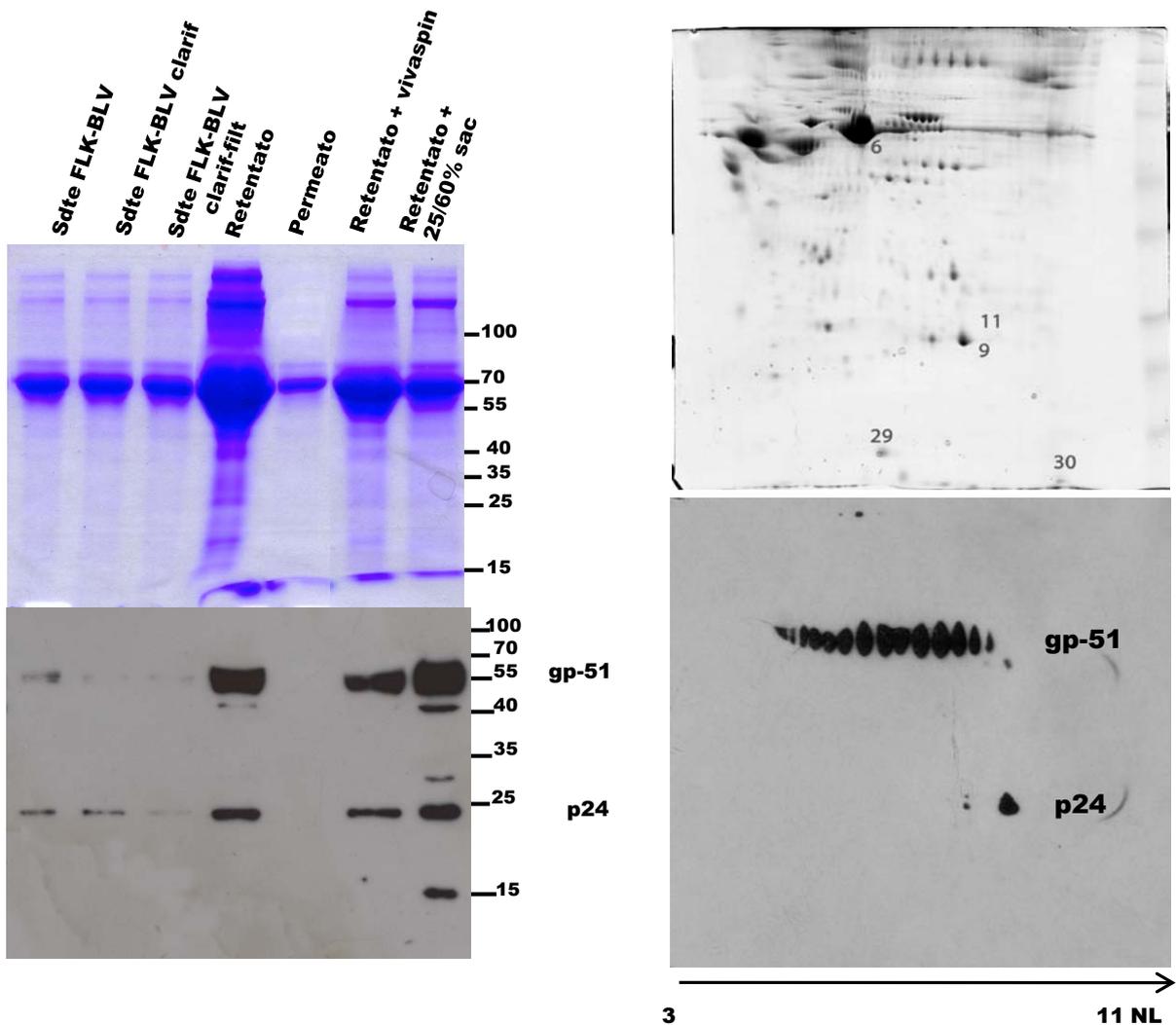


Figura 4.12: **A:** Análisis por SDS-PAGE/WB (AcMos anti-p24 y anti-gp51) del perfil de proteínas de las distintas fracciones obtenidas durante la concentración y purificación de partículas virales de BLV (desde el sobrenadante hasta la ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa). A efectos comparativos se incluye la fracción de retentato luego de su concentración 2x con Vivaspin. **B:** 2D SDS-PAGE/WB (AcMos anti-p24 y anti-gp51) de la fracción de retentato purificada por gradiente discontinuo de sacarosa. Arriba: 2D SDS-PAGE/CCB. Diversos spots fueron analizados pero sólo 5 (señalados con números) fueron exitosamente identificados como proteínas virales. Abajo: 2D SDS-PAGE/WB. El reconocimiento de los AcMos anti-p24 y anti-gp51 sugiere la presencia de posibles modificaciones postraduccionales.

Por su parte el empleo de un gradiente discontinuo de sacarosa en lugar del uso del iodixanol no afectó el rendimiento en la concentración de las partículas virales (**comparar figura 4.6B con 4.12A**) pudiendo sustituirse por este último. El uso de iodixanol vs sacarosa ha sido ampliamente discutido en cuanto a la preservación de las partículas, a la alteración del material proveniente de la sacarosa para el

MET. El iodixanol ofrecería ventajas dado que genera soluciones isosmóticas que ayudan a preservar la integridad de la partícula viral y por consiguiente su funcionalidad.

Las partículas virales colectadas del gradiente continuo de sacarosa (no se muestra) tenían una densidad aproximada de 1,10 g/mL correspondiente a aproximadamente 27% (w/w) sacarosa. En HTLV-1 con gradiente de iodixanol la densidad de las partículas virales también tenía un valor de 1,10g/mL¹⁸². Estos valores de densidad de deltaretrovirus son menores a los reportados para otros retrovirus (1,16g/mL en sacarosa) y coinciden con trabajos donde se establece que HTLV-1 presenta partículas virales (VLPs) con 510 copias de Gag (y aprox 73nm de diámetro) vs las 2400-5000 copias de Gag reportadas para HIV-1¹⁰² de todos modos estos valores son relativos.

La fracción de retentato purificada por gradiente discontinuo de sacarosa fue empleado para realizar en duplicado 2D SDS-PAGE con tinción con CCB y para 2D SDS-PAGE/WB (**figura 4.12B**). Con respecto a la 2D SDS-PAGE/WB se destaca la presencia de un “tren” de spots en el 2D SDS-PAGE/WB a la altura de gp51 (**figura 4.12B**). Esto es compatible con la presencia de modificaciones postraduccionales, en particular éste es un patrón característico de glicosilación diferencial (posiblemente con expresión diferencial de ácido siálico). De hecho a partir de la secuencia genómica de Env se predicen 7 sitios potenciales de N-glicosilación y 2 de O-glicosilación. Con respecto a p24 la presencia de dos posibles isoformas podría ser ocasionada por otra modificación postraducciona como es la fosforilación (**figura 4.12B**). En este sentido este tipo de modificación ha sido reportada a¹⁰² para la proteína de cápside de HIV-1^{175, 255}. En la **figura 4.12B** (arriba) se muestra el análisis de una purificación de partículas virales de BLV mediante 2D SDS-PAGE/tinción con CCB donde se marcan los “spots” analizados por espectrometría de masa que identificaron proteínas virales pertenecientes a BLV (**figuras 4.13-4.17**), gp51 (**figura 4.13**) y p24 (**figuras 4.14 y 4.15**) habían sido previamente identificadas en la primer producción pero en este caso también se lograron identificar péptidos pertenecientes a MA (p15) (**figura 4.16**) y a la proteasa (**figura 4.17**).

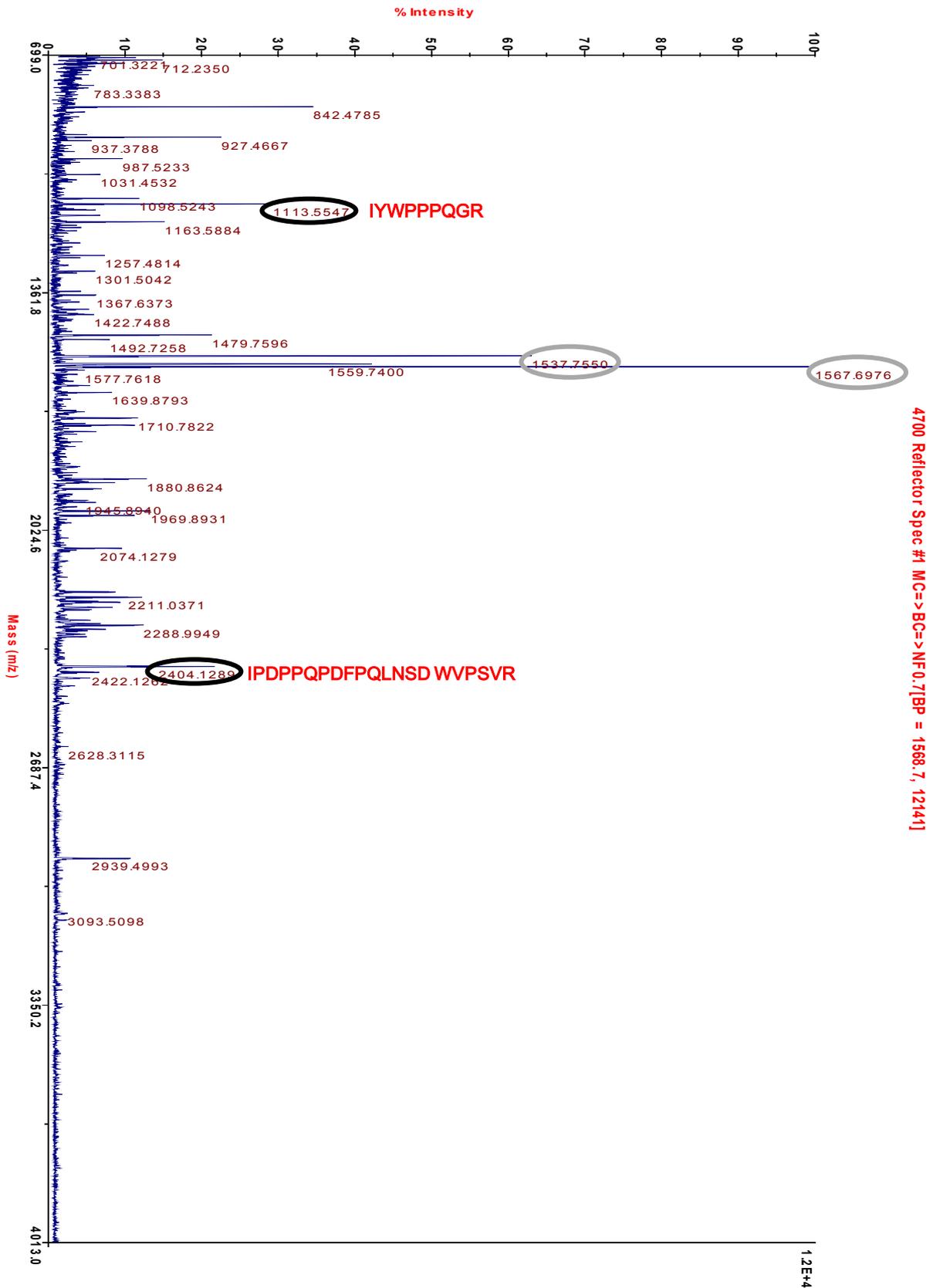


Figura 4.13: Lista de masas de MS (m/z) obtenidas experimentalmente, se señalan las m/z y los péptidos correspondientes a Env (gp72), proteína identificada en esta muestra (en negro-spot 6). La mayoría de las m/z que identificaron proteínas fueron fragmentadas (MS/MS). Asimismo se señalan las m/z que identificaron péptidos pertenecientes a la BSA (en gris).

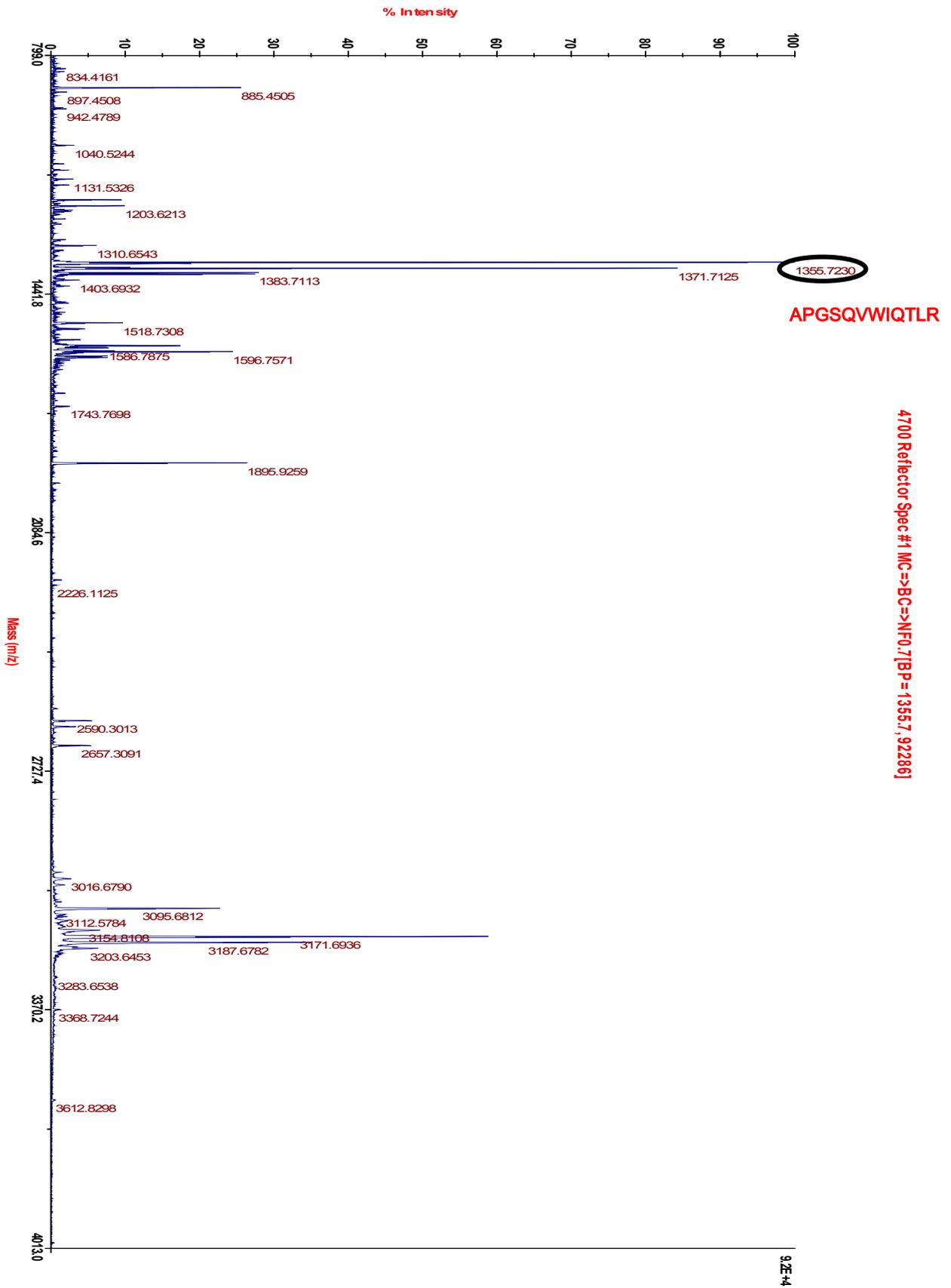


Figura 4.14: Lista de masas de MS (m/z) obtenidas experimentalmente, se señalan las m/z y los péptidos correspondientes a CA (p24), proteína identificada en esta muestra (**spot 9**). La mayoría de las m/z que identificaron proteínas fueron fragmentadas (MS/MS).

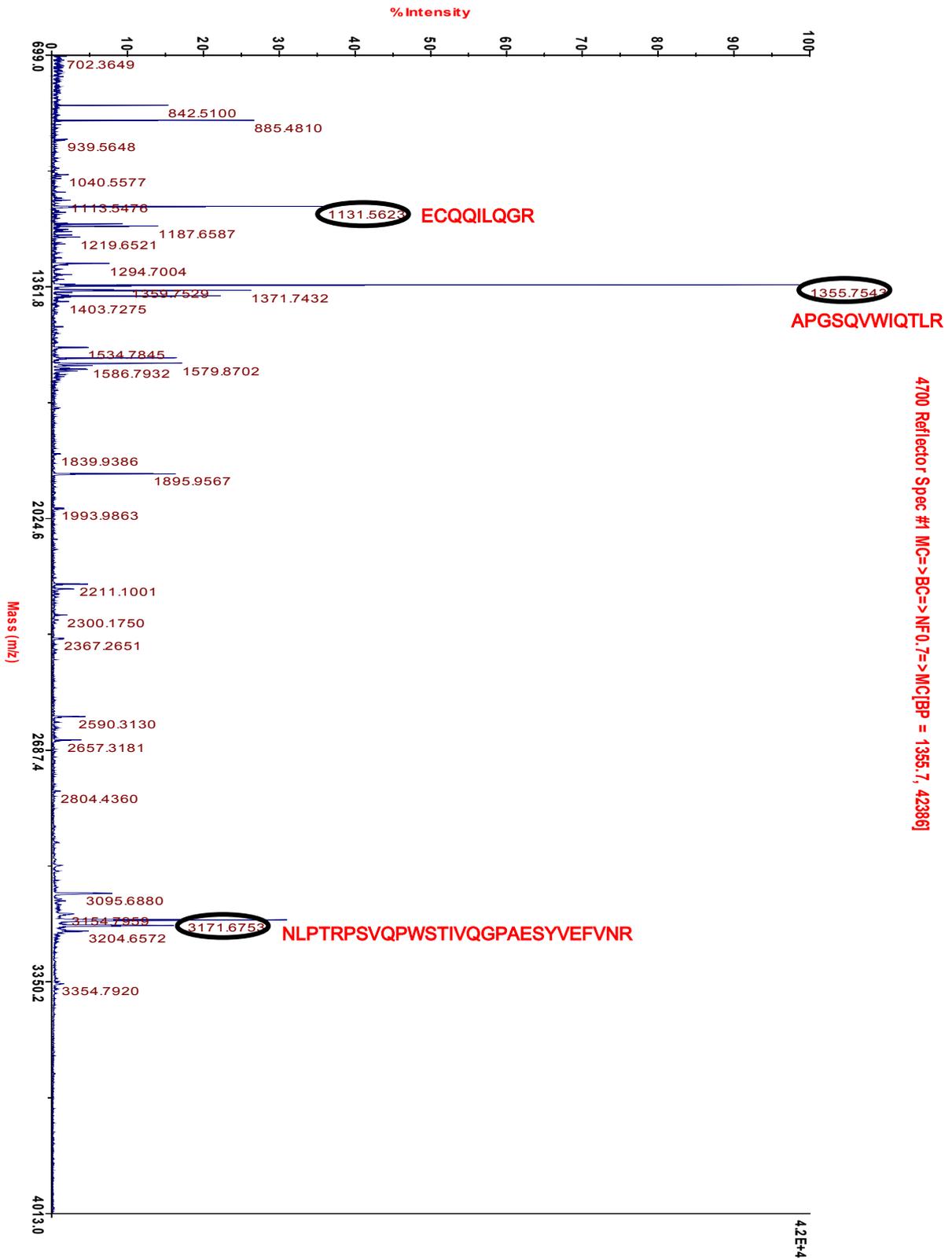


Figura 4.15: Lista de masas de MS (m/z) obtenidas experimentalmente, se señalan las m/z y los péptidos correspondientes a CA(p24), proteína identificada en esta muestra (**spot 11**). La mayoría de las m/z que identificaron proteínas fueron fragmentadas (MS/MS).

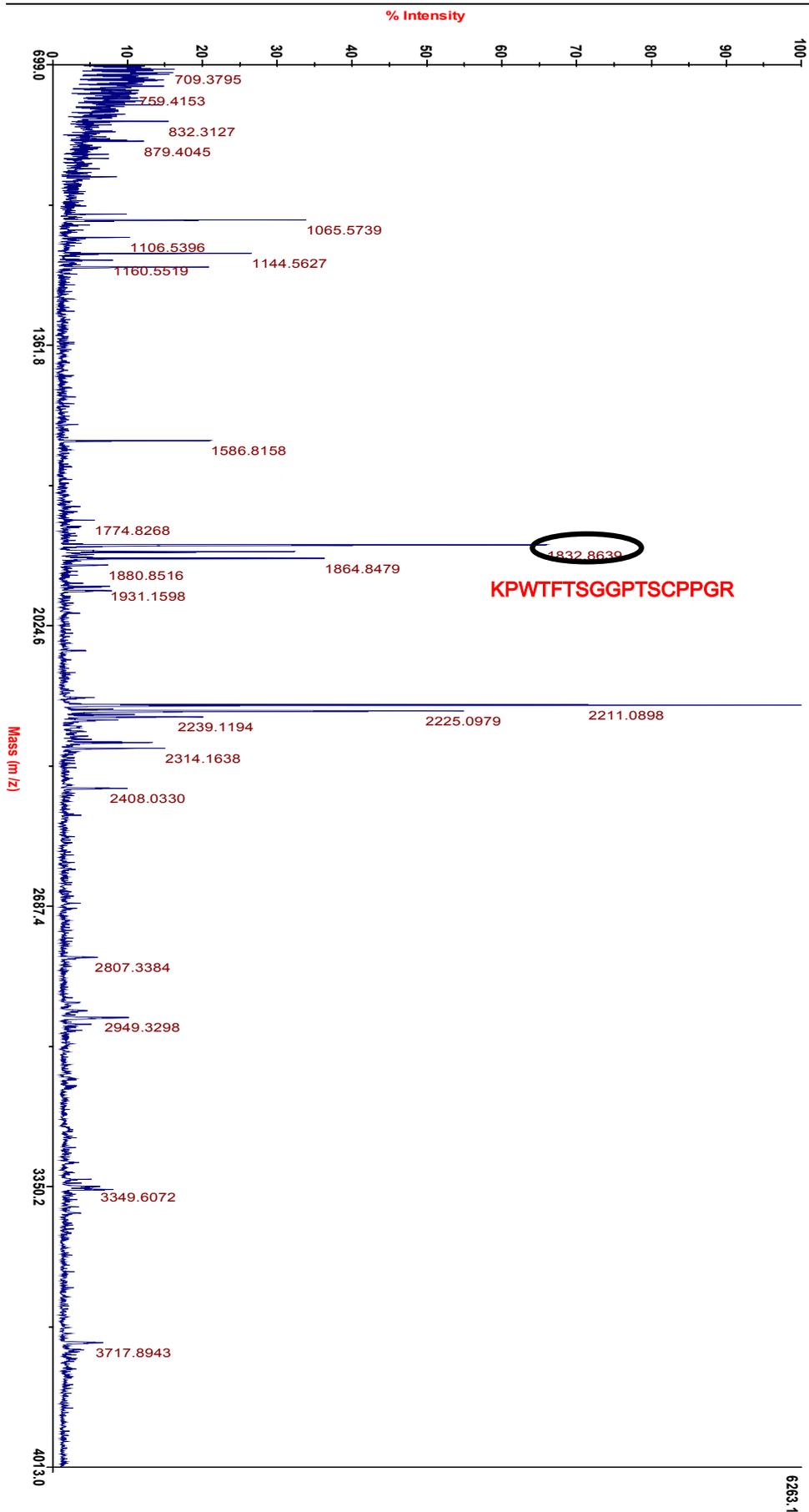


Figura 4.16: Lista de masas de MS (m/z) obtenidas experimentalmente, se señalan las m/z y los péptidos correspondientes a MA (p15) proteína identificada en esta muestra (**spot 29**). La mayoría de las m/z que identificaron proteínas fueron fragmentadas (MS/MS).

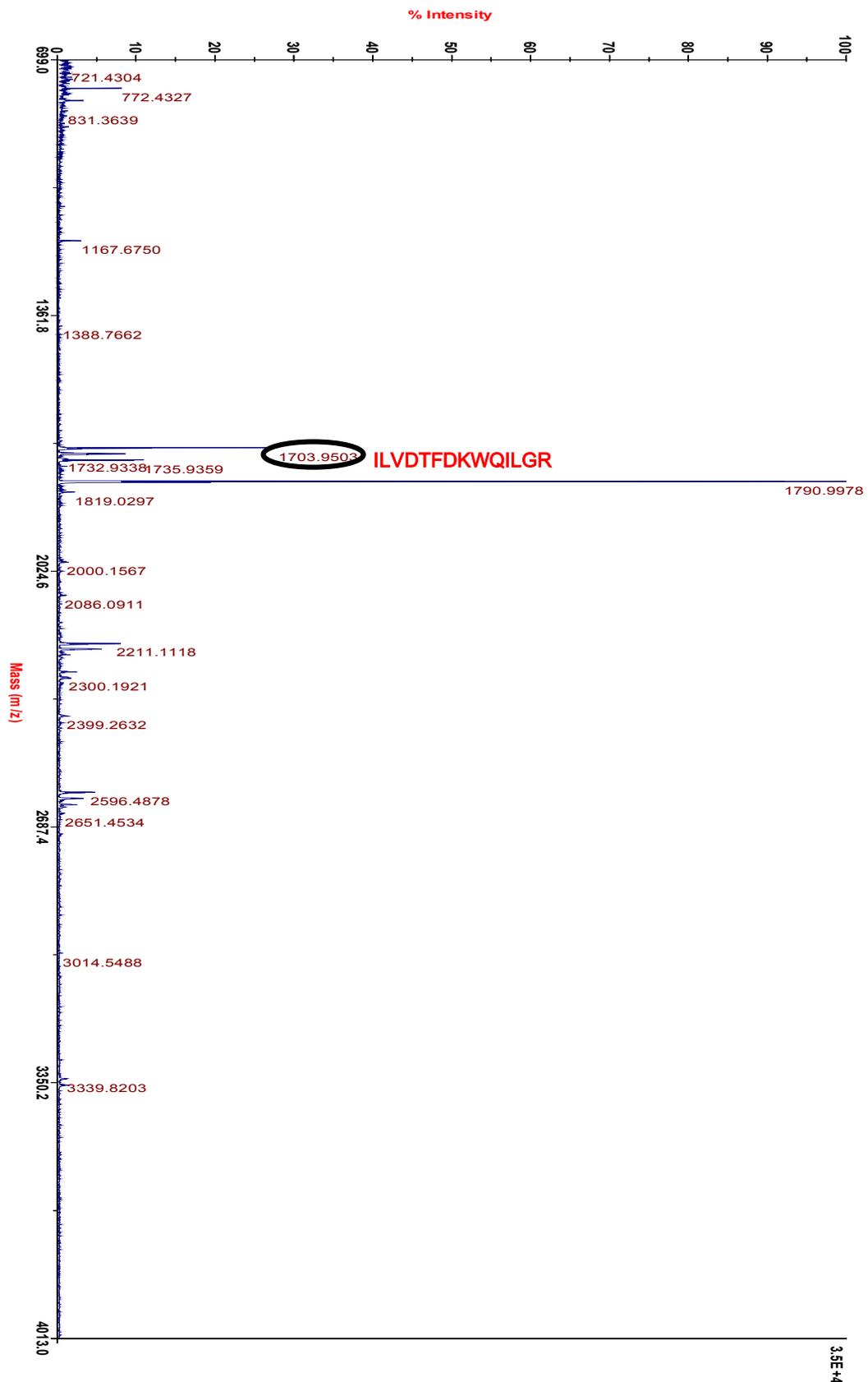


Figura 4.17: Lista de masas de MS (m/z) obtenidas experimentalmente, se señalan las m/z y los péptidos correspondientes a PRT (p14), proteína identificada en esta muestra (**spot 30**). La mayoría de las m/z que identificaron proteínas fueron fragmentadas (MS/MS).

Una vez obtenido el halo correspondiente al colchón de sacarosa 25/60%, esta muestra se pelleteó en un colchón de sacarosa al 20% (este paso fue incorporado en las últimas purificaciones realizadas y si bien mejora la calidad del material obtenido, el rendimiento es bajo) para finalmente diluirse en buffer TNE y ultracentrifugarse en buffer TNE como paso de purificación final. Este material se empleó para 1D SDS-PAGE con tinción argéntica (**figura 4.18A**). El último paso de la purificación si bien mejora la purificación no permite obtener proteína en cantidad suficiente para la electroforesis bidimensional. Sin embargo estas partículas altamente purificadas fueron analizadas mediante MET (**figura 4.18B**).

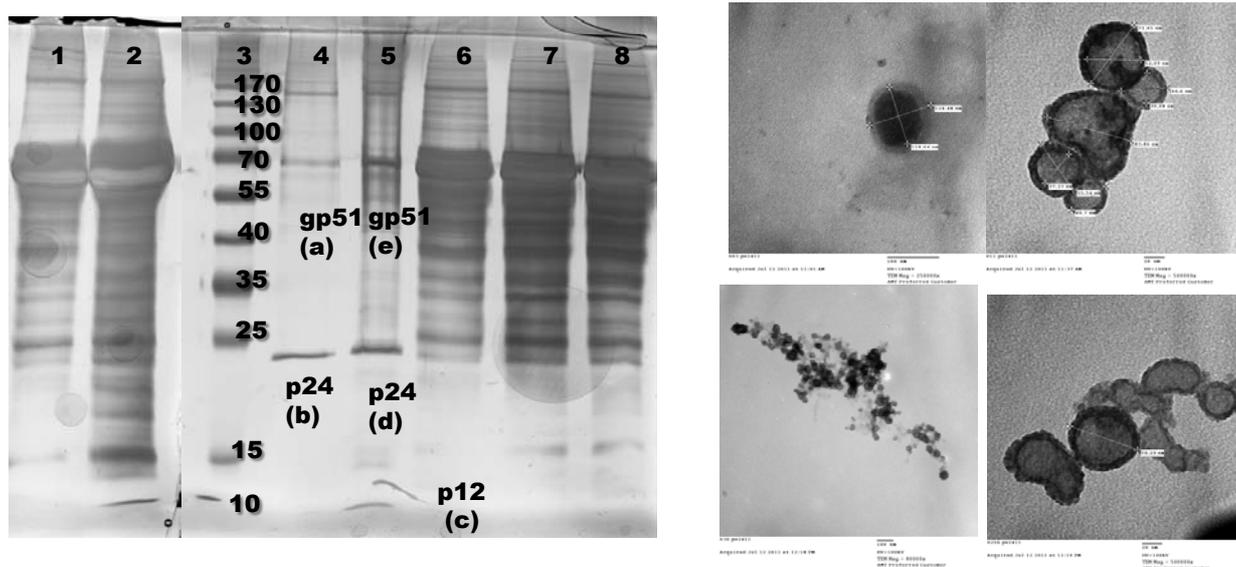


Figura 4.18: A: 1D SDS-PAGE/AgNO₃ de las fracciones concentradas y purificadas de partículas virales en el cual se incluye un paso más de purificación luego del gradiente discontinuo de sacarosa 25/60%: la ultracentrifugación en colchón de sacarosa al 20% (pocillo 4). 1) Alícuota de retentato concentrado 10x mediante Vivaspin 1000MWCO; 2) Alícuota de retentato luego de ultrafiltración de los sobrenadantes clarificados y filtrados en dispositivo Pellicon XL; 3) Marcador de peso molecular PageRuler Pre-Stained ; 4) Pellet obtenido a partir de retentato concentrado mediante ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa (25/60%) + ultracentrifugación en colchón de sacarosa (20%); 5) Alícuota de retentato concentrado mediante ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa (25/60%); 6) Pool de sobrenadantes de FLK-BLV clarificado luego de la microfiltración (0,22µm); 7) Pool de sobrenadantes de FLK-BLV luego de la clarificación; 8) Pool de sobrenadantes de FLK-BLV previo a la concentración/purificación. **B:** Micrografías electrónicas de transmisión. Esta muestra proviene de partículas virales obtenidas en la ultracentrifugación final en TNE, luego del colchón de sacarosa al 20%. Si bien mejora mucho la calidad de las partículas obtenidas el material es escaso para la identificación de proteínas. Tinción con acetato de uranilo.

La abundancia de estructuras compatibles con partículas virales es mayor luego de esta purificación y nuevamente en este caso el diámetro y forma de las “partículas virales” coinciden con lo reportado en la literatura. La tinción con acetato de uranilo por su parte permite una mejor resolución de la superficie de estas partículas. Uno de los problemas de purificar con sacarosa es que daña las glicoproteínas de superficie, este no parece ser el caso aunque deberían hacerse ensayos de inmunomarcado con oro coloidal (para la MET) e infectividad para confirmar que efectivamente estamos en presencia de partículas virales y que además las glicoproteínas de superficie se encuentran intactas. Cabe destacar sin embargo que en las condiciones de purificación que se realizaron en este

trabajo empleando ultracentrifugación en equilibrio en gradiente de densidad (centrifugación isopícnica), podrían estarse purificando junto con las partículas virales, vesículas cubiertas de membrana (ej. exosomas, microvesículas) cuya densidad es similar a la de los viriones de modo que podrían estar co-purificando con ellos.

Por su parte a partir del gel 1D SDS-PAGE/AgNO₃ varias bandas (**figura 4.18A a-e**) fueron procesadas para su identificación por MS pero sólo en cinco de ellas lograron identificarse proteínas

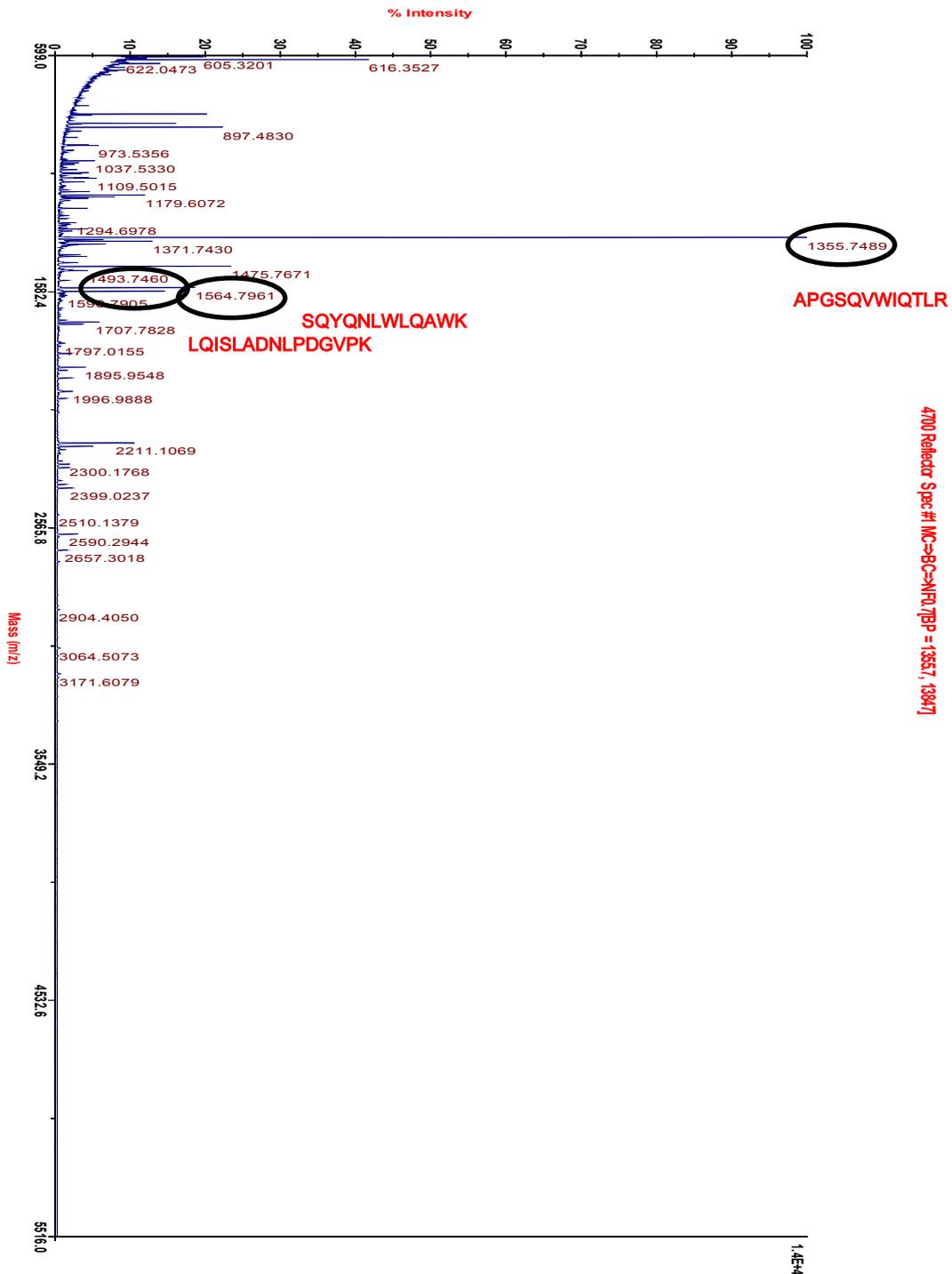


Figura 4.19: Lista de masas de MS (m/z) obtenidas experimentalmente, se señalan las m/z y los péptidos correspondientes a CA (p24), proteína identificada en esta muestra (**banda b-4.18A**). La mayoría de las m/z que identificaron proteínas fueron fragmentadas (MS/MS).

pertenecientes a BLV (figura 4.19 y 4.20).

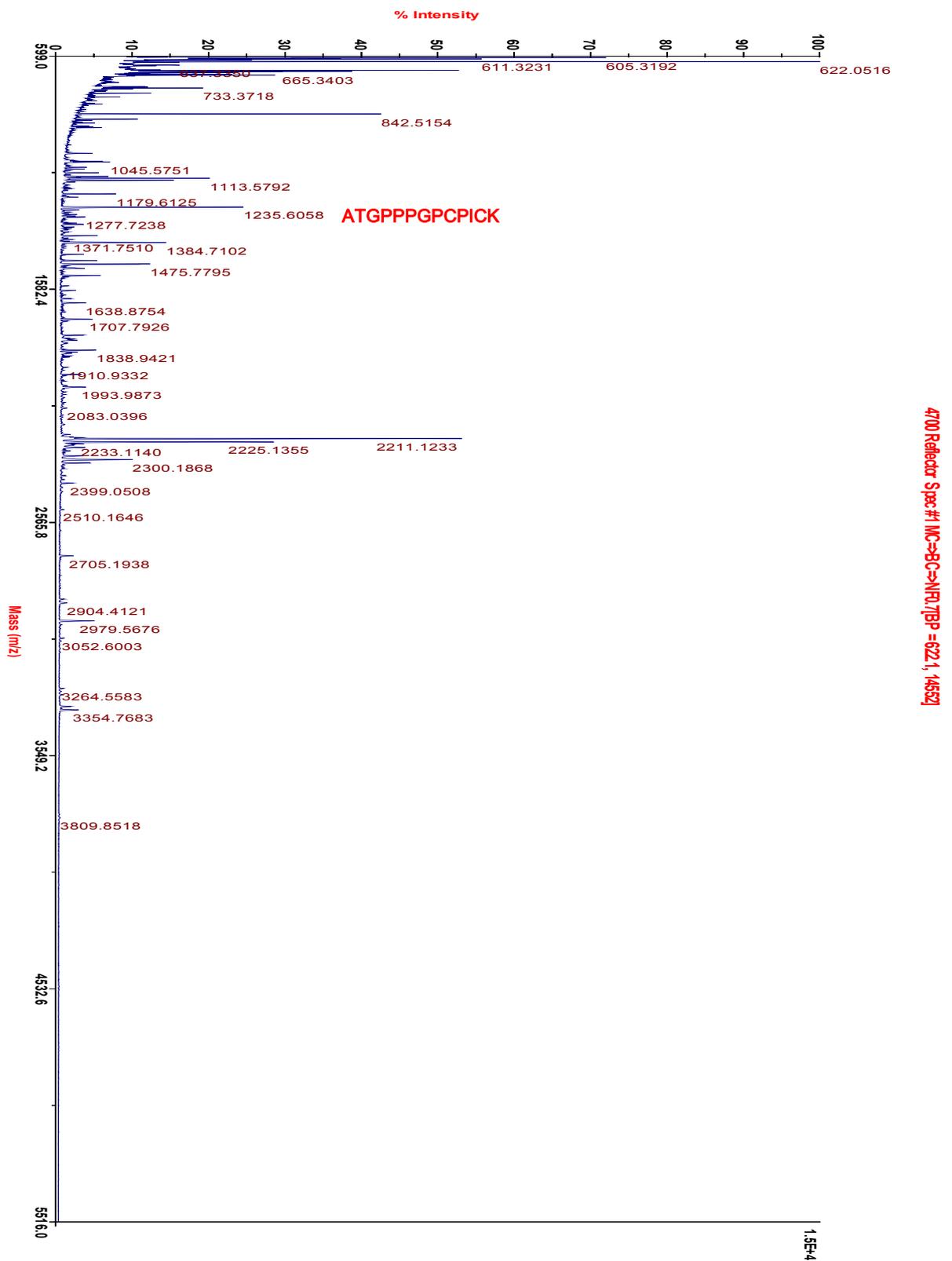


Figura 4.20: Lista de masas de MS (m/z) obtenidas experimentalmente, se señalan las m/z y los péptidos correspondientes a NC (p12), proteína identificada en esta muestra (**banda c-4.18A**). La mayoría de las m/z que identificaron proteínas fueron fragmentadas (MS/MS).

Las **figuras 4.19 y 4.20** muestran los espectros pertenecientes a las bandas b y c que permiten la identificación de péptidos correspondientes a p24 y p12 que aún no habían sido identificados mientras que el resto de los espectros no se incluye debido a que los mismos péptidos pertenecientes a gp51 y p24 vuelven a aparecer en la identificación.

El protocolo de obtención de partículas virales purificadas de BLV empleado en este trabajo permitió la identificación de la mayoría de las proteínas virales estructurales deducidas del genoma viral (**figura 4.21**), en particular aquellas derivadas de los precursores Gag y Env como p24 y gp51, respectivamente. Dado que p24 deriva del precursor Gag junto con p15 y p12 era esperable que estas dos proteínas también fueran identificadas. De hecho se comprobó que estas proteínas aparecen en las fracciones más purificadas de las partículas virales lo cual puede visualizarse inicialmente por SDS-PAGE/WB (**figuras 4.6A, 4.6B y 4.12A**) dado que el AcMo BLV3 dirigido contra un epítipo lineal de p24

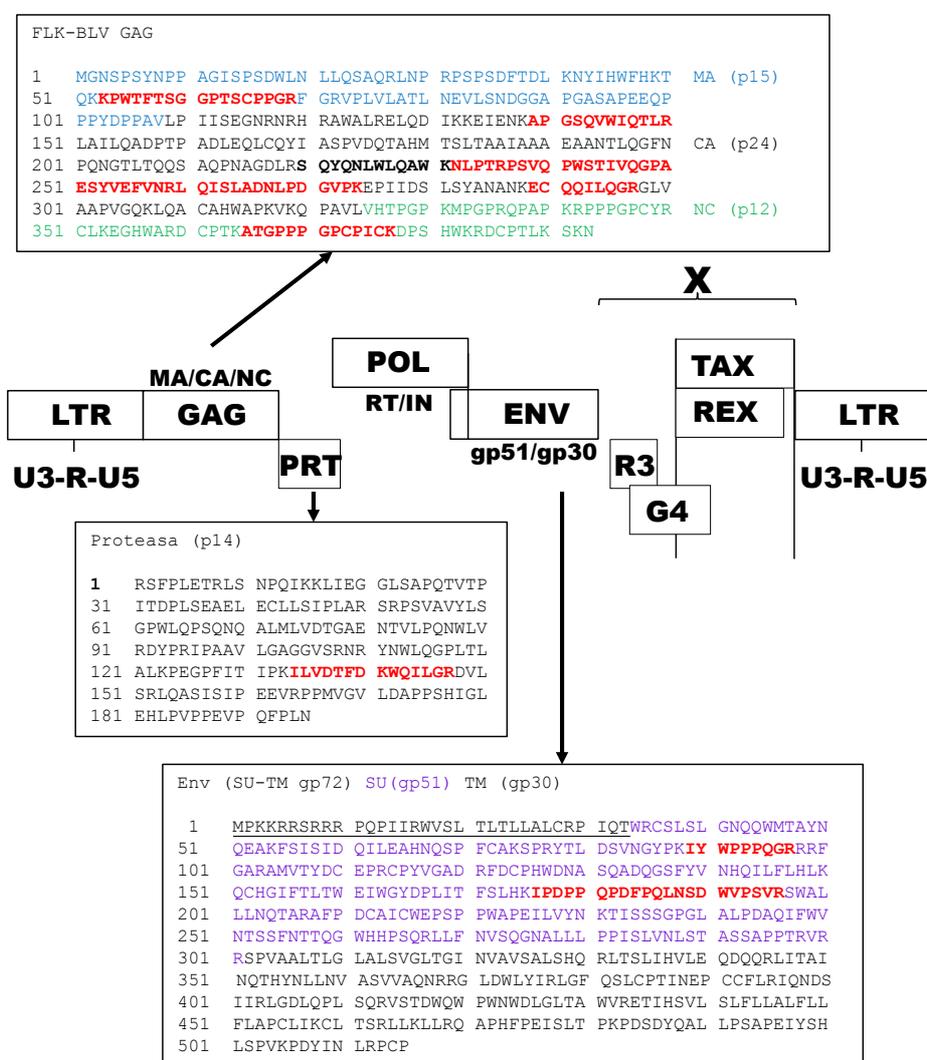


Figura 4.21: Resumen de los péptidos identificados por MS y MS/MS en la purificación de partículas virales de BLV obtenidas a partir de la concentración y purificación de partículas virales obtenida en la figura 4.18. Arriba: Secuencia del precursor GAG donde se señalan en rojo los péptidos identificados por espectrometría de masa, y se muestra en azul MA, en negro p24 y en verde NC. Medio: Secuencia aminoacídica de la proteasa donde se señalan en rojo los péptidos identificados por espectrometría de masa. Abajo: Secuencia del precursor Env donde se señalan en rojo los péptidos identificados por espectrometría de masa en subrayado el péptido señal, en violeta se muestra SU (gp51) y en negro TM (gp30).

podría también reconocer MA (como se mencionó anteriormente) y luego fue confirmado por MS.

En la **figura 4.21** se resumen los péptidos identificados en cada una de las secuencias primarias de las proteínas virales identificadas.

Con respecto a las proteínas con actividad enzimática como las derivadas de polimerasa (Pol) y proteasa (Prt) se logró identificar a esta última. Dado que la relación estequiométrica de las proteínas enzimáticas (Pol-RT/IN- y Prt) vs las proteínas estructurales es de escasas moléculas de proteína Prt o Pol en relación a las proteínas estructurales, el hecho de que se haya logrado identificar la proteasa (a partir de un 2D SDS-PAGE teñido con CCB para la cual se requiere mayor cantidad de proteína) es buen indicio del grado de purificación alcanzado para esta preparación y da valor a la MET realizada (**figura 4.18B**). En este sentido una interpretación posible podría ser que las partículas virales que se generan, si bien son escasas, corresponderían a partículas virales maduras dado que tanto p24 como MA y NC se identificaron por WB y MS y finalmente también se identificó la proteasa que participa de la maduración de las partículas virales por procesamiento del precursor Gag una vez que los viriones son liberados por brotamiento. La relación reportada Gag/Gag-pol (para vectores de MLV²⁵⁷ o para HIV¹⁴⁹) es de 20:1 por tanto serían 2400 moléculas de Gag por partícula viral y 120 moléculas de Gag-Pro-Pol. Cabe destacar sin embargo que en HTLV-1 el promedio de moléculas de Gag en VLPs generadas a partir de este retrovirus es de 510 copias por partícula, número bastante menor al de HIV-1, con un diámetro de 73nm¹⁰² aunque la relación estequiométrica permanecería constante. De todos modos hay que tener en cuenta que se trata de valores relativos dada la dificultad de realizar este tipo de medida.

Finalmente ninguna de las proteínas reguladoras han sido identificadas (Tax, Rex, R3 y G4) aunque no podemos descartar que estén presentes o no. Como se mencionó anteriormente en HIV-1 se identificaron proteínas auxiliares (reguladoras) como Vpr, Vif, Nef⁵¹. La idea de que proteínas reguladoras se incorporaran a las partículas virales de BLV, en particular Tax podría dar indicio de la participación de esta proteína en etapas tempranas de la infección viral en su actividad de transactivación.

Alternativamente se buscó mejorar la purificación del material obtenido a partir del colchón de sacarosa mediante ultracentrifugación en gradiente continuo de sacarosa (15-60%) pero si bien se mejoró la purificación, el rendimiento resultó bastante más bajo y la cantidad de proteína no fue suficiente para analizarla por 2D SDS-PAGE o realizar la identificación por MS.

Uno de los spots mayoritarios presentes en la 2D SDS-PAGE (a la altura del spot 6 **figura 4.12B**) corresponde a uno de los principales contaminantes presente en las preparaciones de partículas virales purificadas de BLV, la seroalbúmina bovina (BSA). Esta proteína presente en el suero fetal bovino de 66,4 KDa es concentrada junto con las partículas virales, en particular en la etapa de ultrafiltración tangencial. A su vez su PM coincide con el de la proteína Env (de 72kDa) y gp51 (51-55kDa) alterando la migración de la misma y la identificación de posibles modificaciones postraduccionales como veremos

más adelante. Por este motivo decidimos adaptar el cultivo de FLK-BLV para su crecimiento en ausencia de SFB.

En la **figura 4.22** se observa entonces el efecto de la depleción de suero fetal bovino del medio de cultivo de las células FLK-BLV. Luego de la etapa de ultrafiltración tangencial (retentato) se puede observar una mayor cantidad de proteína p24 presente en las fracciones más concentradas. Esto podría indicar que durante el proceso de concentración (ultrafiltración tangencial) las fracciones podrían estar

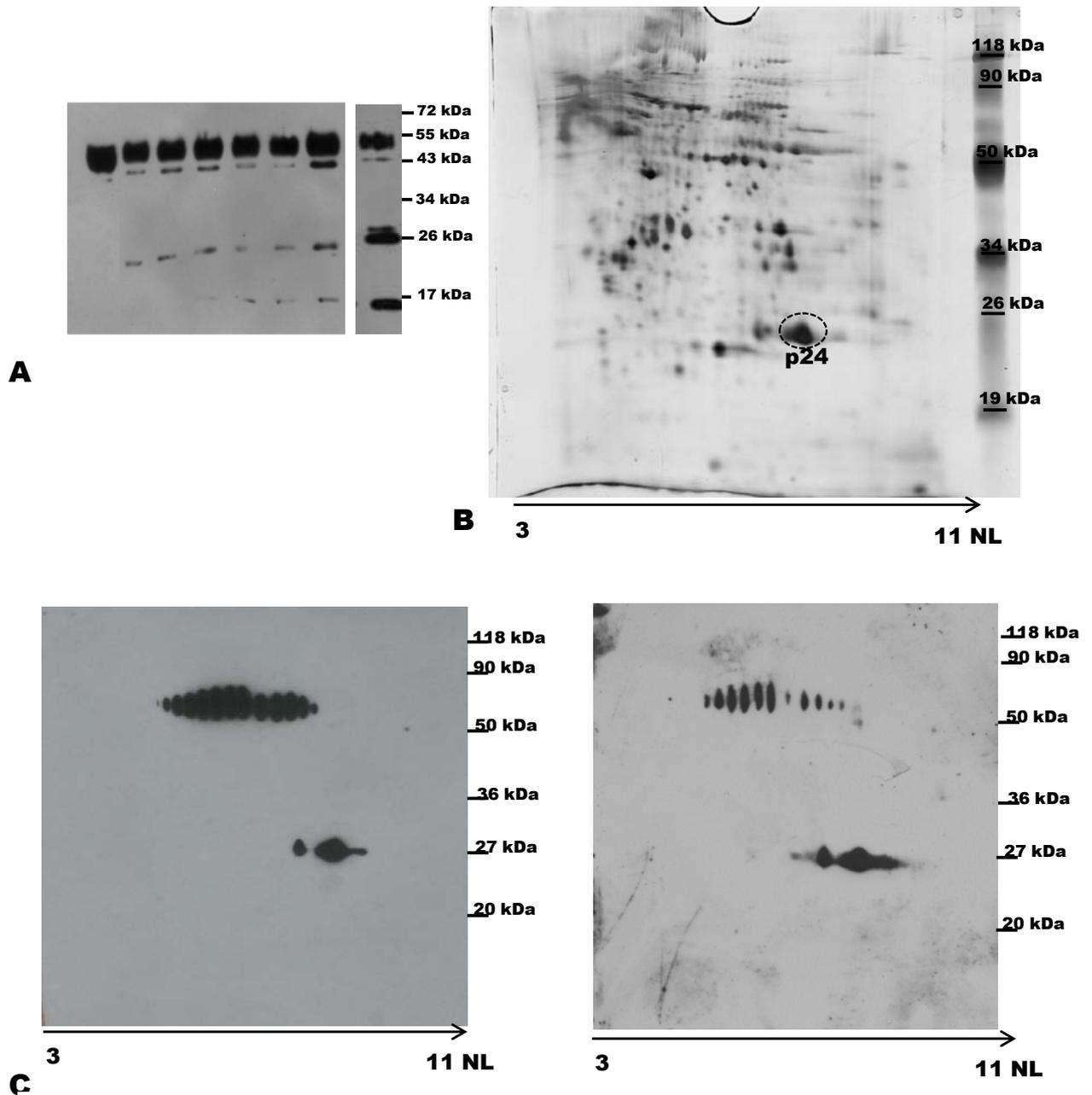


Figura 4.22: Obtención y purificación de partículas virales de BLV en cultivo de FLK-BLV en ausencia de SFB para eliminar la BSA. **A:** Análisis por SDS-PAGE/WB (AcMos anti-p24 y anti-gp51) de las etapas finales de la concentración y purificación de partículas virales de BLV en ausencia de SFB. El retentato se purificó por ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa (25/60%). **B:** Análisis por 2D SDS-PAGE/AgNO₃ de las partículas purificadas de BLV correspondientes a la fracción proveniente del halo de la ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa luego de ser pelleteadas finalmente en buffer TNE. **C:** Análisis por 2D SDS-PAGE/WB empleando AcMos (anti-p24 y anti-gp51, izq.) y suero policlonal anti-BLV comercial (der.)

contaminadas con vesículas o microvesículas que contienen gp51 pero que no son partículas virales (**figura 4.22A**). Una vez purificada la muestra en colchón de sacarosa (25/60%), p24 logra visualizarse junto con p15 o proteína de matriz lo que significa que la relación microvesículas/partículas virales es menor. Es importante resaltar que este resultado es independiente de la presencia o ausencia de SFB dado que en todas las preparaciones (concentración y purificación) se repite este comportamiento. Este producto purificado es el que se cargó en los geles bidimensionales (**figura 4.22B-C**).

Si se compara el WB de la **figura 4.12B** con el que se muestra en la **figura 4.22B-C** se observa una clara diferencia en lo que respecta al tren de spots correspondientes a gp51. Dado que el peso molecular de la gp51 es de aproximadamente 51-55 KDa y el de la BSA es de 66,4 KDa, ambas proteínas se encuentran cercanas entre sí. Esto hace que en la **figura 4.12B** el tren de spots correspondientes a gp51 presente una curvatura hacia pHs más ácidos mientras que en la **figura 4.22B** esto no ocurre. Esta distorsión es ocasionada por la presencia de BSA. Sin embargo en las condiciones de crecimiento sin suero, si bien la reactividad es marcada, al analizar los spots por espectrometría de masa la identificación fue muy pobre. De hecho si bien en la 2D SDS-PAGE se observaron muchos spots y era clara la ausencia de spots correspondientes a BSA, la tinción se realizó con plata sobreestimándose la concentración de proteína presente. Los únicos péptidos identificados correspondieron a la proteína p24. Esto implica que la cantidad de partículas virales obtenida fue baja y por consiguiente también la cantidad de proteínas. Este resultado nos llevó a establecer que a nivel experimental es conveniente utilizar para la identificación de proteínas por MS, spots derivados de geles 2D teñidos con azul de coomassie coloidal. Finalmente en base a los resultados obtenidos resulta clara la necesidad de suplementar el medio de cultivo con SFB o análogo de SFB en lugar de trabajar con el medio depletado de SFB ya que incide enormemente en el rendimiento de la cantidad de partículas virales obtenidas (ver perspectivas).

Finalmente con respecto a las proteínas derivadas de la célula hospedera no es posible establecer qué proteínas del hospedero componen las partículas virales de BLV dado que solo logramos la purificación a partir de la línea celular FLK-BLV. Las células FLK-BLV pertenecen a fibroblastos ovinos y no son por tanto las células blanco donde evaluar la presencia de las proteínas del hospedero.

4.4.2. Estudio de modificaciones postraduccionales en p24 y gp51:

Con respecto a las posibles modificaciones postraduccionales (PTMs) el análisis por espectrometría de masa no logró identificar ninguna. Esto obedece a la escasa cantidad de proteína disponible para analizar este tipo de modificación (en el caso de p24), a la presencia de proteínas contaminantes como la BSA (en el caso de gp51) y a su vez en el caso de gp51 que la detección de glúcidos por MALDI-TOF-TOF es bastante dificultosa dado que los péptidos glicosilados vuelan defectuosamente debido al tamaño ya que en este caso provienen de células de mamífero.

4.4.2.1. Fosforilación en la proteína de cápside

Una de las posibles modificaciones postraduccionales presentes en p24 de BLV (y en el precursor Gag) es la fosforilación al igual que ocurre en varios retrovirus^{64, 223}. Con respecto a la proteína CA se demostró que únicamente las serinas estarían fosforiladas a diferencia de lo que ocurre con la proteína MA donde tanto serinas como treoninas son fosforilables¹⁰⁸. Se ha reportado la incorporación específica de protein quinasas celulares a las partículas virales con este fin⁹⁸. Para el caso concreto de BLV la información es más escasa y si bien se predicen sitios de fosforilación en p24 aún no han sido confirmados y su función desconocida aunque por homología podría estar vinculada al proceso de ensamblaje y egreso si bien la fosforilación juega un papel central principalmente en la proteína MA⁹⁴. Por este motivo empleamos el programa de predicción de residuos de Ser, Thr y Tyr fosforilables (anexo tesis). Este programa de predicción reveló la presencia de 3 residuos de Ser y Thr y 2 de Tyr potencialmente fosforilables. De todas las PTMs posibles se eligió comenzar con la fosforilación por homología con otras proteínas de cápside de retrovirus. La fosforilación es una PTM que modifica el PM de una proteína, su pI o ambos parámetros al igual que la glicosilación y la deamidación.

En el caso de p24 derivada de partículas virales purificadas de BLV se realizó una primera aproximación al estudio de la fosforilación en p24 con fin exploratorio. En este sentido se realizó un tratamiento con fosfatasa alcalina (Roche) con el fin de observar algún cambio en el perfil de reactividad en el 2D SDS-PAGE/WB (**figura 4.23**) luego del agregado de fosfatasa que fuera compatible con la presencia de fosforilación en esta proteína. Para ello empleamos una preparación purificada de partículas virales de BLV que separamos en dos (100µg de proteínas totales cada una) y una de ellas fue tratada con fosfatasa. En paralelo se realizaron 2D SDS-PAGE/tinción con CCB (también con y sin fosfatasa) (**figura 4.23A**) para seleccionar spots de interés elegidos por superposición con los 2D SDS-PAGE/WB (con y sin fosfatasa) utilizando anticuerpos monoclonales contra gp51 y p24 así como un suero policlonal comercial contra BLV (**figura 4.23B-C**). Luego de la defosforilación se observa un cambio hacia pIs más básicos (basic shift) de la proteína p24 nativa presente en el virión. Esto se observa más claramente si comparamos lo que ocurre con los spots correspondientes a p24 en el WB empleando AcMos (**figura 4.23B**). Sin embargo luego del análisis de los spots por espectrometría de masa no fue posible detectar esta modificación. Consideramos que probablemente la cantidad de proteína debería ser más elevada para poder identificar esta modificación que aumenta en 80Da la masa por cada residuo fosforilado.

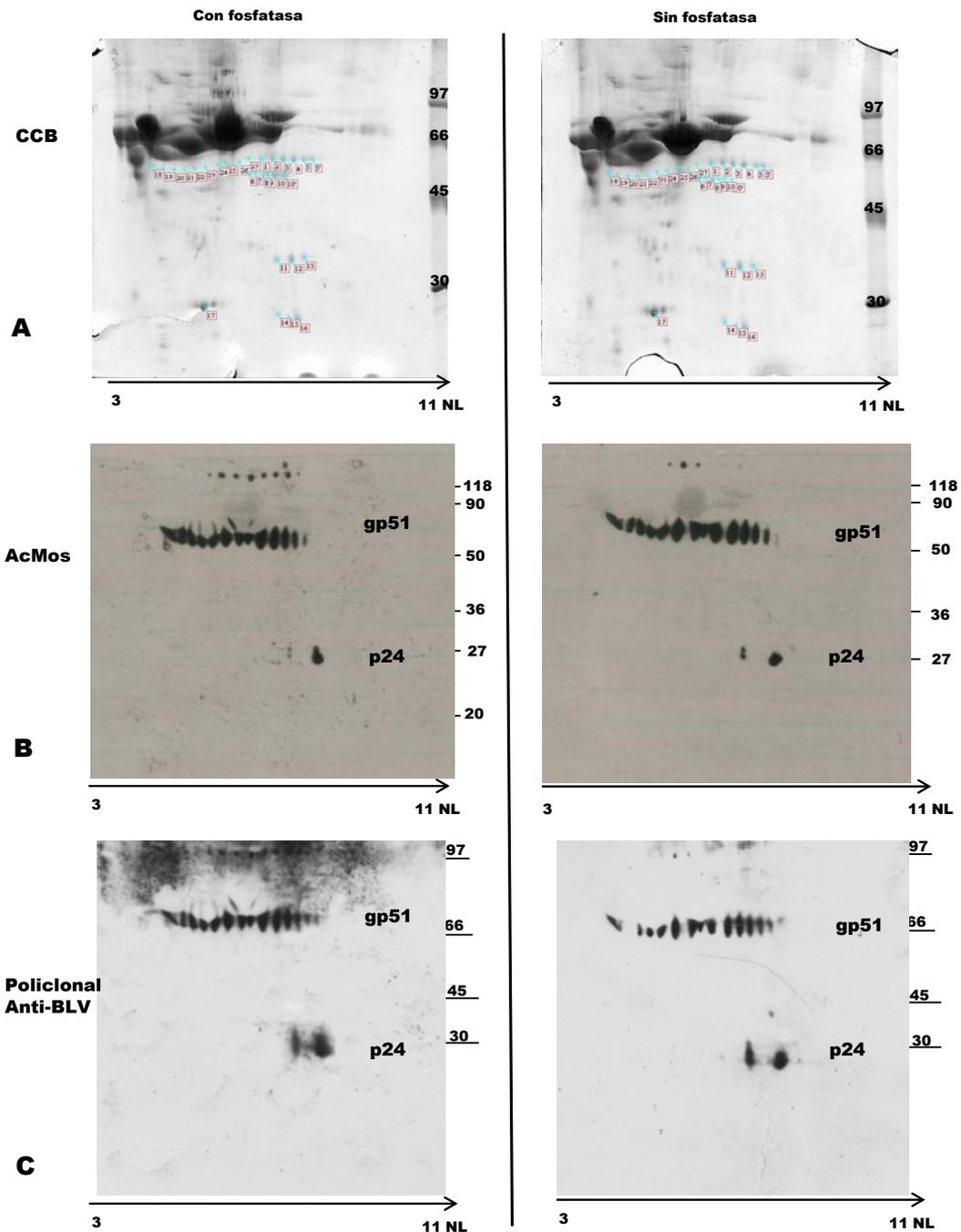


Figura 4.23: Evaluación preliminar de la fosforilación en p24 a partir de muestras enriquecidas de partículas virales. Las partículas virales purificadas de BLV a partir de la concentración y purificación mostrada en Fig. 4.12A fueron sometidas a tratamiento con y sin fosfatasa previo al análisis por 2D SDS-PAGE con tinción con CCB (A) en paralelo con el WB revelado con AcMos (B) y suero policlonal (C).

4.4.2.2. Glicosilación en la proteína Env.

El análisis de esta modificación postraduccion se analiza en detalle en el Capítulo III de esta tesis.

4.4.3. Inmunoreactividad en sueros bovinos seropositivos para BLV.

Se evaluó la inmunoreactividad de las partículas virales purificadas frente a un suero bovino seropositivo para BLV (**figura 4.24**). Para ello las partículas virales purificadas de BLV (como se describe anteriormente) se corrieron en geles 2D y se enfrentaron a este suero permitiendo la detección de las principales proteínas virales: gp51 y p24. El reconocimiento de ambas proteínas se realizó de la misma manera que en el caso de los AcMos, se volvió a observar el tren de spots para gp51 y algunas isoformas para p24. A su vez se observaron otros spots correspondientes a proteínas con un peso molecular aproximado de 40KDa. De todos modos la cantidad de proteínas no fue suficiente para correr estos geles en paralelo para tinción con CCB y posterior identificación por MS.

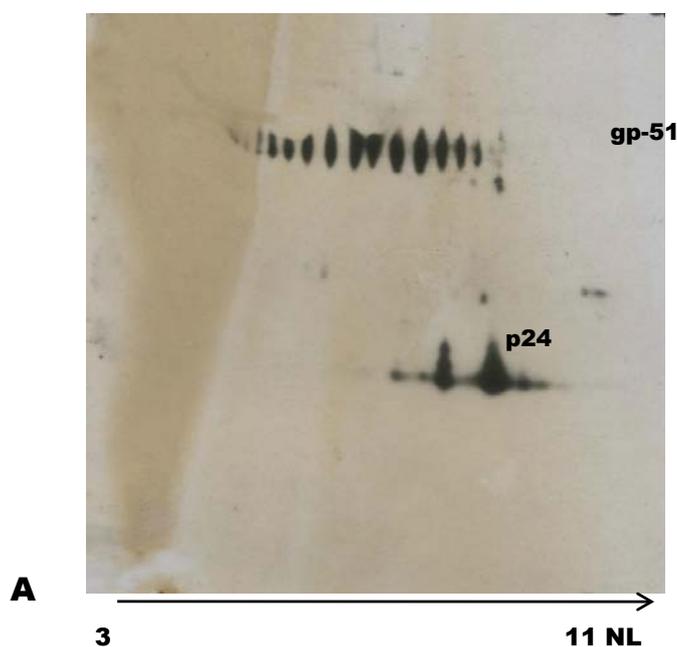


Figura 4.24: Análisis de la inmunoreactividad de un suero bovino seropositivo para BLV (suero policlonal anti-BLV comercial -VMRD) frente a partículas virales purificadas de BLV purificadas a partir de un gradiente discontinuo de sacarosa.

Si bien este ensayo se realizó con un único suero seropositivo para BLV de este resultado claramente se desprende que las dos proteínas más inmunogénicas son p24 y gp51. En particular destacamos la elevada inmunogenicidad de gp51 en particular si consideramos el escaso número de trímeros Env que existen en la superficie del virión (por analogía con HIV-1). Ambas proteínas serían claros candidatos a ser usados tanto para diagnóstico como para inmunoprotección. En este sentido sería muy interesante evaluar la inmunoreactividad de las partículas virales con sueros positivos de diferentes formas clínicas (ver perspectivas).

4.4.4. Formación de estructuras virales extracelulares similares a biofilms en células infectadas por BLV.

Finalmente se empleó la línea celular BL3.1 para evaluar la potencial formación de estructuras similares a biofilms de BLV. Originalmente esta línea celular se adquirió con el fin de mejorar la

obtención y purificación de partículas virales pero posteriormente se continuó trabajando únicamente en el análisis de biofilms. Los resultados que se presentan en esta tesis son preliminares. En primer lugar se comparó la expresión en sobrenadante y lisado celular. Se observó entonces que en ausencia de activación (en este caso al ser una línea celular de linfocitos B es posible realizar activación con forbol ester por ej PMA) no se observa expresión de ninguna de las proteínas virales en sobrenadante. Sin embargo en el lisado celular se observó expresión de las proteínas gp51 (55kDa), p24 (24 kDa) y posiblemente de Gag (40-55kDa) (**figura 4.25A**). Por su parte se evaluó si la presencia de PMA (**figura 4.25B**) afectaba la expresión de proteínas y se observó que en lisados de BL3.1 no existía diferencia significativa entre las células activadas vs las no activadas. Sin embargo la ausencia de expresión de proteínas virales en sobrenadante, al menos en ensayos preliminares, motivó el estudio de la presencia de biofilms de BLV en esta línea celular.

La línea celular BL3.1 es una línea de linfocitos B bovinos derivada de un linfosarcoma que contiene ADN proviral de BLV integrado a su genoma. Una de las hipótesis desarrolladas en base a la

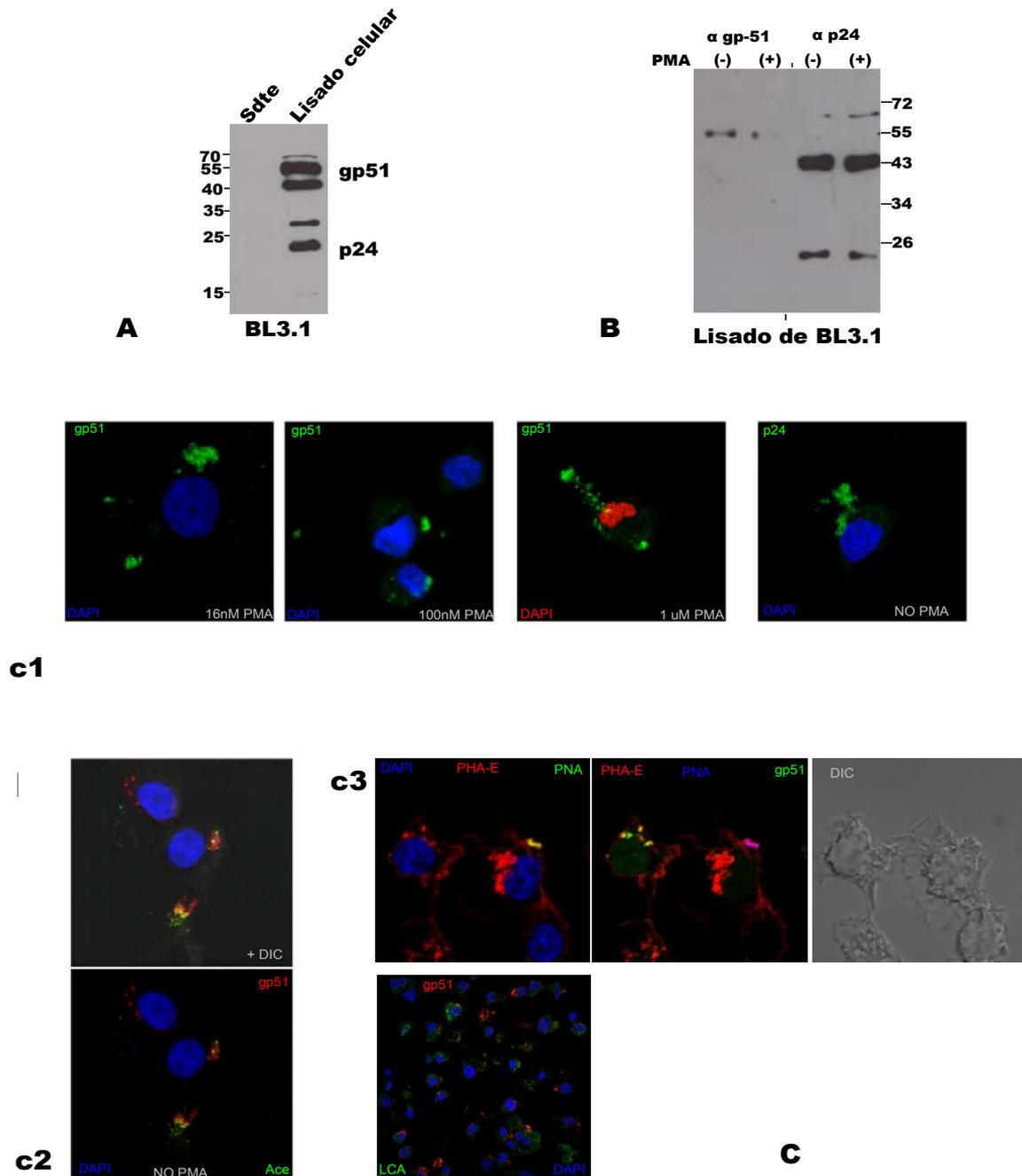


Figura 4.25: Evidencia preliminar de la existencia de biofilms de BLV en la línea de linfocitos B bovina BL3.1. **A:** Comparación por SDS-PAGE/WB (AcMos anti-p24 y anti-gp51) de fracciones de sobrenadante (t=48hs) y lisado celular de la línea BL3.1. **B:** SDS-PAGE/WB de lisado de células BL3.1 en presencia y ausencia de PMA (activador) revelado de forma individual con anti-p24 y anti-gp51. Cuando se emplea anti-p24 se observan bandas correspondientes a p24 (24kDa), Gag (44kDa) y Gag-Prt (66kDa) mientras que al emplear el anti-gp51 se observan bandas a la altura de gp51. **C:** Microscopía confocal de células BL3.1 con clusters de componentes virales y celulares en la superficie de las células. 1) Marcaje de antígenos virales en presencia de distintas concentraciones de PMA (16nM, 100nM y 1uM) utilizando anti-gp51 y en ausencia de PMA utilizando anti-p24. 2) Marcaje de proteínas de matriz extracelular (en este caso colageno que es reconocido por la adhesina Ace) junto con proteínas virales (gp51). Arriba se incluye la superposición con DIC. 3) Marcaje con lectinas a fin de seleccionar lectinas capaces de discriminar entre el biofilm y la célula.

escasa producción de partículas virales de BLV estaría vinculada al tipo y modo de transmisión de partículas virales de una célula a la otra. En retrovirus en particular se demostró que existen modos alternativos de transmisión en ausencia de partículas virales maduras que implican transferencia por interacción célula-célula (sinapsis virológica) de componentes virales de una célula a la otra. En la sinapsis virológica se forma una zona de contacto donde hay aumento de la expresión de Env (la cual se une a receptores en la superficie de la célula blanco). A través de este contacto pasan componentes virales^{20, 112, 167}. El nombre surge porque este tipo de interacción recuerda la sinapsis inmunológica.

Sin embargo cabe destacar que en el caso de algunos retrovirus, en particular HTLV-1 se ha demostrado que no sólo el proceso de sinapsis virológica es sumamente relevante para la transmisión sino también que la ausencia de partículas virales libres en el medio extracelular también podría obedecer a la presencia de estructuras extracelulares conformadas por partículas virales maduras que brotaron pero permanecen embebidas en componentes de matriz extracelular y membrana conformando una cápsula estructurada llamada "biofilm"^{198, 247}. Esta estructura podría ser considerada una unidad de transmisión dado que el conjunto de partículas virales presentes en el biofilm pasaría de una célula infectada a una célula no infectada. Este modo de transmisión también podría explicar la ausencia de partículas virales libres en el sobrenadante de esta línea celular aunque sería extrapolable a la condición "in vivo". Estos ensamblados virales se transfieren a células blanco durante la interacción célula infectada vs célula no infectada y puede observarse en la superficie de las células o incluso en sitios distantes al lugar de contacto entre las células. Esta forma de transmisión no requiere remodelación celular a diferencia de la sinapsis virológica por tanto la infección puede ocurrir rápidamente. Algunos de los componentes que forman la matriz extracelular que atrapa a estas partículas virales serían colágeno, agrina, galectina 3 y teterina (interesantemente esta proteína se incorpora de forma específica en partículas virales de HIV-1 aunque aún no se ha reportado la existencia de biofilms en este retrovirus).

Con estas hipótesis decidimos estudiar la presencia de biofilms mediante microscopía confocal utilizando marcadores para: i) proteínas virales (p24 y gp51), ii) membrana plasmática, iii) componentes de matriz extracelular y iv) lectinas (que permitieran evidenciar biofilms vs células). Si bien este fue un primer abordaje experimental, la microscopía confocal en células BL3.1 estimuladas y no estimuladas resultó ser una técnica adecuada que permitió observar la presencia de estructuras compatibles con biofilms como los reportados para HTLV-I. En particular en la **figura 4.25C1** se observa la expresión de gp51 que se proyecta hacia afuera de la célula. Estas células expresan estos antígenos virales en presencia o ausencia de activador (PMA-forbolester) y ambos antígenos virales (gp51 y p24) presentan en estas células una expresión distribuida de forma heterogénea con concentración de antígeno en zonas discretas.

Por otro lado fue posible observar que los antígenos virales (gp51-Env- se muestra en la **figura 4.25C2**) co-localizan con proteínas de matriz extracelular como colágeno el cual es reconocido por la proteína Ace. Finalmente las lectinas utilizadas reconocían las células y también las partículas virales

(figura 4.25C3) no encontrando ninguna que permitiera la co-localización únicamente con las partículas virales. Sería interesante probar con la lectina SNA que reconoce ácido siálico que como analizamos por el patrón de reactividad de gp51 en la 2D y veremos más adelante forma parte de los carbohidratos presentes en las partículas virales de BLV. Tampoco fue posible realizar el marcaje con proteínas de membrana ya que en todos los casos este marcaje fue difuso (no se muestra).

4.5) CONCLUSIONES

El BLV es un retrovirus con el cual es difícil realizar aislamiento viral y existen pocas líneas celulares que han podido ser infectadas persistentemente con el virus. De hecho estas líneas celulares producen partículas retrovirales del BLV en baja proporción. Los retrovirus crecen lentamente en cultivos por lo tanto se requiere de gran cantidad de material de partida y un adecuado sistema de concentración y purificación de viriones. Una de las dificultades encontradas en el abordaje proteómico se relaciona con la baja recuperación de partículas virales presentes incluso en producciones a gran escala realizadas con células persistentemente infectadas con BLV. La cantidad de partículas virales presente en el sobrenadante de cultivo limita por consiguiente la cantidad de proteínas virales disponibles para la espectrometría de masa. Pese a estos problemas y como se desprende de los resultados obtenidos se logró optimizar un protocolo preliminar para la obtención y purificación de partículas virales derivadas del BLV a partir de la línea celular persistentemente infectada con BLV: FLK (epitelial derivada de oveja). El enriquecimiento y purificación de partículas retrovirales de BLV permitió su visualización mediante MET y la confirmación por SDS-PAGE/WB utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra 2 de las proteínas estructurales principales: p24 y gp51. Las principales proteínas virales estructurales que se deducen de la secuencia genómica del BLV han sido identificadas por espectrometría de masa. Se han logrado identificar un importante número de proteínas virales estructurales cuyos ORFs se deducen a partir de la secuencia nucleotídica: p24, p12, p15, gp51, PRT, y algunos de sus precursores como Gag y Env. Por su parte la identificación de dos de las principales proteínas presentes en BLV como son p24 y gp51 permitió comenzar con el estudio de modificaciones postraduccionales presentes en las mismas, este análisis se profundizó para gp51 (Env en realidad) como se describe en el capítulo 6. Se observó sin embargo que la presencia de proteínas derivadas del suero fetal bovino dificultó la identificación de proteínas aunque la depleción de SFB redujo en gran medida el rendimiento en la obtención de partículas virales purificadas. A su vez con este procedimiento no fue posible identificar nuevas proteínas virales (no deducidas a partir del análisis genómico) o proteínas reguladoras.

Los resultados de la tesis reflejan que uno de los principales problemas en la purificación de retrovirus utilizando ultracentrifugación en equilibrio en gradiente de densidad (generalmente usando gradientes de sacarosa) es la contaminación con vesículas cubiertas de membrana celular. Esta es

probablemente una de las etapas claves para purificar correctamente partículas virales de microvesículas o exosomas y es uno de los principales problemas que presenta nuestra purificación dado que no contamos con anticuerpos marcados con oro coloidal (para el MET) contra antígenos virales por lo tanto no sabemos con certeza el % de estos componentes rodeados de membrana en comparación con las partículas virales obtenidas. Recientemente se ha descrito la presencia de exosomas extraídos de leche de vacas infectadas con BLV que poseen las proteínas estructurales gp51 y p24 por tanto es importante tener esto en cuenta a la hora de la purificación de partículas virales²⁸³. Una solución a este problema sería el empleo de la ultracentrifugación rate zonal permitiendo la separación de las partículas virales del resto de los contaminantes por tamaño. Esto fue realizado con éxito para MMLV y HIV-1^{238, 239}. Es importante tener en cuenta este procedimiento a la hora de establecer qué proteínas del hospedero se incorporan a las partículas virales. Con respecto a este punto también es relevante emplear líneas celulares similares a la célula blanco.

En este sentido y con el fin de optimizar la producción y la calidad de las partículas virales obtenidas se adquirió la línea celular de linfocitos B denominada BL3.1. De todos modos esta línea celular fue empleada en primer lugar para iniciar el estudio de la formación de biofilms en BLV. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis reflejan que es altamente probable que al igual que el HTLV-1, el BLV pueda transmitirse de una célula a otra por esta vía. Los resultados obtenidos hasta el momento dan indicio de ello, por ejemplo si consideramos la asociación entre los antígenos virales y proteínas de matriz extracelular, así como la presencia de zonas discretas en la superficie celular de la línea BL3.1 compatible con estas estructuras. Para comprobar esto de forma concluyente se debería obtener un marcaje diferencial del biofilm vs la célula infectada (con lectinas, marcadores de membrana, etc.), desprender esta estructura de las células (por ej. con heparinasa) para realizar posteriormente infecciones de líneas reporteras por ej. LTRBLVLuc que permitan establecer que la infección tiene lugar por medio de estas estructuras. El estudio de la formación de ensamblajes virales extracelulares similares a biofilms bacterianos en BLV aporta conocimiento de una nueva forma de transmisión como un componente más que justifica la escasa presencia de partículas virales en estos virus (estas estructuras ya han sido reportadas en HTLV-1¹⁹⁸) sumado al hecho de la prolongada latencia que se establece durante la infección por BLV, por consiguiente la baja producción de partículas virales libres y la sinapsis virológica también descrita para HTLV-1^{20, 112}. Cabe aclarar sin embargo que estas formas alternativas de transmisión no implican la ausencia total de partículas virales libres y tal vez la activación de BL3.1 permita aumentar este rendimiento.

Con respecto al proteoma de BLV en relación a las BL3.1, esta línea celular es análoga a FLK-BLV pero posee la ventaja de ser un sistema de producción de partículas virales de BLV en condiciones muy similares a lo que ocurre en una infección natural. Esta línea celular bovina BL3.1 se puede utilizar para establecer específicamente cuáles proteínas del hospedero son incorporadas en las partículas virales de

BLV ya sea de forma aleatoria o específica como se ha reportado para HIV por ejemplo¹⁹⁷. El hecho que sean linfocitos B bovinos (blanco natural del BLV) permite asignar o al menos generar hipótesis respecto a las proteínas del hospedero que se encuentren a diferencia de los que ocurre con las células FLK-BLV que son de origen ovino. Ahora que conocemos la cinética de crecimiento y los requerimientos de la línea la idea es aumentar la cantidad de células en cultivo dado que se trata de una línea celular en suspensión lo cual favorece el escalado. La incorporación de esta línea nos permitirá obtener partículas virales similares a las que se obtienen en una infección natural por el virus siendo por tanto partículas de mejor calidad para el análisis proteómico posterior.

Este trabajo representa el primer trabajo de análisis proteómico realizado en BLV y si bien los resultados obtenidos fueron preliminares se generaron herramientas y se avanzó en el conocimiento del estudio proteómico de este retrovirus. Si bien la descripción de nuevos proteomas virales es cada vez mayor este número aun es muy escaso, en particular en lo que respecta a retrovirus.

4.6) PERSPECTIVAS

- Sustituir el SFB por triptosa fosfato (TPB) para suplementar el RPMI en cultivos de FLK-BLV y BL3.1.
- Realizar comparativamente una centrifugación isopícnica vs una “rate zonal” con el fin de eliminar los exosomas o vésiculas (tamaño variable entre 50-500nm) con densidad similar pero tamaño diferente que las partículas virales, utilizado con éxito para MMLV.
- Evaluar la presencia de exosomas (mediante el uso de anti-ESG101 disponible conjugado con HRP), inmunogold y también MET con inmunogold para identificación de proteínas virales.
- Agregado de subtilisina o heparinasa para liberar las partículas virales.
- Poner a punto ensayo de 2D SDS-PAGE/WB con partículas virales purificadas enfrentadas a sueros bovinos seropositivos. Realizar 30 corridas bidimensionales seguidas de electrotransferencia, cada una testada con un suero individual seropositivo. La idea de este ensayo es establecer si el patrón de inmunorreactividad de los distintos sueros es diferencial y tiene correlación con el estadio de la enfermedad en la que se encuentra el animal: asintomático (AL), con linfocitosis persistente (LP) o con linfosarcomas.
- Para evaluar la fosforilación en p24 sería interesante realizar el mismo ensayo que el empleado con partículas virales utilizando la proteína p24 recombinante dado que podría utilizarse una mayor cantidad de proteína para los geles 2D SDS-PAGE/CCB.

5) Expresión de la glicoproteína de envoltura (Env) del Virus de la Leucosis Bovina en forma soluble y su caracterización bioquímica, biofísica, estructural y antigénica.

5.1) INTRODUCCIÓN

5.1.1 Sistema de expresión de proteínas recombinantes: modelo S2

El sistema de expresión desarrollado en las células de insecto Schneider 2 (S2) de *Drosophila* es un sistema de expresión no lítico basado en plásmidos²³⁴. En este sistema un alto número de copias del plásmido recombinante se inserta en el genoma de la célula hospedera permitiendo, luego de la adición de inductores químicos, la producción continua de la proteína foránea deseada sin destrucción de la célula^{109, 117, 191}. En este sentido se han encontrado arreglos de más de 500-1000 copias de plásmido insertas de forma cabeza-cola en un único evento. La integración estable en los cromosomas se da por integración mediada por transposon P. Esto permite niveles altos de expresión tanto de la proteína a expresar como del gen de resistencia utilizado para la selección¹³¹.

Las células S2 son fácilmente transfectables para generar líneas estables que expresen la construcción de interés²³² y se han empleado para producir grandes cantidades de proteínas secretadas (y también de membrana) heterólogas⁶⁹. La presencia de la maquinaria de plegamiento que promueve la correcta formación de enlaces disulfuro en el RE y la capacidad de las S2 para realizar modificaciones postraduccionales como la N-glicosilación¹⁰⁶ las hacen adecuadas para la expresión de glicoproteínas con patrones disulfuro complejos como las glicoproteínas virales así como también las moléculas de Fab o anticuerpos. Una de las ventajas que presenta el cultivo de S2 para la producción de proteína es que las mismas pueden crecer en un medio químicamente definido sin la adición de suero lo cual simplifica enormemente la purificación²³².

La expresión en células S2 se basa en la generación de una línea celular no lítica de células que crecen sin inconvenientes que permiten la producción de alta calidad en un ambiente sin proteasa (o en baja proporción). Dentro de las ventajas que presenta el sistema de expresión en células de *Drosophila* S2 encontramos: i) la gran densidad celular que se alcanza fácilmente (50-100 veces mayor si la comparamos con células de mamífero), ii) el crecimiento de células en suspensión, iii) el uso de promotores inducibles (concentrando la producción de proteína en un período de tiempo determinado y evitando la degradación) y iv) el establecimiento de un bioproceso continuo (a diferencia de aquel que involucra la lisis celular inducida por vectores virales por ej.). Como resultado de ello este sistema puede producir gran cantidad de proteína recombinante homogénea en corto tiempo y con un equipamiento y espacio mínimo. Las células S2 fueron aisladas de cultivos primarios de embriones de *Drosophila melanogaster* (de fase tardía 20-22hs) como células inmortalizadas no tumorigénicas que podrían

derivar de células sanguíneas, son semi-adherentes y presentan características de macrófagos (en su morfología y algunas características funcionales) ^{131, 217, 234}.

En general se plantea que el sistema de expresión de S2 posee todas las ventajas que ofrece el sistema basado en células Sf9 con la ventaja adicional que las células S2 pueden utilizarse para obtener la expresión estable bajo el control de fuertes promotores inducibles. Las células S2 pueden ser transfectadas de forma estable o transitoria utilizando una serie de plásmidos que pueden tener promotores constitutivos (ej pAc5) o inducibles (pMT). Las líneas estables se obtienen en general luego de 3-4 semanas mediante la co-transfección del vector de expresión junto con el vector de selección con un marcador de resistencia a drogas. El sistema de expresión S2 da lugar a líneas celulares estables obtenidas luego de la selección generalmente se consideran policlonales y no expresan la proteína de interés de forma homogénea²³². En general la actividad basal del promotor inducible fuerte de metalotioneína es indetectable en células S2 y no presenta actividad basal si se compara con otros promotores inducibles fuertes como por ej hsp70.

5.1.2 Proteínas Env retrovirus

Una característica común de todos los virus envueltos (entre los que se encuentran los miembros de la familia *Retroviridae*) es que la entrada a la célula hospedera se produce mediante la fusión de la membrana de la envoltura viral y la membrana de la célula blanco. Este proceso es mediado por glicoproteínas de superficie virales que se encuentran ancladas en la envoltura viral la cual adquieren de la célula hospedera durante el egreso de las partículas virales. Estas glicoproteínas de superficie son esenciales para la infectividad viral dado que son responsables en primer lugar del reconocimiento del receptor celular específico, seguido de la inducción de la fusión entre las membranas virales y celulares (lo cual permite el ingreso del ácido nucleico viral a la célula blanco). Por homología con otros retrovirus como HIV-1 se puede suponer que son escasas las moléculas de esta proteína en la superficie del virión distribuida de forma irregular⁸⁶. Si bien estas proteínas poseen un esquema mecánico común, estructuralmente pueden dividirse en tres grandes grupos: clase I, II o III dependiendo de la estructura secundaria presente en la subunidad TM (**figura 5A**). En el caso de BLV (al igual que en el resto de los retrovirus) el complejo Env, constituido por las subunidades SU y TM, pertenece a las glicoproteínas de fusión de clase I^{6, 113}.

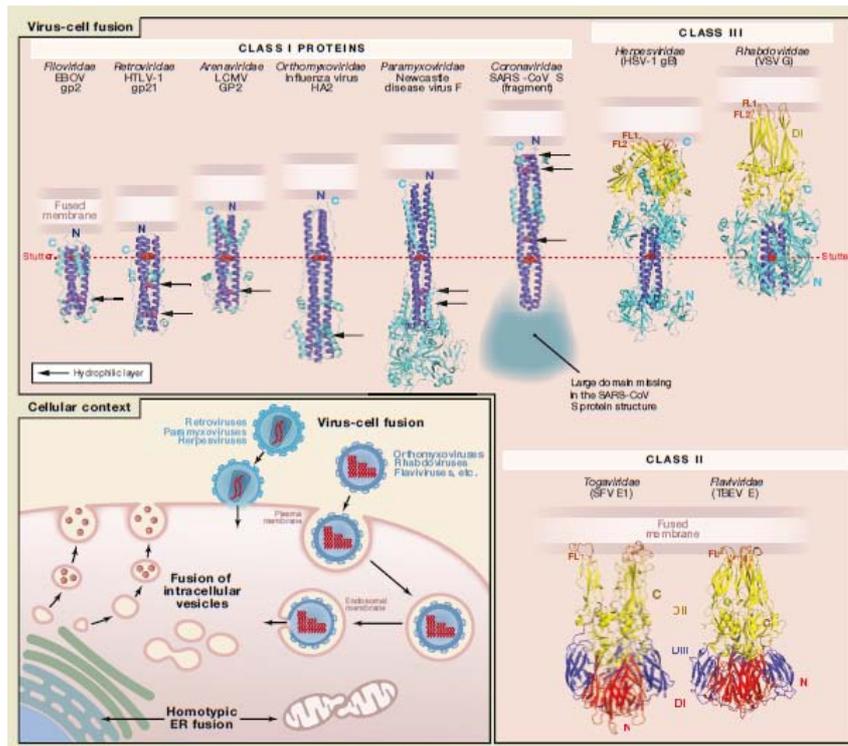


Figura 5A: Glicoproteínas virales clase I, II y III cuya estructura completa del ectodominio o parte de la misma ha sido elucidada. Se visualiza también la función de estas proteínas en el contexto de la infección viral. Se representa asimismo la fusión célula-célula en proteínas eucariotas (fusión homotípica del RE en este caso) en contraposición con la fusión realizada por proteínas virales. Tomado de Igonet & Rey, 2012¹¹³

Estas proteínas se sintetizan como precursores inactivos, que se oligomerizan en primera instancia formando trímeros en el RE y posteriormente sufren procesamiento proteolítico por endoproteasas tipo furina en su trayecto por el Golgi dando lugar a dos subunidades SU y TM cuyos nombres particulares varían de acuerdo a su peso molecular en los distintos retrovirus (para BLV SU-gp51 y TM-gp30). Este procesamiento proteolítico es obligatorio para la correcta función de los trímeros Env en la infección viral¹⁷⁰. Estas subunidades permanecen unidas por interacciones de tipo no covalente o por puentes disulfuro según el retrovirus. En el caso de permanecer ambas subunidades unidas por enlace covalente (puente diS) este enlace juega un papel fundamental durante la activación de la proteína dado que sufre isomerización. Este es el caso de la glicoproteína Env de BLV.

Con respecto a la función las glicoproteínas de fusión virales (independientemente de su clase) son los componentes de mayor relevancia en la entrada de virus envueltos. En este sentido la penetración de virus envueltos tiene lugar por fusión de membranas (como se mencionó anteriormente) mecanismo catalizado por las proteínas presentes en la envoltura viral. La maquinaria involucrada en este proceso podría considerarse simple al menos cuando lo comparamos con el montaje necesario para realizar eventos de fusión intracelulares (como la fusión homotípica del RE ver figura 5A). Una razón posible para esta "simplicidad" presente en proteínas de fusión virales es que estos factores promotores de fusión sólo se emplean una vez. La actividad fusogénica es disparada por señales ya sea la unión al

receptor celular y/o un descenso en el pH. A partir de allí induce cambios conformacionales irreversibles siendo por tanto un proceso unidireccional ya que no se requiere contraparte en la célula blanco como en el caso de fusión célula-célula presentes en mecanismos intracelulares^{50, 107, 271}.

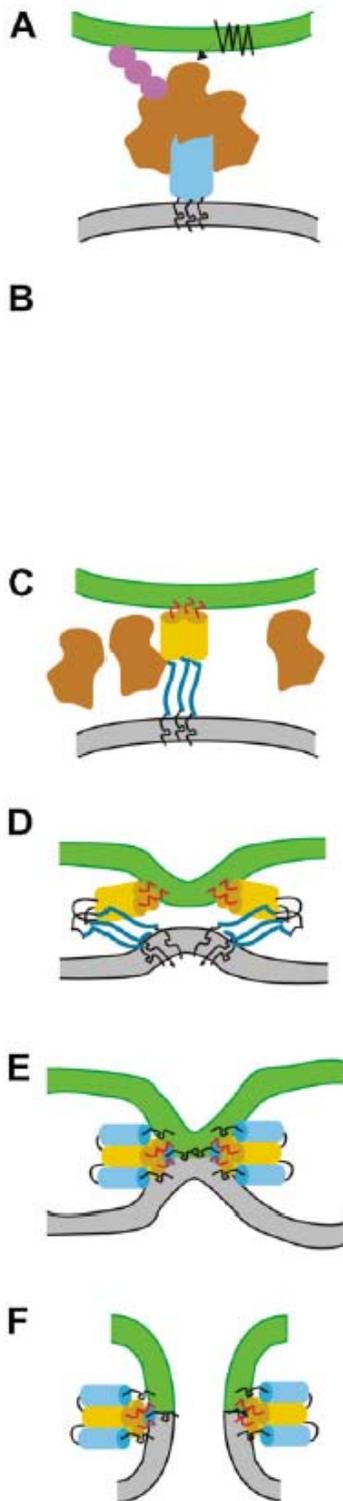


Figura 5B: Modelo de fusión para proteínas de fusión clase I. A) Unión al receptor o acoplado a endocitosis (ej HA) que dan lugar a un cambio conformacional en la proteína. B) Existencia de intermediarios monoméricos (sólo postulado para algunas proteínas clase I pero típico de las proteínas clase II). C) Estados intermedios transitorios donde el péptido de fusión se ancla a la membrana e inicia la curvatura inicial. Esto podría involucrar varias proteínas de fusión que podrían agruparse vía interacciones a través del péptido de fusión. D) repliegue inicial de la región C-terminal da lugar a la aposición de las bicapas lipídicas. Pese a que este paso debe mantener estricta simetría trimérica en el extremo N-terminal la región C-terminal debe ser flexible. E) unión final de las capas externas inducen hemifusión controlada por ambas regiones transmembrana. F) el dominio transmembrana también juega un papel crítico en la apertura del poro de fusión y posiblemente en su expansión.

Con respecto a la estructura, el motivo de las proteínas de fusión clase I se caracteriza por una periodicidad de 7 residuos de aminoácidos no polares (denominados repetidos de heptadas, heptadas o HR) que dan lugar a una α hélice superenrollada (“coiled-coil”) central paralela a lo largo del eje de la

molécula. Las proteínas de fusión clase I existen en una conformación metaestable en la superficie viral y luego de la activación se convierten en estructuras estables de menor energía. La fusión se dispara por la unión al receptor celular (y en algunos casos co-receptor) que genera cambios conformacionales en la proteína o por ambiente de pH bajo endosomal que ocasionan cambios conformacionales en la proteína. El primer cambio resulta en la exposición del péptido de fusión hidrofóbico presente en el extremo N-terminal que en el caso de Env se localiza en la subunidad TM y se inserta en la membrana de la célula blanco⁷⁰. Subsecuentemente la proteína colapsa en una conformación de horquilla (“hairpin”) en la cual el péptido de fusión queda en juxtaposición con el dominio transmembrana trayendo ambas membranas en estrecha proximidad en el mismo extremo de la proteína.¹⁰⁷. Esto da lugar a la mezcla del contenido lipídico de las membranas en aposición (hemifusión). Las heptadas N y C terminales luego se asocian en un core hexamérico (“six hélical bundle”-6HB) que facilita la finalización del proceso de fusión dando lugar a la formación y expansión del poro de fusión^{21, 70}. La forma 6HB de las glicoproteínas virales es altamente termoestable y resistente a la desnaturalización por SDS (**figura 5B**).

5.1.2.1 Proteína Env HIV-1

En el caso de HIV-1 el trímero de la glicoproteína Env está formado por heterodímeros gp120/gp41 la cual es blanco de anticuerpos neutralizantes. Varias estructuras de componentes de gp120 y gp41, solos o en complejo con distintos ligandos han sido determinadas^{138, 140, 141, 171, 200 63, 199, 205, 291, 292}.

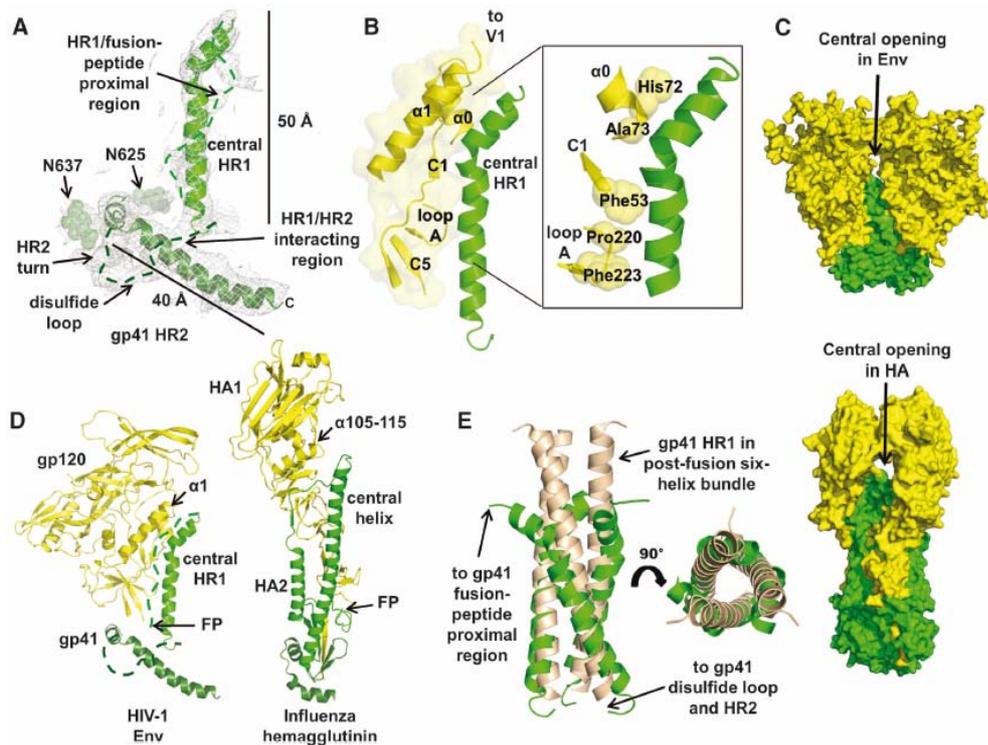


Figura 5C: Organización estructural de gp41 soluble en un estado prefusión (modelo HIV-1)A. estructura del monómero donde se visualizan la disposición de las hélices HR1 y HR2. Se observa el sitio de unión al péptido de fusión (línea punteada)B. Regiones de contacto entre las subunidades gp120 y gp41. C. Representación de la superficie de un trímero de Env (arriba) y HA (abajo) se observan en ambos casos dos de los tres protómeros. D. Comparación de las estructuras cristalográficas pertenecientes a Env y HA (estado prefusión) mostrando las similitudes estructurales entre ambas. E. Arreglo trimérico de gp41 en la conformación post-fusión mostrando el core hexamérico HR1-HR2¹²²

Asimismo la crioelectrón microscopía (cryo-EM) y tomografía han sido integradas con estructuras cristalográficas del core de gp120 para visualizar el trímero de Env a resoluciones que van desde 30 hasta por debajo de 10Å y dan por tanto información de la conformación general de la proteína antes y después de la unión al receptor^{157, 249}. Recientemente se ha determinado la estructura del trímero de Env a nivel atómico¹²⁴ (**figura 5C**).

Durante la síntesis de Env los precursores gp160 trimerizan y son subsecuentemente clivados por proteasas tipo furina en las subunidades gp120 y gp41 que en el caso de HIV-1 se asocian de forma no covalente antes de alcanzar la superficie de la célula infectada⁴⁸. Como se mencionó anteriormente la fusión virus-célula es un proceso de varias etapas que involucra tres cambios conformacionales de Env: i) el estado prefusión que interactúa con el receptor (en este caso con CD4), ii) el intermediario extendido de gp41 (que interactúa con los co-receptores CXCR4 o CCR5) y iii) el “six-helix bundle” o core hexamérico (hemifusión de las membranas viral y celular)⁸⁵. Estas 3 conformaciones prefusión, horquilla y postfusión se observa en todas las glicoproteínas de fusión clase I.

El requerimiento de que la Env trimérica nativa clivada deba sufrir un cambio conformacional durante la unión al receptor y la fusión, la vuelve metaestable lo cual ha generado dificultades tanto en la determinación de la estructura como en el desarrollo de vacunas. Este es un problema que sin lugar a

dudas trasciende a la proteína Env de HIV-1 y se extrapola a todas las proteínas Env de retrovirus y por tanto incluye a la Env de BLV e incluso al resto de las glicoproteínas de fusión tipo I (HA por ej).

Asimismo la extensa N-glicosilación (en promedio 81 sitios por trímero) genera complicaciones adicionales para la determinación de la estructura atómica. A su vez cabe recordar que se trata de proteínas transmembrana y por tanto el estudio de estas proteínas se realiza con formas truncadas de la proteína para que sean solubles (esto es eliminando el dominio transmembrana de gp41). En HIV-1 incluso se han generado formas clivadas del trímero Env modificadas para aumentar su estabilidad y homogeneidad (SOSIP gp140). En este sentido las modificaciones que se realizaron en esta proteína fueron las siguientes: i) se generó un puente disulfuro (denominado SOS) entre gp120 (residuo 501- según numeración de la cepa HXB2) y gp41 (residuo 605) para unir covalentemente ambas subunidades a la vez que se genera el cambio Ile559Pro para fortalecer las asociaciones gp41-gp41²²⁸. En una modificación reciente de esta construcción basada en la cepa BG505 (subtipo A) se removieron todos los residuos (excepto 4) de la región externa próxima a la membrana hidrofóbica (MPER) de gp41^{123, 129, 132, 229}. Todas estas modificaciones permitieron la expresión de un trímero Env en estado prefusión soluble, termoestable, no agregado y homogéneo: BG505 SOSIP.664 gp140 que permitió realizar la caracterización estructural por cristalografía de rayos X (**figura 5D**)¹²². Estos trímeros eran reactivos a un amplio panel de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro (“broad neutralizing antibodies”, bnAbs) incluidos aquellos que reconocen epítopos cuaternarios mientras que son poco reactivos a anticuerpos no-neutralizantes que reconocen subunidades individuales de gp120/gp41, no clivadas siendo por tanto trímeros no-nativos^{123, 229}. Este trímero BG505 SOSIP.664 gp140 presentó propiedades antigénicas similares a las nativas sugiriendo que su estructura sería similar al trímero nativo a pesar de las modificaciones que presentaba¹²⁹ y ello se confirmó recientemente dado que logró cristalizarse el trímero correspondiente a BG505 SOSIP.664 gp140 junto con el bnAb PGT122 dirigido contra un supersitio de vulnerabilidad de gp120 constituido por la Asn332 dependiente de glicanos^{122, 262}. La resolución lograda fue de 4.7Å. Los datos cristalográficos resultaron en perfecta concordancia con la cryo-EM¹⁶⁰.

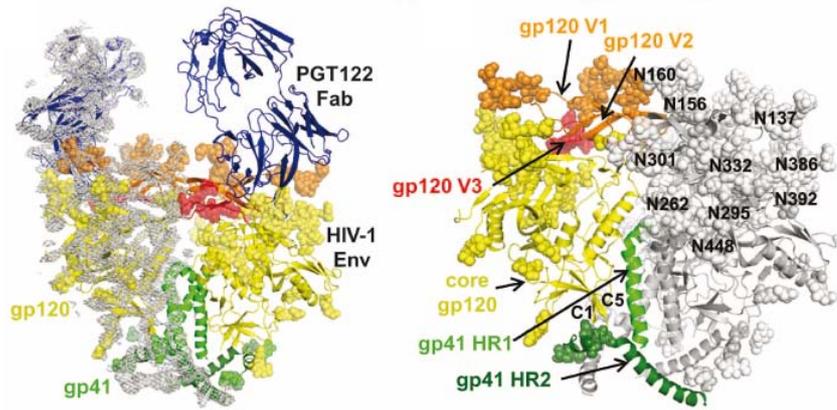


Figura 5D: Estructura general del trómero de Env de HIV-1 soluble, clivado, recombinante en complejo con el anticuerpo neutralizante de amplio espectro PGT122. Se observan en ambas imágenes dos de los tres protómeros. A la derecha (esferas grises) se marcan los glicanos en un protómero en gp120¹²²

5.1.2.2 La glicoproteína Env (gp51/gp30) del BLV

La proteína Env de BLV se sintetiza como un precursor poliproteico glicosilado inactivo (gp72) de 515 aminoácidos (aa) cuyo extremo N-terminal es generado por la pérdida del péptido señal en el RE de la célula blanco (**figura 5E**). En este compartimiento este precursor se oligomeriza formando homotrómeros y posteriormente durante el transporte de la proteína a la superficie (cada monómero) es procesado proteolíticamente por convertasas celulares tipo furina²⁸⁹ dando lugar a las subunidades: gp51 (de superficie: SU, porción N-terminal) implicada en el reconocimiento del receptor celular y gp30 (transmembrana: TM, porción C-terminal) que es la que lleva a cabo el proceso de fusión (a pH neutro) y a su vez permite anclar el complejo gp51-gp30 a la membrana^{90, 119, 120, 235}. Ambas subunidades se hayan unidas por puentes disulfuro³² y permanecen asociadas como un trómero funcional (gp51/gp30)₃¹⁴⁴.

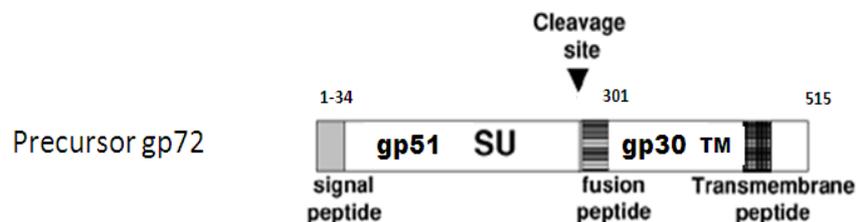


Figura 5E: Precursor Env-BLV-gp72. En la secuencia primaria (515aa) se observa el péptido señal (1-34), la subunidad gp51 (SU) que se une al receptor, el sitio de procesamiento proteolítico (“cleavage site”) y la subunidad gp30 (TM) encargada de la fusión con sus regiones hidrofóbicas correspondientes al péptido de fusión y al dominio transmembrana (adaptado de Johnston y cols¹¹⁹).

El procesamiento proteolítico es necesario para que la proteína adquiera su potencial fusogénico dado que libera el péptido de fusión hidrofóbico (aa 304-324) en el extremo N terminal de la

subunidad gp30, involucrado en la inserción en la membrana blanco para iniciar la fusión. Este procesamiento deja a los trímeros gp51/gp30 en una conformación metaestable que posee la energía necesaria para llevar a cabo el proceso de fusión una vez gatillado por el reconocimiento del receptor celular. En viriones infectivos el trímero Env está presente en la conformación pre-fusión con gp30 localizado en el centro (con el péptido de fusión inaccesible) y gp51 expuesto en la superficie del trímero siendo accesible al reconocimiento de anticuerpos. La interacción de gp51 con el receptor celular (aún desconocido para BLV aunque sí está reportado para su contraparte en HTLV-1¹⁶⁴) dispara un cambio conformacional¹⁴⁴ en este complejo generando un rearrreglo en la subunidad gp30 que hace que el péptido de fusión presente en la porción N-terminal de gp30 quede expuesto. En BLV si bien no se ha caracterizado el receptor celular aún sí logró establecerse que este receptor presente en linfocitos aumenta su expresión en condiciones de elevada actividad metabólica¹⁴⁶ en particular en células pre/proB. También este marcador está presente en timocitos que responden a IL-7.

Este péptido hidrofóbico se inserta entonces en la membrana blanco durante una conformación extendida (“pre-horquilla”), intermediaria que adquiere la proteína. Finalmente en la conformación post-fusión gp30 se repliega en una conformación de horquilla en la cual el extremo N-terminal (conteniendo el péptido de fusión) es traído contra el extremo C-terminal con el dominio de anclaje a membrana (MSD) (**figura 5B**). Este cambio conformacional de gp30 genera que ambas membranas viral y celular entren en aposición constituyendo el primer paso en la fusión de membranas. El cambio conformacional en gp30 tiene lugar una vez que ocurre la unión al receptor en la superficie de la célula blanco e involucra la isomerización de los puentes disulfuro presentes entre gp51 y gp30^{264, 265}. Los retrovirus cuyas subunidades permanecen unidas por puentes disulfuro son los α , γ y δ -retrovirus mientras que los β -retrovirus al igual que los lentivirus (como HIV-1) permanecen unidos por enlaces no covalentes.

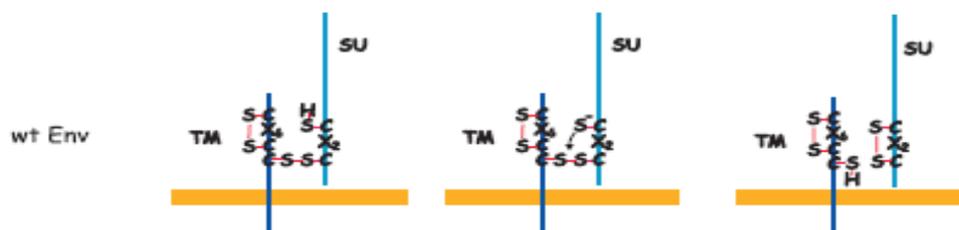


Figura 5F: Proceso de isomerización del puente disulfuro intersubunidad luego de la activación de la proteína (por unión al receptor). La Cys reactiva (con un tiol libre) induce la isomerización del enlace SU-TM en dos puentes disulfuro intrasubunidad (adaptado de Li y cols¹⁵⁰)

El puente disulfuro estabiliza la asociación entre ambas subunidades^{148, 241, 264}. Esto posiblemente ayude a evitar una activación prematura de la subunidad TM fuera de la célula blanco pero también compromete la activación dentro de la célula blanco. La secuencia C²¹²XXC²¹⁵ en SU

participa en la formación del puente disulfuro intersubunidad. Esta secuencia presenta un motivo de isomerización. Aparentemente la asociación entre subunidades está controlada por una actividad de intercambio tiol-disulfuro. El modelo indica que la C215 está unida por puente disulfuro a TM mientras que C212 lleva un grupo tiol libre que puede inducir isomerización del enlace SU-TM en un CXXC-disulfuro²⁶⁴ con la subsecuente activación de la fusión. En la Env inactiva el puente disulfuro se establece entre C215 y el último residuo del motivo CX6CC ubicado en TM, en el caso de BLV la C392^{72, 134, 209}. Luego de la unión de SU al receptor celular (activación), el tiol presente en C212 se desprotona de modo que puede atacar el puente disulfuro intersubunidad y rearregla en un isómero disulfuro dentro del motivo (CXXC) para dar lugar a dos puentes disulfuro intra-subunidad (**figura 5F**).

Esta modificación facilita el contacto entre la membrana celular y viral¹⁶² y constituye un mecanismo elegante para evitar la activación de la proteína hasta que sea necesario.

1.1 La subunidad de superficie gp51 (SU)

La subunidad gp51 es la más inmunogénica debido a su localización extracelular quedando expuesta al sistema inmune del hospedero. A diferencia de la subunidad gp30 que es pobremente inmunogénica, la proteína gp51 induce la masiva expresión de anticuerpos específicos en animales infectados.

La subunidad SU tiene una organización modular y puede dividirse según los distintos dominios funcionales así como por las características antigénicas de la misma. La porción N-terminal contiene el dominio de unión al receptor (RBD) de aproximadamente 143aa (del aminoácido 34 al 185 aprox) que se une al dominio C-terminal mediante una región rica en prolina (PRR desde el aminoácido 176-185)¹⁴⁶. Al ser responsables de la unión al receptor específico del virus, determinan el tropismo viral. Esta región está compuesta por epitopes conformacionales denominados F, G y H³² seguido de un motivo estructural determinado por la secuencia GYDP que es conservada en todos los retrovirus oncogénicos⁸⁴. Este motivo separa la región de epitopes conformacionales del dominio C-terminal que contiene los epitopes lineales A, B, D, E y el recientemente caracterizado epitope E' que se solapa con el epitope E^{16, 79}. En esta región inmediatamente adyacente a la secuencia GYDP se encuentra una región rica en prolina. El dominio C-terminal contiene una secuencia conservada CX₂C que se requiere para interactuar con la subunidad TM mediante puentes disulfuro como se mencionó anteriormente^{119, 264}. Por mapeo empleando anticuerpos monoclonales dirigidos contra los epitopes conformacionales (F, G y H) definidos previamente se lograron establecer en esta región N-terminal 2 de los 3 dominios de neutralización presentes en gp51^{42, 43}. Hasta el momento no se han reportado cepas virales que simultáneamente pierdan reactividad contra estos tres epitopes sugiriendo que su pérdida probablemente se correlacione con una pérdida en la infectividad. Gp51 también posee una región vinculada a la fusión (formación de sincicios) así como epitopes T helper y epitopes T CD8^{110, 120, 166}. Finalmente existe una región localizada entre los residuos 104-123 que interactúa con zinc y afecta tanto la actividad fusogénica como la infectividad *in vivo*⁹⁰ (**figura 5G**).

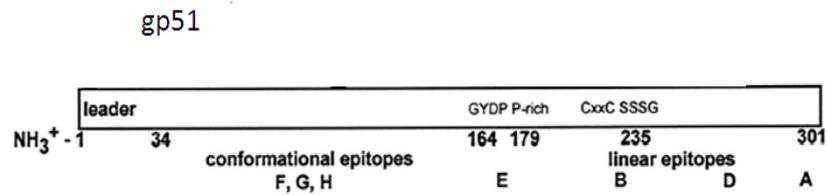


Figura 5G: Subunidad gp51. En este esquema se señala el péptido señal (1-34), los epitopes conformacionales (F, G y H) y lineales (A, B, D, E y E') y los motivos GYPD, PRR, CXXC y SSSG ("strong turn") (adaptado de Johnston y cols¹¹⁹)

1.5 La subunidad transmembrana gp30

Mientras que la subunidad gp51 participa en la primera etapa de la entrada del BLV mediante la unión al receptor, es gp30 la subunidad que media la penetración viral mediante la fusión de las membranas viral y celular. Esta subunidad es por tanto un factor clave en el ciclo replicativo del virus. Esta subunidad presenta 2 dominios hidrofóbicos característicos: el péptido de fusión localizado en la porción N-terminal y el dominio MSD (del inglés "membrane spanning domain") o región transmembrana, ambos representan dominios funcionales de gp30. Una vez que se gatilla el proceso de fusión, el péptido de fusión se inserta de forma oblicua en la membrana celular²⁵⁸. A su vez esta subunidad posee otros dos dominios funcionales: la región de repetidos de heptadas (rico en L e I) la cual se encuentra adyacente al péptido de fusión y la cola citoplasmática.

Como se mencionó anteriormente la región de heptadas participa activamente en el proceso de fusión ya que es la región capaz de plegarse en un motivo tipo "coiled coil" para generar el trímero de horquillas (o "six-helix bundle"). En el proceso de fusión también participa una región C-terminal descrita inicialmente para HTLV-1 denominada LHR ("non helical leash and alpha helical región", esta estructura refiere a un motivo α hélice presente en medio de una estructura peptídica no helicoidal). Péptidos que mimetizan esta región se demostró que inhiben el proceso de fusión^{180, 181, 208, 225} y recientemente se describió una región análoga en BLV localizada entre los aa 391-419. La presencia de esta región es esencial para la correcta formación de la horquilla en la conformación post fusión ("coiled-coil")¹⁴³. Asimismo se observó que otras proteínas virales clase I también poseen elementos extendidos no helicoidales en la región C-terminal del trímero de horquillas y entendiendo como estos elementos contribuyen al mecanismo de "leash in a groove" o correa en una ranura de la función de las proteínas de fusión tendrá una enorme relevancia en terapias antivirales (**figura 5H**)^{202, 270}.

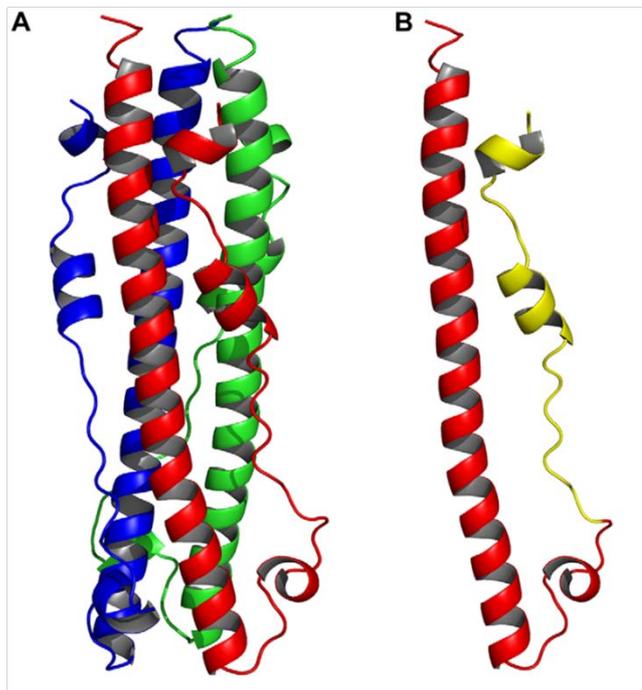


Figura 5H: Core hexamérico (trimer-of-hairpins) de BLV. **A:** Estructura cristalográfica del core hexamérico de TM-BLV, donde cada monómero tiene un color diferente. **B:** Representación de un monómero de la subunidad TM-BLV mostrando la hélice N-terminal y la cadena reversa (rojo) y el LHR (leash and helical regions) en amarillo. Extraído de Lamb y cols¹⁴⁴.

Con respecto a la región transmembrana hidrofóbica (MSD) esta posee 20aa y permite el anclaje del complejo Env a la membrana y es seguido por una cola citoplasmática de 58aa. Este dominio citoplasmático extremadamente largo, es característica común a las glicoproteínas de superficie presentes en retrovirus y su función está vinculada a la transducción de señales vía motivos de activación del Inmunorreceptor Basado en Tirosina (ITAM)^{23, 115}. El sitio crítico de los ITAMs consiste en la secuencia YXXL. Motivos ITAM similares también se encuentran en la Igα del complejo del receptor de antígeno de células B y puede ser reconocido por dominios SH2 en proteínas de señalización. Cuando se unen a CD8 los motivos ITAMs de gp30 son capaces de transducir señales a través de la membrana celular luego de la estimulación con un anticuerpo anti-CD8. Estos motivos también son importantes para la incorporación de proteínas Env en el virión y se requieren para la infectividad *in vivo* así como para el tráfico intracelular de estas proteínas^{101, 194, 279} (**figura 5I**). Existen a su vez dos motivos conteniendo dileucinas proximales que modulan negativamente la expresión en la superficie celular de las proteínas Env¹⁰⁵.

gp30

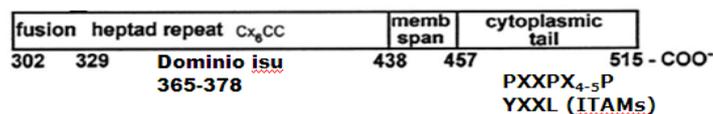


Figura 5I: Subunidad gp30. En este esquema se señala el péptido de fusión, la región de heptadas, la secuencia CX₆CC que participa en la formación del puente disulfuro, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática conteniendo motivos YXXL y PXXPX₄₋₅P (adaptado de Johnston y cols¹²⁰)

A su vez la cola citoplasmática de gp30 tiene homología con motivos de inhibición del Inmunorreceptor Basado en Tirosina (ITIMs) que son homólogos al BCR cuya relevancia funcional aún no se ha determinado²¹⁹. Asimismo gp30 interactúa con la fosfatasa SHP-1 que se asocia con FcγRIIB y actúa

como un regulador negativo crítico de la señalización del BCR⁵². Esta asociación sugiere la hipótesis que gp30 podría actuar como cebo para secuestrar SHP-1 lo que resulta en una regulación positiva de la señalización del BCR.

Finalmente la subunidad gp30 presenta en el ectodominio una región de inmunosupresión (dominio "isu") característica que comparte con el resto de los retrovirus. Este dominio presente entre los aa 365-378 (AQNRRGLDWLYIRL) se encuentra en la subunidad gp30 a aproximadamente 40 aa hacia el extremo C-terminal desde el péptido de fusión. La presencia de este dominio en proteínas de fusión retrovirales se determinó en primera instancia en gammaretrovirus (FeLV, MuLV). Se observó que esta proteína tenía propiedades inmunosupresoras *in vivo* e inhibía la quimiotaxis de monocitos, la secreción de IL-2 por parte de células T y la blastogénesis de linfocitos *in vitro*. En el caso particular de BLV, Gatot y cols demostraron que mutaciones en el dominio de inmunosupresión afectaban la actividad fusogénica de gp30⁸⁹ en particular los aa A361, A365 (este sería la Ala1 en el dominio isu que se emplea para comparar con otros retrovirus) y W373 pero no la infectividad *in vivo*. La presencia de estas mutaciones desestabilizaba la formación del complejo gp51-gp30 posiblemente en este caso debido a que la región ISU en BLV se solapa con el repetido de heptadas que forma parte esencial de la estructura helicoidal ("coiled coil").

Con respecto a la purificación de la proteína Env-BLV se han publicado escasos trabajos de expresión y purificación de gp51, en particular con el fin de emplearla como antígeno. En este sentido en el 2004, De Giuseppe y cols⁵⁷ utilizando el sistema Baculovirus expresó la proteína gp 51, con su secuencia señal. De este modo fue posible aislar un virus recombinante que expresaba una proteína gp51 secretada en células de insecto. La proteína gp 51 recombinante expresada se caracterizó utilizando anticuerpos monoclonales anti-BLV mediante análisis de Western blot y ELISA y se desarrolló un ELISA con gp 51 recombinante (rgp 51) para la detección de anticuerpos BLV siendo utilizada únicamente como antígeno. Esta proteína no presentó la calidad suficiente para realizar ensayos estructurales y funcionales.

Una de las preguntas que surgen de cara a la expresión de glicoproteínas virales es por qué no utilizar un sistema que mimetice el sistema de expresión "natural" de estas proteínas. En este sentido la pregunta que debe plantearse es para qué se utilizará la proteína recombinante, cuánto proteína se necesita para esos ensayos, etc. En este caso al tratarse de una proteína glicosilada descartamos el empleo de sistemas procariontes para la expresión de la proteína completa. Es necesario entonces trabajar con un sistema de expresión eucariota donde la elección sea entre células de mamífero y las células de insecto. Las células de mamífero presentan la ventaja de que todas las modificaciones postraduccionales presentes en estas proteínas serán conservadas dado que las glicoproteínas virales emplean estas células para realizar su ciclo replicativo. Sin embargo los sistemas de expresión en células de mamífero en general presentan un rendimiento bajo de producción y por otro lado la proteína obtenida en general no es homogénea debido a las modificaciones que posee. En particular para

estudios estructurales donde se requieren grandes cantidades de proteína pura esto constituye una desventaja considerable. Como veremos en el siguiente capítulo la glicosilación es la modificación que incorpora mayor variabilidad independiente de la secuencia proteica. A su vez la glicosilación en mamífero oculta sitios antigénicos (aunque otros son glicánicos) en insecto la glicosilación es mas simple permite tener gran cantidad de proteína soluble para estos estudios.

Como se mencionó anteriormente, tanto gp 51 (como parte de la Env) como p24, son las proteínas virales inmunodominantes *in vivo* ya que tienen el más alto grado de antigenicidad. Por esta razón, la expresión y purificación de gp 51 de BLV para su uso como un reactivo antigénico representa un abordaje prometedor al desarrollo de ensayos de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra BLV^{176, 177}, así como para el desarrollo de vacunas^{57, 224}. En este sentido, un aspecto crucial es que las proteínas Env –aunque inmunogénicas – tienen capacidad de modular la respuesta inmune mediante inmunosupresión e inducción de anticuerpos irrelevantes (no neutralizantes). La inmunomodulación es parte integral de las infecciones causadas por retrovirus y modificaciones en dominios vinculados con esta función son un blanco ideal para el desarrollo racional de herramientas capaces de revertir esta inmunotolerancia inducida por el virus y así promover una respuesta inmune efectiva.

Por su parte en lo referente a la estructura de la proteína Env o gp51 o gp30 de forma aislada recientemente Lamb y cols¹⁴⁴ elucidaron el core hexamérico correspondiente a la conformación post fusión del ectodominio de TM (gp30) (**figura 5H**). La importancia del estudio estructural radica en que permite explicar como funciona el trímero durante la fusión virus-célula y a la vez guía el diseño de vacunas de HIV-1 delineando los sitios antigénicos claves reconocidos por el sistema inmune humoral y los mecanismos de evasión generados por el virus para contrarrestarlo. Lamb y cols demostraron que iones coordinados (iones cloruro) y una red de moléculas de agua unidas por puentes de hidrógeno realizaban contribuciones críticas al ensamblaje y estabilidad de la forma trímero de horquillas que son esenciales para mediar la fusión. Asimismo evidenciaron que residuos básicos en el elemento helicoidal próximo a la membrana de LHR interacciona con residuos cargados que rodean un bolsillo hidrofóbico extendido en el “coiled-coil” que podrían ser blanco de drogas antivirales. Aparentemente la presencia de iones coordinados y los bolsillos hidrofóbicos rodeados de carga serían motivos funcionales significativos en proteínas de fusión de clase I^{143, 144} (**figura 5G**).

Excepto para el core hexamérico de gp30 se desconoce la estructura cristalográfica completa para la proteína Env BLV de estas glicoproteínas (excepto gp30 en la región de heptadas), su caracterización bioquímica es incompleta y aun no se pudo establecer cual es el receptor celular que emplea el virus para su ingreso a los linfocitos B bovinos. Una de las principales dificultades que enfrenta la elucidación de proteínas de fusión es su naturaleza glicoproteica con una contribución en el peso molecular debida a carbohidratos de aproximadamente 40% además de ser proteínas inestables en

lo que refiere al mantenimiento del complejo proteico (gp51-gp30)₃ que se mantiene en una conformación metaestable.

La elucidación de la estructura de la Env de BLV representa un enorme desafío dado que ninguna estructura del complejo prefusión completo ha sido elucidada para el deltaretrovirus mientras que en el resto de miembros de la familia *Retroviridae* sólo el trímero prefusión (gp120/gp41)₃ correspondiente a HIV-1. En este sentido la ventaja que presenta la proteína Env de BLV con respecto a la de HIV es en la subunidad SU que en BLV es más pequeña y menos glicosilada que su contraparte en HIV-1 gp120.

5.2) OBJETIVO ESPECIFICO

Este objetivo específico tiene por fin caracterizar a nivel bioquímico, biofísico y estructural la glicoproteína de superficie Env-BLV recombinante, y analizar sus propiedades antigénicas. Estas proteínas representan un desafío a la hora de la expresión debido a las dificultades que esto conlleva en cuanto a la cantidad y calidad de proteína que se obtiene. Existe entonces una necesidad de contar con un sistema de expresión de glicoproteínas virales para estudios que requieran gran cantidad de proteína como los estudios bioquímicos y estructurales. Este objetivo busca en primer lugar contar con un sistema de expresión de la proteína Env-BLV con alto rendimiento y que conserve sus características bioquímicas y estructurales para lograr su caracterización. Asimismo establecer si esta proteína recombinante posee propiedades antigénicas con el fin de emplearla como reactivo para el desarrollo de kit diagnósticos y a la vez utilizarla para estudios de respuesta inmune.

5.3) ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para llevar adelante esta estrategia experimental en lo que refiere a la optimización de la expresión y purificación de la proteína, así como la caracterización biofísica (SEC y SEC-MALLS ver adelante) y los ensayos preliminares de cristalogénesis se contó con la colaboración de la Unidad de Virología Estructural del IP donde se realizaron una parte de los experimentos.

5.3.1. Clonaje del gen *env* en plásmido de expresión eucariota pT350.

5.3.1.1. Optimización de codones del gen *env* (cepa FLK-BLV).

El fragmento de ADN de 1215pb que codifica para el precursor proteico Env (comenzando en gp51 sin el péptido señal, finalizando en el aminoácido 437) fue optimizado en el uso de codones para su expresión en células S2 de *Drosophila melanogaster*. Este gen fue sintetizado por la empresa

Genscript (USA Inc) fue enviado en plásmido pUC (pUC-EnvBLV) (**ver anexo tesis**). El gen sintético también contiene 2 sitios de restricción (*Bgl*II en el extremo 5' y *Apal* en el extremo 3') como alternativa al sistema de clonaje empleado en esta tesis (clonaje libre de enzimas de restricción).

Es importante destacar que el fragmento de Env-BLV a clonar corresponde al ectodominio de la proteína esto es la secuencia de gp51 completa (aa 33-nt97 hasta al aa 301-nt903) y sólo la porción extracitoplasmática de gp30 (aa 302-nt 904 hasta el aminoácido 437-nt 1311 sin las regiones TM y CDT), sin el péptido señal.

5.3.1.2. Clonaje del gen *env* optimizado en el plásmido pT350.

Para el clonaje de la secuencia optimizada de *env* en el plásmido pT350 se utilizó el clonaje libre de enzimas de restricción (restriction free-RF- cloning). Asimismo otras 3 construcciones fueron sintetizadas y clonadas en el plásmido pT350 para la expresión de la proteína Env recombinante en células de *D. melanogaster* S2. En total se clonaron 4 construcciones del gen *env* con optimización de codones en el plásmido pT350 (plásmido cedido por F. Rey-Unidad de Virología Estructural, Institut Pasteur de Paris). Este plásmido fue diseñado para la expresión inducible de proteínas recombinantes para su expresión en células S2 a partir de un promotor de metalotioneína (pMT) de *Drosophila*. A su vez posee una señal de exportación BiP (péptido señal perteneciente a *D. melanogaster*) para la traslocación de la proteína recombinante hacia el RE e ingreso en la vía secretoria y para ello se removió el péptido señal perteneciente a la Env de BLV (aa 1-33) verificando que la secuencia de Env quedara en el marco de lectura correcto. Finalmente el plásmido pT350 contiene un sitio de clivaje por enteroquinasa (EK) seguido de un doble strep-tag que permite la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad.

Para generar las construcciones el clonaje se realizó por RF-cloning como se mencionó anteriormente. El protocolo de RF cloning consiste en 2 rondas de amplificación por PCR, una para la síntesis del megaprimer donde se amplifica el gen de interés flanqueado con secuencias pertenecientes al plásmido donde se quiere clonar y la segunda donde se emplea el megaprimer purificado a partir del cual se realiza una PCR lineal empleando como molde el plásmido de interés. Este ADN sintetizado no es circular (queda con un corte) y está en presencia del ADN parental (plásmido empleado como molde). Por lo tanto luego de la segunda PCR se realiza una digestión del ADN parental con *Dpn*I y posteriormente este producto es utilizado para la transformación de bacterias competentes que circularizan y amplifican el ADN perteneciente al plásmido con nuestro gen de interés. El protocolo completo del RF cloning se encuentra en el anexo y se describe brevemente a continuación. En nuestro caso se clonó en primera instancia el gen sintético. Para ello el plásmido pUC-Env-BLV generado por la empresa Genscript fue reconstituido y amplificado para obtener el ADN molde para el RF cloning. A partir de la primer construcción pT350/Env FLK-BLV 33-437wt se realizaron las siguientes como se muestra en la figura 5.1.

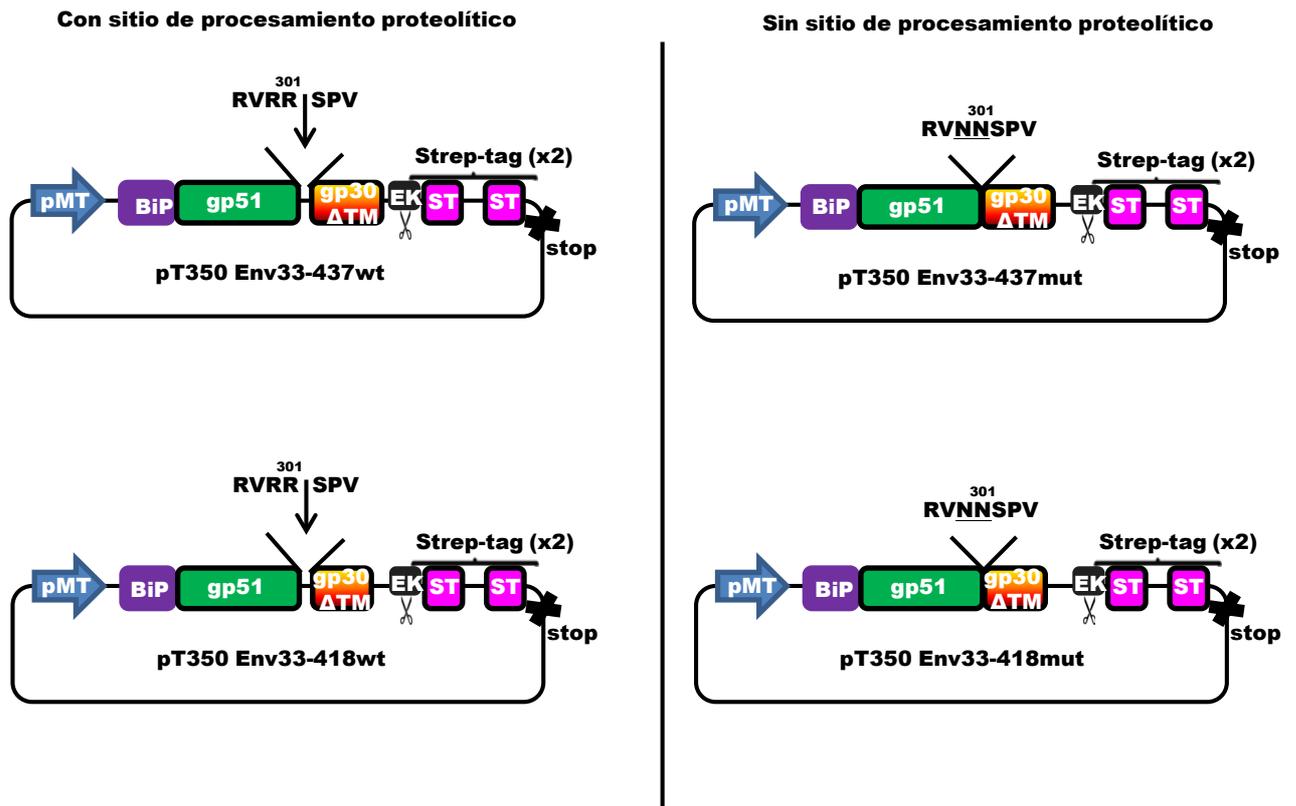


Figura 5.1: Esquema representando las 4 construcciones: pT350Env33-437wt, pT350Env33-418wt, pT350Env33-437mut, pT350Env33-418mut. Se señala el sitio de corte de furinas nativo RVRRSPV y mutante RVNNSPV, el promotor de metalotioneína (pMT), la señal de exportación (BiP), la subunidad gp51 BLV, la subunidad gp30 sin la región transmembrana (Δ TM), el sitio de corte de enterocinas (EK) y el strep-tag doble (ST).

5.3.1.2.1. Reconstitución del plásmido pUC-EnvBLV (33-437), amplificación y purificación del plásmido: El vial conteniendo el plásmido liofilizado (4ug) fue reconstituido agregando 20uL de H₂O estéril (Invitrogen) y calentando a 50°C durante 15 minutos. Un microlitro de ADN (200ng/uL) fue utilizado para transformar bacterias quimiocompetentes mediante shock térmico (ver abajo). El ADN plasmídico se amplificó mediante mini y maxiprep utilizando kits comerciales (Machereil Nagel). Este material se utilizó como ADN molde en la primer PCR para la síntesis de megaprimers para la construcción pT350/Env FLK-BLV 33-437wt.

5.3.1.2.2. RF cloning: Para la síntesis de megaprimers se emplearon en un volumen de reacción final (Vf) de 50uL: 10uL Phusion buffer GC 5x (Finnzymes), 1uL dNTPs (10mM), 2uL de cada uno de los cebadores FOR y REV (ver apéndice 3 anexo tesis), 1uL Phusion DNA polymerase (2U/uL), ADN molde (en este caso pUC-Env-BLV) 50ng y H₂O hasta Vf. El ciclado empleado para esta primera PCR fue el siguiente: desnaturalización inicial a 98°C durante 3min y luego 35 ciclos de: desnaturalización a 98°C durante 30s, hibridación a 60°C durante 1min y extensión a 72°C durante 30s. Finalmente se realizó una extensión final a 72°C durante 10min. Posteriormente los megaprimers fueron purificados a partir de geles de agarosa y se midió la concentración de ADN obtenido por Nanodrop. A continuación estos

megaprimers purificados fueron empleados en la segunda PCR lineal (Vf=50uL): 10uL Phusion buffer HF 5x (Finnzymes), 1uL dNTPs (10mM), 250ng del megaprimer, 1uL Phusion DNA polymerase (2U/uL), 40ng del plásmido donde se quiere clonar (en este caso pT350) y H₂O hasta Vf. El ciclado empleado para la PCR lineal fue el siguiente: desnaturalización inicial a 98°C durante 3min y luego 30 ciclos de: desnaturalización a 98°C durante 30s, hibridación a 60°C durante 1min y extensión a 72°C durante 5min (1min por kb-pT350 tiene aproximadamente 5kb). Finalmente se realizó una extensión final a 72°C durante 10min. Posteriormente se realizó la digestión del ADN parental (molde) agregando 1uL de DpnI (20U/uL-NEB) e incubando 1h a 37°C. En paralelo se realizó un control negativo de digestión conteniendo solamente 40ng de ADN parental, 10uL buffer HF 5x, 1uL DpnI y H₂O hasta un volumen final de 50uL. Finalmente 2uL tanto de la muestra como del control negativo fueron empleados para transformar 50uL de bacterias quimiocompetentes DH5α mediante shock térmico: 30min en hielo; 40s a 42°C; 5min en hielo. Posteriormente se realizó la recuperación de las bacterias agregando 950uL de medio LB incubando 1h a 37°C con agitación para finalmente plaquear en placas de LB-agar-ampicilina. Por cada transformación se plaquearon 100uL y el resto se centrifugó a 8000xg 1min, se removió el LB dejando 100uL que fueron colocados en otra placa. Las placas se colocaron en estufa ON a 37°C.

Los cebadores utilizados para el RF cloning pT350/Env FLK-BLV 33-437wt y pT350/Env FLK-BLV 33-418wt se detallan en el anexo. Esta última construcción se realizó por RF cloning empleando como ADN molde el plásmido pT350/Env FLK-BLV 33-437wt.

5.3.1.3. Mutagénesis dirigida.

La mutagénesis dirigida para eliminar el sitio de procesamiento proteolítico (evitando la separación de las subunidades gp51 y gp30) se realizó por RF cloning empleando los cebadores que se detallan en el anexo. El protocolo es el mismo que se describe arriba excepto la temperatura de hibridación de los cebadores (64-68°C dependiendo de la T_m de los cebadores). Como molde se utilizaron las construcciones pT350/Env FLK-BLV 33-437wt y pT350/Env FLK-BLV 33-418wt a partir de las cuales se generaron pT350/Env FLK-BLV 33-437mut y pT350/Env FLK-BLV 33-418mut, respectivamente.

En resumen las 4 construcciones realizadas fueron las siguientes (**figura 5.1 y anexo tesis**):

- a- **pT350/Env FLK-BLV 33-437wt**: gen del precursor *env* de FLK-BLV optimizado que abarca desde el aminoácido 33 (primer aminoácido de gp51) hasta el aminoácido 437 (último aminoácido del ectodominio de gp30 antes del dominio transmembrana).
- b- **pT350/Env FLK-BLV 33-418wt**: gen del precursor *env* de FLK-BLV optimizado que abarca desde el aminoácido 33 (primer aminoácido de gp51) hasta el aminoácido 418.
- c- **pT350/Env FLK-BLV 33-437mut**: gen del precursor *env* de FLK-BLV optimizado que abarca desde el aminoácido 33 al 437 con remoción del sitio de procesamiento proteolítico (dos mutaciones puntuales: R300N and R301N).

-
- d- pT350/Env FLK-BLV 33-418mut:** gen del precursor *env* de FLK-BLV optimizado que abarca desde el aminoácido 33 al 418 con remoción del sitio de procesamiento proteolítico (dos mutaciones puntuales: R300N and R301N).

Luego del RF clonaje y de la mutagénesis dirigida y antes de continuar con el paso de transfección para la generación de la línea estable, se confirmó por secuenciación de ADN las 4 construcciones (ver anexo tesis). Cada construcción fue secuenciada con los primers MT (For) y BGH (Rev).

5.3.1.4. Propagación de los plásmidos conteniendo las 4 construcciones a ser expresadas en células S2.

Una vez confirmadas las secuencias presentes en las 4 construcciones los plásmidos fueron amplificados. Para ello se transformaron bacterias quimiocompetentes DH5 α . Las transformantes se seleccionaron en placas de LB-agar conteniendo 100ug/mL ampicilina y se guardaron stock de bacterias en glicerol para la conservación de los clones correctos. La purificación de los plásmidos se realizó utilizando el kit comercial QIAGEN Plasmid Midi kit.

5.3.2. Generación de una línea celular estable que exprese la proteína Env-BLV.

Las células Schneider S2 (S2) de *Drosophila* fueron co-transfectadas con los distintos vectores junto con un plásmido que codifica un marcador de selección dominante. Los clones estables de S2 expresando las proteínas Env-BLV (33-437wt, 33-418wt, 33-437mut, 33-418mut) se obtuvieron mediante selección con antibióticos. Luego de la selección las células se adaptaron gradualmente a un medio libre de suero.

5.3.2.1. Crecimiento de células S2 de *Drosophila* (para transfectar)

Las células S2 fueron descongeladas en medio Schneider conteniendo penicilina-estreptomicina (5mL/L) y suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10% (Gibco). Los cultivos fueron incubados en estufa a 28°C en ausencia de CO₂. Las células se subcultivaron cada vez que la densidad celular alcanzó 10-20x10⁶ células/mL y siempre se mantuvo parte del medio condicionado durante el pasaje celular. Para la transfección las células se sembraron con una densidad celular de 5 x 10⁶ células/botella T25.

5.3.2.2. Propagación del plásmido de selección pCoPuro.

Como se mencionó anteriormente las células S2 se co-transfectaron con los distintos vectores y un plásmido de selección que codifica un marcador de selección dominante, puromicina N-acetiltransferasa, que confiere resistencia a la puromicina. Este plásmido de selección, pCoPuro, se propagó en bacterias quimiocompetentes DH5 α . Las transformantes se seleccionaron en placas de LB-agar conteniendo 100ug/mL ampicilina y se guardaron stock de bacterias en glicerol para la conservación de los clones correctos. La purificación de los plásmidos se realizó utilizando el kit comercial QIAGEN Plasmid Midi kit.

5.3.2.3. Preparación de células S2 para la co-transfección.

Las células S2 fueron sembradas a una densidad celular de 5×10^6 células por botella T25. Se prepararon 4 botellas para cada una de las construcciones: **1-pT350/Env FLK-BLV 33-437wt**, **2-pT350/Env FLK-BLV 33-418wt**, **3- pT350/Env FLK-BLV 33-437mut** y **4- pT350/Env FLK-BLV 33-418mut**. Se incluyeron asimismo 2 controles negativos: a-pMT-BiP/V5-MPK7 (cedido por Sofia Horjales)+ pCoPuro (como control negativo del WB) y b- pT350/Env FLK-BLV 33-437wt sin pCoPuro (como control negativo de la selección de antibióticos).

5.3.2.4. Co-transfección de las células S2 con las construcciones pT350env y generación de las líneas estables de S2.

Las diferentes co-transfecciones se realizaron con 2ug de cada una de las construcciones pT350env junto con el plásmido de selección pCoPuro en una relación 20:1 usando el kit comercial de transfección Effectene (según indicaciones del fabricante). Luego de 24hs de cultivo se removió completamente el medio de transfección y se agregó medio de cultivo Schneider's nuevo suplementado con: SFB inactivado al 10% y medio condicionado de las S2 parentales (sin transfectar). Las células S2 son semi adherentes por este motivo durante el cambio de medio si bien la mayoría de las células permanecen adheridas, al colectar el sobrenadante este se centrifuga a 200xg 5 minutos para recuperar la mayor cantidad de células posible y el pellet se resuspende en parte del medio de cultivo antes mencionado. Luego de 72hs después de la transfección se inició el proceso de selección mediante la adición de puromicina (concentración final 6ug/mL). El medio de selección también se agregó en los dos controles. El cambio de medio se realizó cada 5 días y dos semanas luego de la transfección comenzó la amplificación de la línea celular transfectada. En ese momento también se inició la adaptación de las S2 a medio de cultivo libre de proteína (Insect Xpress medium, Lonza) el cual se realizó de forma gradual. Para la propagación celular se comenzó con botellas T25 (2 semanas y media), luego botellas T75 (1 semana) y finalmente botellas T150. En las T150 las células se mantuvieron hasta el inicio de los cultivos de alta densidad para la posterior inducción y expresión de la proteína. En este paso también comenzó el congelamiento de células para su almacenamiento utilizando 90% SFB/medio condicionado y 10% DMSO. Para la propagación de células con alta densidad se sembraron las células S2 transfectadas con medio Xpress nuevo con puromicina (6ug/mL) en frascos Erlenmayer de 250mL en un agitador (Infors) a 25°C y 100rpm. En general la relación S2 transfectadas/Xpress fue de 1:1 para iniciar los cultivos a gran escala teniendo en cuenta que la densidad celular no debe ser menor a 1×10^6 células/mL.

La generación de líneas estables de S2 mediante este procedimiento se llevó a cabo en un período de 4 semanas aproximadamente. Cabe aclarar que las líneas estables que se generan son líneas policlonales. El protocolo utilizando fue cedido por Thomas Krey (Virología Estructural, IP París)^{15, 97, 118}.

*medio condicionado es el medio de cultivo donde las células S2 parentales vienen creciendo, las células S2 requieren de determinados componentes presentes en este medio de cultivo para crecer.

5.3.3. Expresión y purificación de la proteína Env-BLV recombinante.

Las proteínas Env-BLV recombinantes expresadas en células S2 fueron recuperadas a partir del sobrenadante dado que se incluyó un péptido señal de secreción de *Drosophila* (Bip) y asimismo se quitaron los dominios transmembrana y citoplasmático siendo liberada al medio de cultivo como proteína recombinante soluble. Cada una de las construcciones dio lugar a las siguientes proteínas: srEnv-BLVwt (ectodominio completo-33-437 o ectodominio truncado-33-418) y srEnv-BLVmut (ectodominio completo-33-437 o ectodominio truncado-33-418). La elección de expresar las proteínas truncadas se debe a que se reportó la estructura de la región de heptadas aa 316 al 418¹⁴³ y por lo tanto se trataba de una región que había logrado expresarse, esto en caso que no se lograra expresar el ectodominio completo.

La expresión de proteínas y secreción al sobrenadante se indujo por metales divalentes. Las células seleccionadas con alta expresión de proteínas y adaptadas al medio libre de suero fetal bovino fueron crecidas a alta densidad antes de la inducción de la expresión. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad seguida de cromatografía de exclusión molecular. La identidad y pureza de la proteína fue confirmada por espectrometría de masa, cuantificada y concentrada antes de proceder a los ensayos estructurales.

Se ensayaron diversas estrategias para la expresión y purificación de la proteína optimizando las condiciones para obtener un protocolo que permita producir una mayor cantidad de proteína.

5.3.3.1. Inducción de la expresión de proteínas por metales divalentes- Cinética de inducción.

El promotor presente en el vector de expresión pT350, pMT, es un promotor de metalotioneína de *Drosophila melanogaster* el cual es inducible por la presencia de metales divalentes. La inducción se realizó empleando CuSO₄ (500uM) y CdCl₂ (5uM) de modo de comparar y seleccionar el mejor inductor. Mediante el ensayo de cinética de inducción se evaluó la expresión de la proteína Env-BLV a distintos tiempos post-inducción. Inicialmente la cinética de inducción se realizó con construcción **pT350/Env FLK-BLV 33-437wt** Para este ensayo se sembraron 2,5x10⁵ células S2 transfectadas por pocillo de una placa de 24 pocillos, las células se lavaron 2 veces con Xpress previo al sembrado de las mismas en M24 (100xg durante 5 minutos) Una vez sembradas las células se incubaron ON antes de la inducción con CdCl₂ 5µM. Una vez sembradas las células se incubaron ON antes de la inducción con CdCl₂ 5µM. 7, 24, 31, 48, 96 y 120hs post-inducción, las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 10min y para cada pocillo se separó pellet y sobrenadante y se almaceno a -80°C. Como control el mismo ensayo se realizó en ausencia de inductor. Posteriormente el ensayo de cinética de inducción se realizó para **pT350/Env FLK-BLV 33-437mut**. Para este ensayo se sembraron 2,5x10⁵ celulas S2 transfectadas por pocillo de una placa de 24 pocillos luego de lavar las células 4 veces con medio Xpress (100xg durante 5min). Una vez sembradas las células se incubaron ON antes de la inducción con CdCl₂ 5µM. 7, 24, 31, 48, 96 y 120hs post-inducción, las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 10min y para cada pocillo se separó

pellet y sobrenadante y se almacenó a -80°C. Como control el mismo ensayo se realizó en ausencia de inductor.

5.3.3.2. Producción y purificación de la proteína Env-BLV.

Las células S2 de alta expresión seleccionadas y adaptadas a medio libre de proteínas fueron crecidas a alta densidad previo a la inducción de la expresión de la proteína. Para la producción a gran escala de la proteína Env-BLV, las células fueron cultivadas en frascos Erlenmeyer de 250mL e inducidas con CdCl₂ 5μM con una densidad celular de 7-7,5x10⁶ cells/mL. Previo a la purificación se evaluaron la densidad y viabilidad celulares. Originalmente las proteínas fueron purificadas 96hs post-inducción y luego de la optimización este tiempo se redujo a 30hs luego del cual el sobrenadante fue cosechado y centrifugado a 15000xg durante 30 minutos para remover los debris celulares y filtrado empleando un filtro de 0,22μm.

La purificación se realizó por cromatografía de afinidad empleando columnas StrepTrap™ HP (Streptactin superflow GE Healthcare) de 1 y 5mL según indicación del fabricante. El protocolo de partida empleado fue el siguiente: el sobrenadante clarificado y filtrado sin concentrar se cargó en la columna (previo lavado y equilibración de la columna) utilizando bomba peristáltica luego de ajustar el pH con Tris 1M pH 8,5. La columna se lavó con 15CV de buffer TNE (100mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 1mM EDTA) como buffer de unión. La elución se realizó en un paso único con 6CV empleando el buffer de unión conteniendo 2,5mM destiobiotina. La elución se realizó en AKTA (Fast Performance Liquid Chromatography) y las fracciones correspondientes al sobrenadante crudo, flow-through, lavados y eluato se recuperaron y corrieron en geles de poliacrilamida al 12% para SDS-PAGE-Coomasie y WB. Luego de la elución con destiobiotina las columnas se regeneraron con 15 CV de HABA 1mM (ácido 2-4'-hydroxy-benzeneazol benzoic) seguido de un lavado con 30CV de buffer de unión.

Para la optimización de la producción y purificación de las proteínas srEnv-BLVmut y srEnv-BLVwt se realizaron las siguientes modificaciones previo a la cromatografía de afinidad: **i)** el buffer de unión/lavado utilizado fue 10mM Tris pH 8, 150mM NaCl, 1mM EDTA. **ii)** el sobrenadante colectado luego de la clarificación inicial fue concentrado en Vivaflow (valor de corte de la membrana 10kDa): 20x, 8x, 2x y también sin concentración, y posteriormente se le agregó avidina (1/1000) y se ajustó el pH del sobrenadante con Tris 1M pH8 como se mencionó anteriormente. A continuación el sobrenadante concentrado se ultracentrifugó a 20000rpm (Beckman-Coulter) y el sobrenadante se filtró con 0,22μm. **iii)** se escalaron los cultivos a volúmenes de 500mL y 1L para cada producción de proteínas. **iv)** todo el proceso de purificación se realizó en AKTA (avant, purifier o express-GE Healthcare).

Para todas las purificaciones por cromatografía de afinidad las condiciones fueron: flujo 1mL/min (presión límite columna 0,3MPa). La pureza de la proteína se confirmó mediante espectrometría de masa y fue cuantificada por absorción de UV a 280nm y BCA. Finalmente la purificación de las proteínas se mejoró mediante cromatografía de exclusión molecular (en inglés "size

exclusion chromatography” o SEC) utilizando columnas Superdex200 (10/300 y 16/60) y Superosa 6 y el análisis de la estructura oligomérica de las proteínas Env-BLV se realizó a partir de estas columnas como se detalla abajo.

5.3.3.3. Análisis de la expresión de proteínas Env recombinantes mediante SDS-PAGE/WB

La expresión de proteínas correspondiente a cada una de las construcciones de Env fue evaluada en primera instancia mediante análisis por SDS-PAGE/WB (geles de poliacrilamida al 12%) como se describe en el capítulo 4. Como control positivo se incluyeron partículas virales purificadas de BLV (obtenidas según lo descrito en capítulo 4). En algunos casos se emplearon geles precast (Criterio TGX stain free 4-15%, biorad) que se utilizaron con el marcador de peso molecular (precisión plus protein unstained-biorad) y se visualizaron en Gel Doc™ EZ System (biorad), esto se realizó en la plataforma de proteínas recombinantes del IPMON.

5.3.4. Análisis de la estructura oligomérica de la proteína Env-BLV recombinante (caracterización biofísica).

Para determinar el estado oligomérico de las proteínas Env-BLV expresadas se realizaron ensayos de cromatografía de exclusión molecular (SEC) y SEC-MALLS.

5.3.4.1. Cromatografía de exclusión molecular (SEC).

La cromatografía de exclusión molecular se realizó en diversas columnas de alta performance Superdex 200 10/300 GL y 16/60 (Hiload) así como superosa 6 para resolver mejor las especies oligoméricas de mayor peso molecular. En general las condiciones de la SEC fueron flujo 1mL/min y la presión límite de las columnas de 0,5MPa. El buffer de SEC utilizado (excepto para ensayos de fuerza iónica y pH) contenía únicamente 10mM Tris pH8 y 150mM NaCl.

5.3.4.2. SEC-MALLS

El ensayo de SEC-MALLS permitió caracterizar el comportamiento en solución de las proteínas recombinantes solubles Env-BLV y determinar el estado de oligomerización así como el peso molecular de las especies presentes. La monodispersión de cada muestra se evaluó mediante “Multiangle laser light scattering (MALLS) conectado en línea con una columna de cromatografía de exclusión molecular. Se emplearon volúmenes de 50, 100 o 200uL de proteína purificada srEnv-BLVmut o srEnv-BLVwt correspondientes al monómero o trímero para realizar una SEC utilizando una columna Superdex 200 10/300 (GE Healthcare) equilibrada con 10mM Tris/HCl a pH 8.0 conteniendo 150mM NaCl. Los buffers empleados en esta técnica fueron filtrados con filtros de 0,1um (Millipore). Las separaciones se realizaron a 20°C con un flujo de 0,4mL/min. El MALLS se realizó en un detector DAWN-HELEOS II (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA) utilizando un láser que emite a 690nm. Asimismo la medida del índice de refracción diferencial se realizó en línea (igual que la detección de MALLS) utilizando un

detector Optilab T-rEX (Wyatt Technology). Los datos fueron inicialmente analizados empleando el programa ASTRA (Wyatt Technology) para calcular las masas molares promedio (M_w) así como la distribución de masa (polidispersión) para cada muestra.

5.3.4.3. Evaluación del estado oligomérico de Env-BLV recombinante en distintas condiciones de pH, fuerza iónica y concentración.

Para evaluar las condiciones de pH se emplearon los buffers acetato de sodio (pH4,5), MES (pH6) y TNE (pH8) todos con la misma fuerza iónica (150mM NaCl). La contribución de la fuerza iónica a la estabilidad de las especies oligoméricas se realizó empleando 300mM de NaCl en buffer conteniendo 10mM Tris. Con respecto a la concentración de la proteína se concentró a 10mg/mL y a su vez se analizó como forma de conservación de la proteína congelarla a -80°C con o sin aditivos (glicerol al 10 y 50%). Finalmente las diversas condiciones se evaluaron por SEC empleando una Sx200 10/300 y en el caso de fuerza iónica SEC-MALLS.

5.3.5. Caracterización bioquímica de la Env-BLV recombinante: Determinación del peso molecular e identificación de la proteína.

El análisis bioquímico de la proteína Env purificada se realizó por espectrometría de masa y SEC-MALLS

5.3.5.1. Determinación del peso molecular de la proteína Env-BLV mediante espectrometría de masa y SEC-MALLS.

Para la identificación inicial de la proteína por espectrometría de masa la misma se extrajo de geles 1D con los métodos que se describen en la estrategia experimental del capítulo 4. Por su parte para el SEC-MALLS se partió de la proteína previamente purificada por SEC (16/60, 10/300 y superosa) de la cual se separaron y “poolearon” las especies moleculares más homogéneas y purificadas y se evaluaron por SEC-MALLS como se detalla arriba con el fin de establecer el peso molecular de las mismas.

5.3.5.2. Contribución de los puentes disulfuro a la formación de oligómeros.

Para analizar la influencia de los puentes disulfuro en la estabilidad de los oligómeros se realizó SDS-PAGE y SDS-PAGE/WB tanto en condiciones de reducción (con β -mercaptoetanol) o sin reducción (sin β -mercaptoetanol). El agregado del reductor se realizó durante la preparación de la proteína con el buffer de muestra. En todos los casos la proteína fue previamente desnaturalizada y se empleó proteína obtenida de la afinidad así como especies oligoméricas particulares (trímero).

5.3.6. Caracterización estructural de la glicoproteína Env-BLV recombinante. Ensayos de cristalización a partir de la proteína purificada Env-BLV recombinante.

Las condiciones de cristalogénesis de la proteína Env-BLV fueron analizadas en una plataforma robótica. Para ello se seleccionaron las fracciones de proteína purificada conteniendo especies oligoméricas discretas (monómero o trímero) previamente analizadas por SEC-MALLS, concentradas a 8-10mg/mL (en general se envían dos concentraciones diferentes) en volumen suficiente para ser analizado por los 6 kits de la plataforma robótica (se describen abajo). Previo al envío de las muestras se realizó un test de cristalización (PCT) para evaluar la concentración de proteína a enviar y en qué condiciones de precipitante y/o sales sería más probable encontrar formación de cristales (PCT Hampton Research) dado que utiliza reactivos conteniendo sulfato de amonio o PEG.

Los ensayos de cristalogénesis se realizaron en la plataforma de Cristalografía de Rayos X perteneciente al Institut Pasteur de Paris (Proteopole). Para ello las proteínas purificadas y concentradas fueron sometidas a screening para cristalogénesis utilizando un robot Mosquito para cristalización de nanogotas empleando volúmenes variables de 100-1000nL por el método de “gota sentada” (sitting drop). El método de cristalogénesis empleado fue el de difusión de vapor en el cual pequeños volúmenes de precipitante y proteína se mezclan y la gota que se forma se equilibra contra un gran reservorio de solución conteniendo precipitante y otro agente deshidratante. Por el método de difusión de vapor se busca causar una precipitación controlada de la proteína. Se emplearon 6 kits de los que están disponibles en la plataforma, y se emplearon 40uL de la proteína purificada y concentrada (concentración elegida) para cada uno de los kits (gotas de 200nL). La concentración de proteína fue variada entre 8-11mg/mL para la Env trimérica tanto wt como mutante y 7mg/mL de proteína Env monomérica. El screening inicial se compone de 6 placas de 96 condiciones diferentes es decir 576 soluciones diferentes. El screening de base se compone de los kits Crystal Screen 1 et 2 (Hampton), Wizard 1 et 2 (Emerald Biosystems), Structure Screen 1 et 2 (Molecular Dimensions limited), JBS 1-4 (Jena Bioscience), JBS 5-8 (Jena Bioscience) y PEGion/Cryo (Hampton).

5.3.7. Análisis de las propiedades antigénicas de la proteína purificada Env-BLV recombinante.

5.3.7.1. Optimización de ELISA con sueros bovinos seropositivos y seronegativos para BLV.

La proteína srEnv-BLVmut fue empleada como antígeno en la técnica de ELISA utilizando placas de 96 pocillos Nunc-Maxisorp para evaluar la reactividad de sueros seropositivos y seronegativos para BLV (esta determinación se realizó previamente por el kit comercial de ELISA –VMRD- así como por PCR y qPCR²¹⁵). Los pocillos se sensibilizaron con 5µg/mL de proteína por pocillo (5µg/well) diluida en buffer carbonato/bicarbonato (pH9) toda la noche a 4°C. Se lavó con PBS-Tw20 0,1% (5 veces). Los pocillos se saturaron luego con PBS-leche 5%-Tw20 0,2% durante 1 hora a 37C. Se repitió el mismo esquema de lavado y se incubaron con 100µL de los sueros de campo diluidos 1/500, positivos: 677, 730 y negativos: 656 y 659 durante 1h a 37°C diluidos en PBS-leche 5%-Tw20 0,2%. A su vez se incubaron pocillos con suero de ratones inmunizados con la proteína srEnv-BLVmut recombinante (suero policlonal Env3 como

se describió en el capítulo 2 de la tesis) diluida 1:5000 así como con el anticuerpo monoclonal BLV1 (VMRD, USA) dirigido contra un epítopo conformacional de gp51 (diluido 1:1000) ambos diluidos en PBS-leche 5%-Tw20 0,2% durante 1h a 37C. Se repitió el mismo esquema de lavado y los pocillos se incubaron con 100µL del conjugado correspondiente: anti-bovino HRP (1:10000) o anti-ratón HRP (1:5000) diluidos en PBS-leche 5%-Tw20 0,2% durante 45min a RT. Finalmente se lavó la placa 5 veces con PBS-Tw20 0,1% y la reacción se reveló con el sustrato TMB (8.7ug/mL) en buffer acetato 0.1M pH 5. El desarrollo de color se detuvo empleando H₂SO₄ 3N y se midió la absorbancia a 450nm (Multiskan FC Microplate Reader Thermo Scientific). Este protocolo se utiliza en el capítulo 6 con la proteína glicosilada y deglicosilada ampliando la cantidad de sueros bovinos.

5.3.7.2. Análisis por SDS-PAGE/WB empleando suero murino de ratones inmunizados con la proteína srEnv-BLVmut.

Para el ensayo con ratones (que no es objetivo de esta tesis sino del trabajo realizado por el Dr. Bianchi) la proteína fue desalada previo a la inoculación. Un grupo de 5 ratones BALB/c de 6 semanas de edad fueron inmunizados de acuerdo a protocolo clásico de inmunización: inyectado por vía subcutánea 50 ug de proteína con adyuvante completo de Freund para la primera inmunización, seguido de inyecciones de la misma cantidad de proteína pero con adyuvante incompleto de Freund en intervalos de 15 días. Se realizaron sangrados con el objetivo de evaluar el título de anticuerpos específicos, y al finalizar la inmunización el suero obtenido fue empleado para ensayos de WB contra la proteína Env-BLV recombinante mutante y wt.

5.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo involucró la producción del ectodominio de la proteína Env-BLV (eliminando la región transmembrana, TM, y la cola citosólica C-terminal) en células de *Drosophila* S2. La proteína Env-BLV fue truncada inmediatamente corriente arriba del segmento TM. El plásmido de expresión incluye un péptido señal BiP perteneciente a *Drosophila* que sustituye el péptido señal autólogo de BLV permitiendo una eficiente traslocación de la glicoproteína naciente hacia el retículo endoplásmico (RE) en la célula transfectada y su posterior secreción al medio de cultivo. A nivel de la secuencia codificante para Env-BLV realizamos 4 construcciones diferentes: las primeras incluyen la secuencia aminoacídica natural correspondiente al sitio de procesamiento proteolítico por furina lo cual nos permite producir el ectodominio de la proteína en su estado nativo dando lugar a las subunidades gp51-gp30. En el caso de que el complejo maduro fuera inestable se diseñó una construcción que impidiera el reconocimiento natural por furina (eliminando la secuencia RR presente en el sitio). Esto permitió expresar la poliproteína sin el procesamiento proteolítico correspondiente. Este tipo de mutaciones buscar inmovilizar la proteína en una conformación prefusión evitando el procesamiento proteolítico de la proteína. Este tipo de abordaje ha sido utilizado para expresar precursores de proteínas de fusión

virales^{272, 285}. Para el precursor de Env perteneciente a HIV-1 (gp160) la estrategia empleada ha sido “fijar” la proteína en un estado prefusión mediante la incorporación de un puente disulfuro artefactual que mantenga unida ambas subunidades¹²².

En el extremo C-terminal el plásmido codifica para una secuencia aminoacídica denominada strep-tag lo cual permite la eficiente purificación de la glicoproteína por cromatografía de afinidad a partir de sobrenadante de cultivo celular. Para ambas construcciones el gen *env* de BLV fue completamente sintetizado químicamente lo cual nos permitió optimizar el uso de codones para que la producción en *Drosophila* tuviera una eficiencia máxima.

La optimización de codones para la expresión en células S2 de *Drosophila melanogaster* fue realizada por la empresa Genscript sintetizando el gen Env-BLV utilizando la secuencia de la cepa FLK-BLV (ver anexo). Este gen sintético se clonó en el vector pT350 mediante clonaje libre de enzimas de restricción. Las primeras construcciones realizadas fueron pT350/Env FLK-BLV 33-437wt y pT350/Env FLK-BLV 33-418wt, empleando los cebadores correspondientes (ver anexo) y cuya síntesis de megaprimers se observa en la **Figura 5.2**.

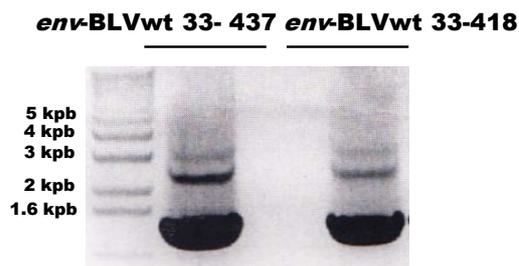
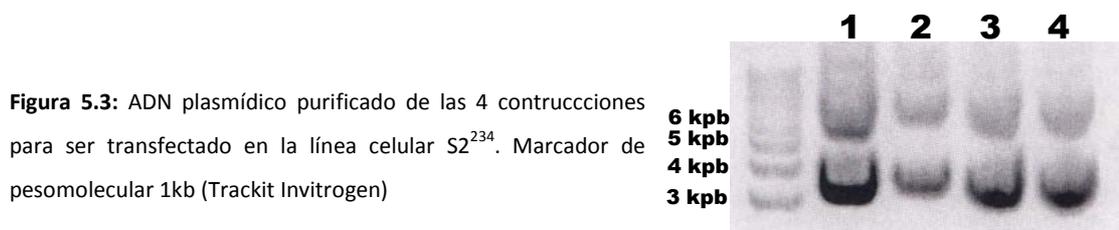


Figura 5.2: Síntesis de megaprimers para las construcciones pT350 pT350/Env FLK-BLV 33-437wt y pT350/Env FLK-BLV 33-418wt. Marcador de pesomolecular 1kb (Trackit Invitrogen)

A partir de estas construcciones se generaron los vectores conteniendo la versión mutada del gen *env* para el sitio de furina dando lugar a los plásmidos: pT350/Env FLK-BLV 33-437mut y pT350/Env FLK-BLV 33-418mut. Las cuatro construcciones fueron secuenciadas para confirmar la correcta inserción de los genes *env* (wt y mut) y propagadas a gran escala (midi o maxiprep) en bacterias DH5 α para obtener cantidad de ADN plásmidico suficiente para la transfección (**Figura 5.3**).



Las células S2 fueron transfectadas según protocolo descrito en estrategia experimental y posteriormente suplementadas con puromicina de forma de seleccionar la población de células

resistentes conteniendo tanto el plásmido de selección (pCoPuro) como nuestro plásmido de interés generando una línea estable policlonal para cada construcción (**Figura 5.4**).

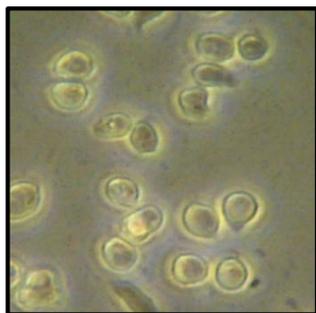


Figura 5.4: Células S2 pertenecientes a la línea estable transfectada con la construcción pT350/Env FLK-BLV 33-437mut.

Los estudios biofísicos, bioquímicos y estructurales requieren gran cantidad de proteína la cual debe ser estable y homogénea. En este sentido varios trabajos emplearon líneas de células de mamífero, en particular HEK293 modificadas ya que son deficientes para la N-acetilglucosaminil transferasa I (GnTI) limitando y homogeneizando la glicosilación^{9, 47}. Esta línea celular se denominó HEK293S GnTI(-) y ha sido utilizada para la expresión de proteínas humanas pero también para la expresión de una gran cantidad de glicoproteínas virales⁵⁸ entre la que se destaca la de HIV-1¹²². Por otro lado está el sistema de producción empleando células de insecto, clásicamente las células de insecto Sf9. Sin embargo la desventaja principal radica en la dependencia de altos títulos virales para la infección de estas células con baculovirus y la dependencia de un ciclo lítico para la producción de proteínas.

La elección de las células S2 de *Drosophila* presenta varias ventajas entre las que se encuentran la cantidad de proteína obtenida gracias a la elevada densidad celular que pueden alcanzar, el establecimiento de líneas estables que permanezcan en buen estado durante todo el proceso de expresión, que puedan ser inducibles y secretadas al sobrenadante. Si bien la glicosilación es más simple que en mamífero esta característica favorece el abordaje estructural de este tipo de proteínas. De hecho la producción con este tipo de sistema semeja al de las células de mamífero HEK293S GnTI(-) y a pesar de que siempre sería conveniente expresar proteínas en sistemas análogos (esto es mamífero) se ha demostrado que no existen diferencias sustanciales entre la calidad, expresión y producción de proteínas en HEK293S GnTI(-) vs células S2 (T. Krey comunicación personal, 2014) dado que las HEK293S GnTI(-) producen proteínas con una glicosilación similar (glicanos oligomanosídicos).

La expresión se evaluó en primera instancia mediante la inducción con CuSO_4 (500 μM) y CdCl_2 (5 μM) de modo de establecer el mejor metal divalente para la expresión de los constructos de Env-BLV. Esta primera prueba de inducción, donde se emplearon todas las construcciones, se realizó de forma preliminar, previo a la adaptación de las células al medio libre de proteínas. Luego de 72 hs post-inducción se evaluó la expresión de las 4 construcciones por SDS-PAGE/WB tanto en sobrenadante y pellet, en condiciones de reducción y desnaturalización (20 μL de cada muestra fue cargada en los geles).

Como se observa en la **figura 5.5** las líneas estables S2 generadas a partir de las 4 construcciones expresaban la proteína recombinante de forma soluble. Este resultado es muy relevante dado que es difícil la expresión de este tipo de proteínas y ha sido difícil lograrlo también para BLV¹⁸³.

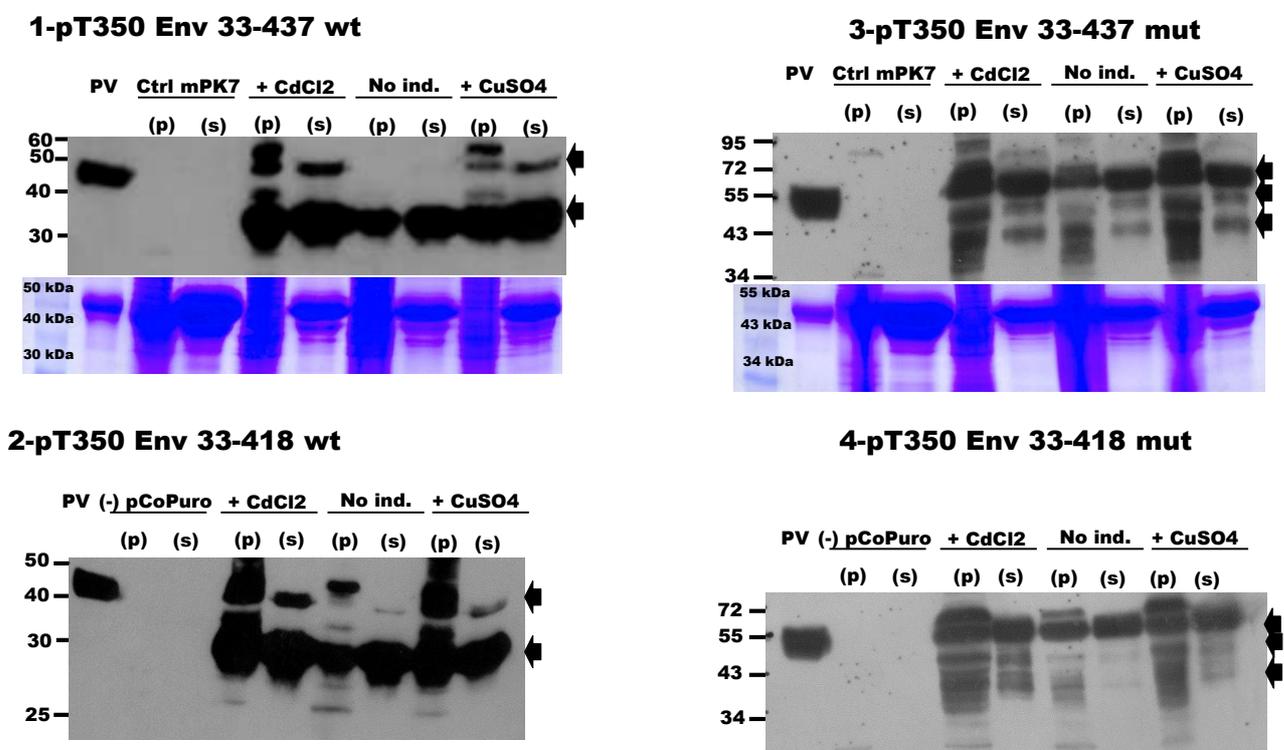


Figura 5.5: SDS-PAGE (Coomasie/WB) para las líneas estables expresando las 4 construcciones correspondientes a la proteína wt (1 y 2) y mutante (3 y 4). Las muestras corresponden a sobrenadante (s) y pellet (p) obtenidos 72hs post-inducción luego del agregado del inductor CdCl₂ o CuSO₄ y fueron reducidas con βMe, como control positivo se incluyó una muestra de partículas virales purificadas (PV) y como controles negativos muestras de sobrenadante y pellet correspondientes a líneas estables de S2 sin el plasmido de selección -pCoPuro o expresando la proteína mPK7. El AcMo utilizado BLV2 está dirigido contra gp51. La inducción de la expresión se realizó sin haber completado la adaptación completa con Xpress por lo que se evidencia la presencia de BSA del SFB del medio de cultivo Schneider's.

Para las construcciones 1 y 2 se observó ya sea en condiciones de inducción (con CuSO₄ o CdCl₂) o no inducción la presencia de una banda a la altura de 30KDa de alta expresión. Si la proteína había sido inducida (con CuSO₄ o CdCl₂) aparecía junto con la banda a 30KDa una banda correspondiente a 50-55KDa que coincidía con el control positivo. En el caso de las construcciones 3 y 4 la banda de mayor reactividad es un poco mayor a 55KDa. En estas construcciones no se observan diferencias en cuanto a la expresión ya sea en muestras inducidas y sin inducir ya que la banda mayoritaria sigue siendo la de 55KDa. Recordar que las construcciones 1 y 2 poseen sitio de procesamiento proteolítico y las construcciones 3 y 4 tienen mutado este sitio. Con respecto al inductor aparentemente el CdCl₂ sería un mejor inductor aunque la diferencia es sutil. En el SDS-PAGE/Coomasie correspondiente a las

construcciones 1 y 3 (wt y mut, respectivamente) se observa la banda correspondiente a la BSA (60KDa aprox) dado que estos cultivos aun no han sido adaptados a medio sin proteínas y contienen SFB.

Con el fin de obtener la mejor relación cantidad/calidad de proteína se realizaron ensayos de inducción con CdCl₂ (que fue el metal divalente elegido como inductor) para las proteínas wt y mut con el ectodominio completo (aa 33-437). Este ensayo se realizó con el fin de: a)- confirmar la existencia de expresión basal de proteínas Env-BLV sin inducción, b)- analizar el tiempo post-inducción necesario para alcanzar la mejor expresión de la proteína y c)- en el caso de la construcción pT350 Env 33-437 wt si la banda de 30KDa aparecía como producto de degradación en cultivos de larga duración o si era sintetizada en los primeros tiempos post-inducción. Con respecto a la proteína derivada de la construcción pT350 Env 33-437 wt se pudo observar la banda de 55KDa en todas las muestras analizadas pero la reactividad fue más elevada en aquellas inducidas. En este ensayo se observó que el máximo nivel de expresión era a las 96hs post-inducción y que la banda de 30kDa aparecía en las etapas iniciales post-inducción. Para la Env wt creemos que al poseer el sitio de furina “activo” esta proteína se encuentra en un estado metaestable pudiendo ser activada de diversas formas lo cual ocasionaría un cambio conformacional en la proteína separando las subunidades y de modo de exponer el péptido de fusión, lo cual explica la banda que se observa a 30KDa (gp51) dado que el SDS-PAGE/WB se realizó en condiciones de reducción separando gp51 de gp30+strep-tag y sólo contamos con anticuerpos dirigidos contra gp51. Por otro lado la aparición de la banda a 55KDa como resultado de la inducción podría obedecer al hecho de que la inducción genera un aumento en la tasa de expresión bastante elevado y dado que estas proteínas ya presentan un nivel de expresión basal elevado de alguna manera podrían “saturar” el sistema en lo que respecta al procesamiento proteolítico de la proteína generando especies “inmaduras” que no pudieron ser clivadas.

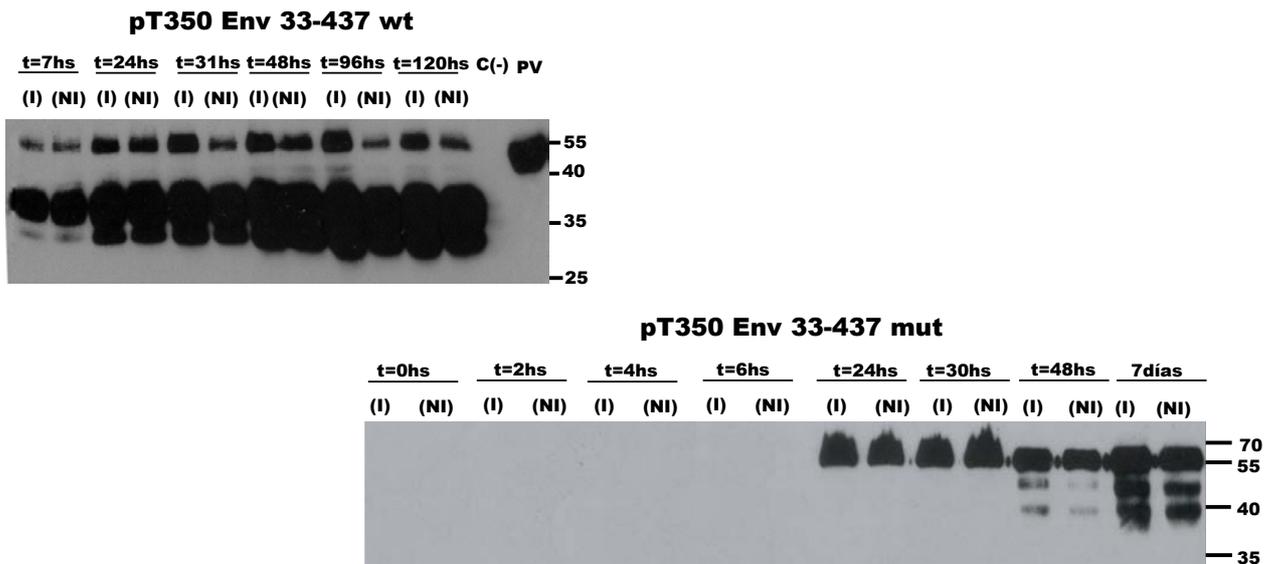


Figura 5.6: Ensayo de cinética de inducción. Se evaluó la expresión de srEnv-BLV wt y srEnv-BLVmut mediante SDS-PAGE/WB (α -gp51) en sobrenadante de células S2 transfectadas con cada una de las construcciones a distintos tiempos en presencia y ausencia de inductor (5 μ M CdCl₂). Para la Env-BLV wt se observa una banda mayoritaria de >35kDa mientras que para Env-BLV mut es de 55kDa. Ambas se expresan en ausencia de inductor y con el tiempo aparecen productos de degradación en ambas líneas transfectadas.

Sin embargo posteriormente el ensayo se realizó con la construcción pT350 Env 33-437 mut y de hecho se demostró que la expresión óptima se logra a las 30hs post-inducción. Por este motivo se eligió este tiempo dado que ambas construcciones presentaban alta expresión en este tiempo. Cabe destacar que este tiempo es extremadamente corto para los protocolos de expresión de proteínas que existen empleando el sistema de expresión de *Drosophila*. En estos trabajos^{15, 97, 118} las diversas proteínas logran su máximo de expresión entre los 7 y los 10 días algunas requieren mayor tiempo (**Figura 5.6**).

Si bien se comprobó la expresión de la proteína Env-BLV recombinante soluble a partir de las líneas estables correspondientes a las 4 construcciones evaluadas (**Figura 5.1**) el resto de los ensayos del trabajo se realizaron utilizando únicamente aquellas construcciones que abarcaban todo el ectodominio de la proteína: pT350/Env FLK-BLV 33-437wt y pT350/Env FLK-BLV 33-437mut dando lugar a las proteínas srEnv-BLVwt y srEnv-BLVmut, respectivamente (donde “s” = soluble y “r”=recombinante siendo esta la nomenclatura que se encontrará a partir de ahora para mencionar estas proteínas).

Estas líneas estables se adaptaron a medio libre de proteínas (Xpress) y posteriormente los cultivos se escalaron (cultivos de alta densidad celular) en condiciones de agitación y temperatura antes de la inducción de la proteína con CdCl₂ 5 μ M.

El sobrenadante de estos cultivos a gran escala (con volúmenes de 250, 500 o 1000mL) fue colectado con tiempos post-inducción iniciales de 72-96hs pero luego del ensayo de cinética de inducción se evidenció que este tiempo podía ser bastante menor (30hs) y que incluso como se demostró en los ensayos de expresión preliminares la proteína podía expresarse en ausencia de

inductor (**figuras 5.5 y 5.6**). Este comportamiento de obtener expresión en altas concentraciones en ausencia de inductor fue una característica propia de nuestras construcciones y del sistema de expresión dado que reiterados eventos independientes de transfección daban lugar al mismo comportamiento. Creemos que el sitio de inserción podría actuar sobre el promotor pMT volviéndolo un promotor de expresión constitutiva en lugar de inducible, si bien es cierto que la inducción aumenta la expresión de proteína. Este no parece ser un “leakage” de expresión, es más que ello, lo cual podría resultar en un problema a la hora de la producción si la proteína resultara tóxica para las células hecho que no ocurre en nuestro caso.

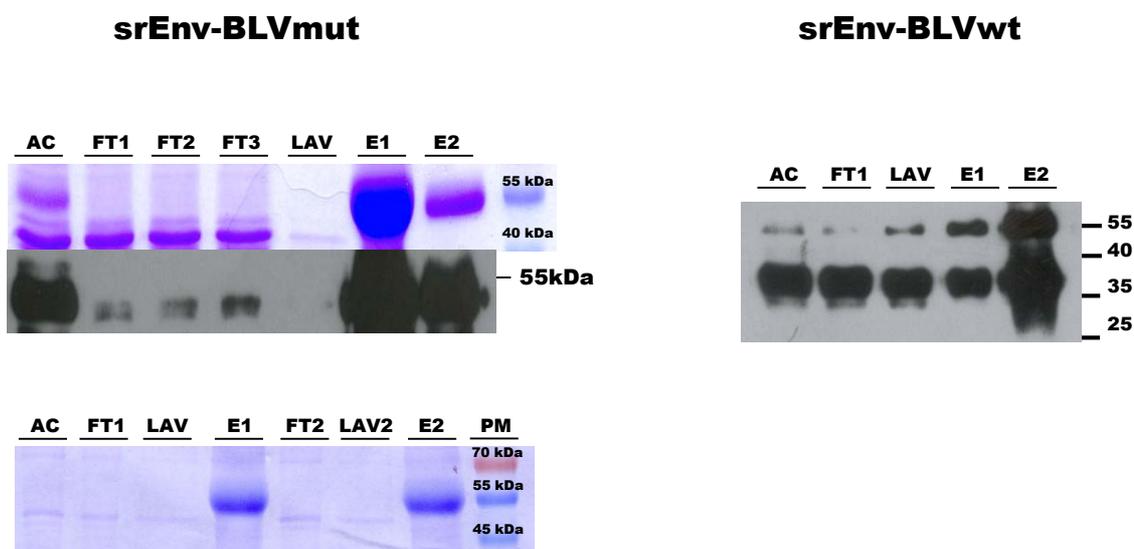


Figura 5.7: Las fracciones obtenidas de la purificación por cromatografía de afinidad de srEnv-BLV mut y srEnv-BLVwt se evaluaron mediante SDS-PAGE (Coomasie/WB). Para la expresión de las proteínas se utilizó CdCl₂ 5uM como inductor durante 96hs. AC: antecolumna, FT1-3: “flowthrough”, LAV: lavado, E1-2: eluato. PM: marcador de peso molecular Page Ruler (Fermentas). AcMo: BLV2 (α-gp51).

La purificación se realizó para ambas proteínas las cuales se identificaron mediante SDS-PAGE/WB empleando el anticuerpo monoclonal BLV2 dirigido contra la gp51. Como se visualiza en la **figura 5.7** la proteína srEnv-BLVmut se purificó correctamente dado que prácticamente permanece retenida en la columna de afinidad hasta el momento de la elución (ver **figura 5.7** SDS-PAGE/coomasie y SDS-PAGE/WB). Esto no ocurre de igual forma con la proteína srEnv-BLVwt dado que si bien la proteína se retiene y eluye con un aumento en la concentración de la misma en esta fracción también aparece proteína en el flowthrough y el lavado (WB). La identificación de la proteína recombinante expresada srEnv-BLVmut se realizó mediante espectrometría de masa (**figura 6.10**) donde se confirma la identidad

de la proteína con un 60% de cobertura en total de secuencia y más de un 80% cuando la proteína es deglicosilada con PNGaseF. Finalmente como parte fundamental en la caracterización bioquímica de esta glicoproteína viral realizamos el estudio glicoproteómico de la proteína srEnv-BLVmut. Estos resultados se encuentran en el capítulo 6 de la tesis. En promedio el rendimiento obtenido para esta proteína a partir del sobrenadante de cultivo luego de la purificación osciló entre 11-17mg/L resultando en un rendimiento realmente elevado para este tipo de proteínas. Cabe destacar que esta es la primera vez que se expresa la proteína Env de BLV con alto rendimiento en un sistema de expresión eucariota.

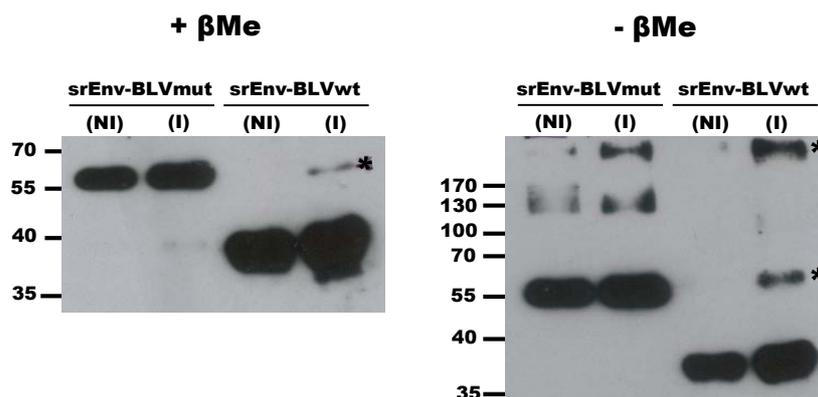


Figura 5.8: Análisis de la expresión de las proteínas srEnv-BLVwt y srEnv-BLVmut en condiciones de inducción +CdCl₂ 5uM (I)/no inducción (NI) y reducción/no reducción (β-Me). Los asteriscos representan bandas diferenciales que aparecen en la proteína srEnv-BLVwt.

Asimismo se evaluó la contribución de los puentes disulfuro en la proteína recombinante con el fin de establecer si la misma presentaba formación de puentes disulfuro artefactuales que contribuyeran al estado de oligomerización de la proteína. Para ello se evaluó el comportamiento de las proteínas srEnv-BLVwt y mut en condiciones de reducción y no reducción por SDS-PAGE/WB (**figura 5.8**). Como se puede observar la proteína srEnv-BLVwt presenta una banda a 30KDa que está presente en ambas condiciones (con o sin β-ME), ya sea en presencia o ausencia de inductor. Como se mencionó anteriormente la banda a 55KDa aparece cuando la proteína es inducida ya sea en presencia o ausencia de reductor. Sin embargo con la proteína inducida en ausencia de β-ME se observa una especie molecular mayor a 170KDa lo que podría evidenciar la existencia de puentes disulfuro artefactuales. Para la proteína srEnv-BLVmut se observaron 2 bandas en condiciones de no reducción, una de 55KDa y la otra de mayor peso molecular independientemente que la proteína haya sido inducida o no. La banda de mayor peso molecular desaparece en condiciones de reducción mientras que la de 55KDa permanece. Nuevamente en este caso la banda de mayor peso molecular podría aparecer como resultado de puentes disulfuro intermonómero o podría ser resultado de agregados unidos mediante puentes disulfuro correspondientes a una proteína mal plegada. A pesar de que en estas construcciones el sitio de furina había sido mutado, la Cys 212 reactiva permanece inalterada pudiendo formar puentes

disulfuro artefactuales al ser activada la proteína a pesar de que ambas subunidades permanezcan unidas por la mutación.

Una vez obtenidas las proteínas Env recombinantes purificadas mediante cromatografía de afinidad se comenzó la caracterización biofísica de la proteína (**figura 5.9**). Esta caracterización implicó la determinación del estado de oligomerización de la proteína purificada mediante SEC ("size exclusión

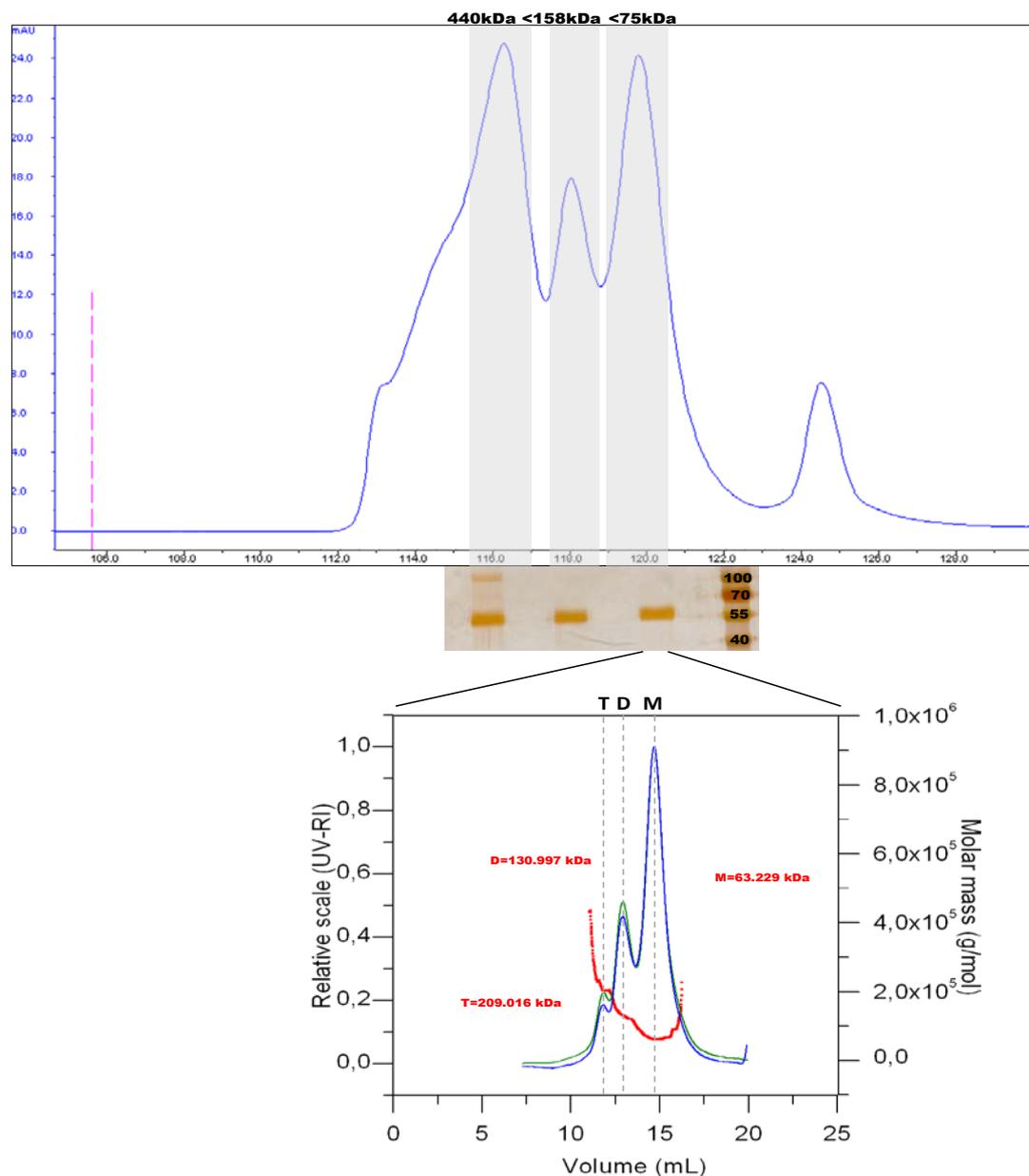


Figura 5.9: Estado de oligomerización y estabilidad de las especies purificadas por cromatografía de exclusión molecular (SEC) empleando una columna Superdex 200 10/300 GL (arriba). Las especies obtenidas (delimitadas por franjas grises) fueron analizadas por SDS-PAGE/AgNO₃ en condiciones de reducción (medio). SEC-MALLS (abajo) de la especie molecular correspondiente al monómero [η]=0.85mg/mL, se muestra en el eje de las y a la izquierda los valores de UV y RI en escala relativa de -0,1 a 1,1 (graficado como línea verde-UV- y línea azul-RI-) mientras que el eje de las y a la derecha indica la masa molecular expresada en g/mol (kDa). Esta masa fue determinada por el perfil de "scattering" en múltiples ángulos medido cada segundo a lo largo del pico de elución del monómero y se indica con un punto rojo que en el gráfico aparecen como una línea continua. La masa

chromatography”) y SEC-MALLS (SEC-Multi Angle Laser Light Scattering).

En la **figura 5.9** se observa el esquema de purificación de srEnv-BLVmut. Esta proteína fue purificada a partir de 250mL de sobrenadante de cultivo inducido durante 30hs con CdCl₂ 5μM. La cromatografía de afinidad se realizó sin concentración previa del sobrenadante y sin agregado de avidina previo a la afinidad y se obtuvo un pico de elución único y definido. La proteína srEnv-BLVmut purificada se corrió posteriormente en una SEC empleando una Sx200 10/300. Se obtuvieron 3 picos que aunque no están completamente definidos igualmente es posible señalarlos, y los volúmenes a los cuales estos picos eluyen corresponden a especies moleculares de aproximadamente 440, 158 y 75KDa (correspondientes a oligómeros de mayor peso molecular, trímero y monómero) teniendo en cuenta la calibración de la columna. Este hábito se mantuvo para todas las purificaciones por cromatografía de exclusión molecular utilizando las columnas Sx200 10/300 GL o Hiloal Sx200 16/60 y coinciden exactamente con los resultados obtenidos para la TM-BLV donde se encontró monómero, trímero y un oligomero de mayor peso molecular y de la cual se resolvió la estructura¹⁴⁴. Estos estados oligoméricos son estables ya que permanecen inalterados al purificarse de forma individual (**figura 5.9**).

Luego de la SEC las fracciones correspondientes al monómero se *pool*earon y concentraron a 0,85mg/mL para analizarlas por SEC-MALLS (se corrieron 85ug de proteína, **figura 5.9**). Cabe destacar que el pico correspondiente al monómero seleccionado no estaba bien definido y es posible que otras especies moleculares de mayor tamaño también se encontraran en el *pool*. El análisis del SEC-MALLS revela que la fracción correspondiente al *pool* “monomérico” presenta 3 especies oligoméricas con picos correspondientes a 209.016, 130.997 y 63.229kDa compatibles con trímero, dímero y monómero respectivamente. Las líneas grises verticales discontinuas marcan el volumen de elución del trímero (T), del dímero (D) y del monómero (M). Esto podría revelar que se trata de una fracción que no es homogénea y las especies podrían estar en equilibrio con un equilibrio desplazado hacia la formación de oligómeros de mayor peso molecular.

Con el fin de mejorar la purificación de especies oligoméricas discretas, en particular trímero y monómero se buscó aumentar la cantidad de proteína y mejorar la separación de las especies con el fin de obtener versiones más puras de la proteína para la cristalización. Por este motivo se realizaron escalados de cultivos en los cuales se sumó el agregado de avidina (para eliminar la biotina del medio, que afecta la columna de afinidad y por consiguiente la purificación) y la concentración de los cultivos.

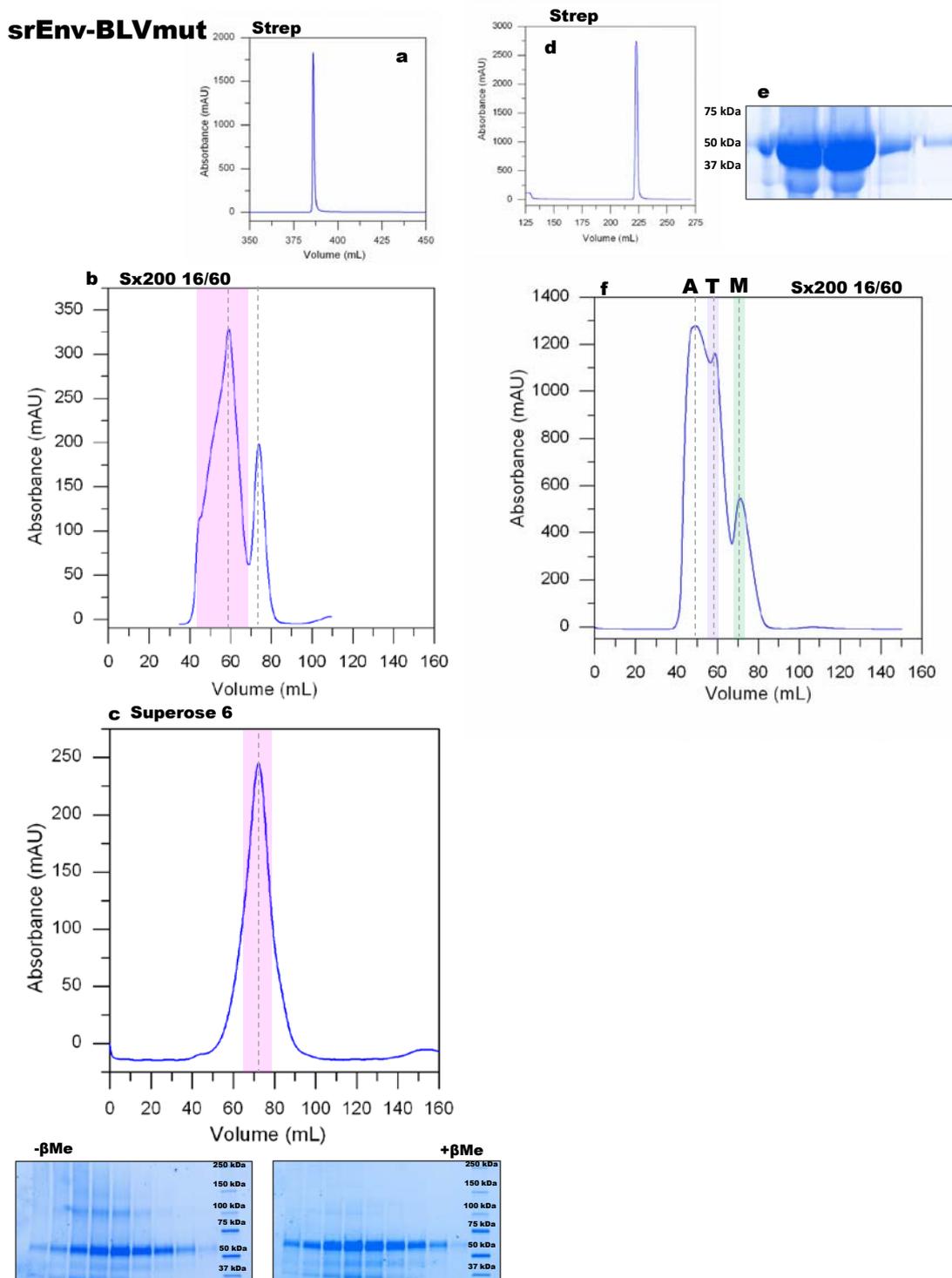


Figura 5.10: Comparación de esquema de purificación de la proteína srENV-BLVmut a partir de 250mL sobrenadante sin concentrar (izq) vs 1000mL sobrenadante concentrado 20x (der). En ambos casos se agregó avidina y la inducción se realizó con $CdCl_2$. Se observa el resultado de la cromatografía de afinidad (strep-a y d) y las bandas obtenidas de la purificación (e). En ambos casos las fracciones mayoritarias de la afinidad se cargaron en una Sx200 16/60 (Hiload) (b y f) donde se señala con línea punteada el pico máximo de las especies encontradas. En rosado (b) se marca el trímero que posteriormente se purifica nuevamente por SEC empleando Superosa 6 (c) para la proteína sin concentrar y esta purificación se visualiza por SDS-PAGE en condiciones de reducción/no reducción (+/- β Me). En violeta y verde (f) se señalan el trímero (T) y monómero (M) respectivamente correspondiente a la proteína concentrada. En esta preparación aparecen oligómeros de mayor peso molecular (A). Calibración Superdex 200 16/60: 50mL-467kDa, 55mL-313kDa, 60mL-209kDa, 65mL-131kDa, 70mL-94kDa, 75mL-63kDa.

Como se observa en la **figura 5.10** se comparó la producción de srEnv-BLVmut en dos condiciones diferentes: por un lado el volumen de cultivo a purificar (250 vs 1000mL) y por otro lado la incorporación de la etapa de concentración previo a la cromatografía de afinidad. Si comparamos ambas producciones en primer lugar la cantidad de proteína obtenida es comparable. Sin embargo y sorprendentemente la cantidad de proteína es mayor en la producción a partir de 250mL de sobrenadante de células S2 expresando srEnv-BLVmut (19,5mg/L) en comparación con la producción de 1 L (16,7mg/L). Ello puede explicarse debido a que si bien a ambas se les agregó avidina, la principal diferencia radica en que el litro de sobrenadante fue concentrado 20 veces previo a la cromatografía de afinidad mientras que el otro volumen fue cargado en la afinidad sin concentrar. Ello podría provocar la pérdida de parte de la proteína en la etapa de concentración así como en la centrifugación previa a la afinidad. Ambas proteínas purificadas fueron corridas en Sx200 16/60 donde se observa una segunda diferencia en las especies oligoméricas probablemente producto de la concentración. Mientras que en la producción más pequeña se observan 2 especies oligoméricas claras correspondientes a trímero (aunque este pico abarca especies moleculares mas grandes) y monómero **figura 5.10 (izquierda)**, la producción de 1L muestra el perfil de elución con las 3 especies observadas previamente correspondientes a monómero, trímero y especies moleculares mayores **figura 5.10 (derecha)**. Sin embargo este último pico es mayoritario y apenas se diferencia del pico correspondiente al trímero, dando cuenta de que la proteína está más agregada. El pico correspondiente al monómero es más discreto.

En base a los resultados de la SEC para la producción de 250mL se realizó una segunda cromatografía de exclusión molecular esta vez empleando una columna de superosa 6 con el fin de resolver las especies moleculares mayores del trímero. Con respecto a este paso de purificación posterior se observó que la presencia en la Sx200 16/60 de picos poco definidos se reflejó en el resultado de SEC-MALLS (datos no mostrados) lo cual obligó a la incorporación de un paso más de purificación: Superosa 6 para la fracción correspondiente al trímero y Sx200 20/300 para la fracción monomérica.

Las fracciones de elución correspondientes al pico obtenido de la superosa 6 se analizaron por SDS-PAGE en condiciones de reducción/no reducción observando de forma débil especies moleculares de mayor peso molecular (aproximadamente 100KDa) en las muestras sin β -ME. De todos modos la banda mayoritaria en ambos casos es de aproximadamente 55KDa como se esperaba. Finalmente las fracciones que definían el pico mayoritario de la superosa 6 (correspondientes al trímero) fueron analizadas por MALLS de forma individual y posteriormente se analizó el *pool* de estas fracciones correspondientes al pico mayoritario (previa concentración del *pool trimérico* a 9mg/mL). De este modo la fracción de SEC correspondiente al trímero de srEnv-BLVmut fue colectada y analizada por SEC-MALLS con el fin obtener una especie oligomérica estable (trímero) y a su vez para determinar la masa molecular (**figura 5.11**).

srEnv-BLVmut

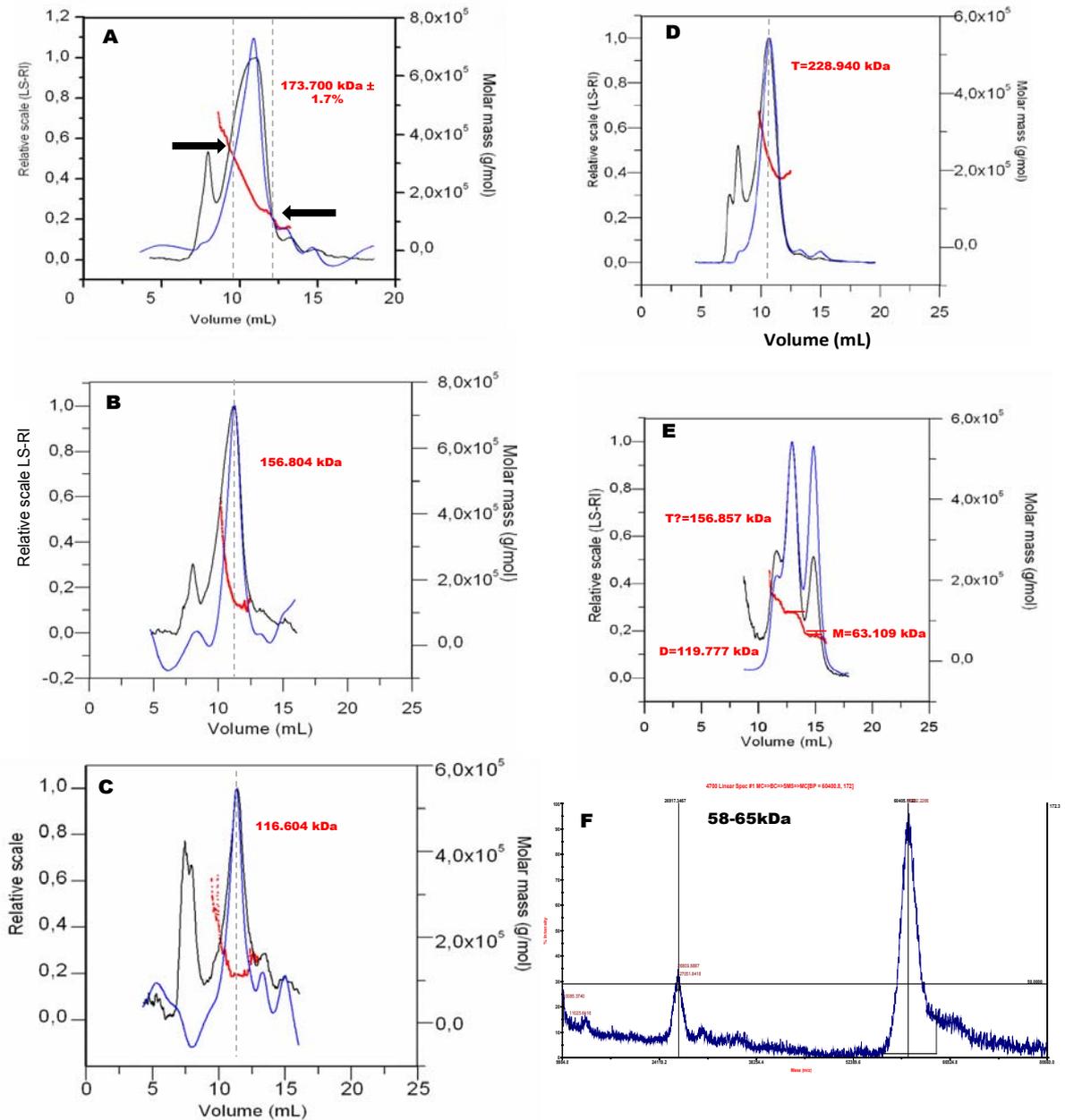


Figura 5.11: Análisis del estado de oligomerización y PM por SEC-MALLS de las fracciones purificadas correspondientes al trímero obtenido en 5.10 c y f (A-E ver texto). Se muestra en el eje de las y a la izquierda los valores de RI y LS en escala relativa de -0,1 a 1,1 (graficado como línea negra-LS- y línea azul-RI-) mientras que el eje de las y a la derecha indica la masa molecular. Esta masa fue determinada por el perfil de “scattering” en múltiples ángulos medido cada segundo a lo largo del pico de elución del trímero y se indica con un punto rojo. En los gráficos los puntos rojos aparecen como una línea continua. Determinación de la masa total de srEnv-BLVmut en solución mediante MS (F). Se observa un pico correspondiente a 58-65kDa compatible con el PM esperado de la proteína.

En la **figura 5.11 A** se observa la fracción correspondiente al *pool* trimérico proveniente de la superosa 6 (**figura 5.10 c**). Los datos de SEC-MALLS revelan la presencia de especies oligoméricas que oscilan en MW desde 150 a 300kDa compatible con la glicosilación presente en esta proteína con un promedio de 173.700kDa \pm 1.7%. En este ensayo la concentración de proteína utilizada fue de 0.9mg/mL (se corrieron 90ug en el MALLS) (**figura 5.11 A**). Cuando se analiza de forma individual alguna de las fracciones presentes en el *pool* trimérico, por ejemplo la correspondiente al pico máximo de la SEC (**figura 5.10 c**), se observa que la masa molecular es más homogénea y presenta un MW de 156.804 kDa (**figura 5.11 B**). Por su parte el análisis de una de las fracciones individuales ubicada en los extremos del pico que conforman el *pool* también presentó una masa molecular más homogénea MW= 116.604kDa (**figura 5.11 C**). Este valor correspondería a la presencia de un dímero. La fracción correspondiente al otro extremo del *pool* también fue analizada y el peso molecular es de aproximadamente 300kDa (no se muestra).

Con respecto a la proteína srEnv-BLVmut obtenida a partir de 1L de cultivo a partir de la purificación por SEC (Sx200 16/60) y de acuerdo a los volúmenes de elución las fracciones correspondientes al trímero y monómero (fracciones sombreadas violeta y verde respectivamente **figura 5.10 f**) se *pool*earon por separado. En este caso el ensayo de SEC-MALLS fue realizado para establecer la distribución a lo largo de las fracciones de la Sx200 16/60 de las distintas especies moleculares y evaluar la calidad del pico seleccionado, en particular para el trímero. Para este ensayo la concentración de proteína utilizada fue de 0.4mg/mL. Las **figuras 5.11 D y 5.11 E** corresponden a las fracciones que delimitan el trímero. La **figura 5.11 D** muestra que esta fracción presenta una masa molecular promedio de 228.940kDa compatible con un trímero. Sin embargo cabe destacar que el pico observado en el SEC-MALLS indica que esta masa promedio no es completamente homogénea ya que especies moleculares entre 180 y 300kDa componen esta fracción. Por su parte la **figura 5.11 E** muestra el análisis por SEC-MALLS de la otra fracción que delimita el trímero. En este caso se observan 3 picos correspondientes a MW de 156.857, 119.777 y 63.109 kDa siendo esta fracción más heterogénea que la que aparece en la **figura 5.11 D**. En este caso las masas moleculares serian compatibles con la presencia de trímero, dímero y monómero aunque la fracción mayoritaria correspondería al dímero de 119.777kDa.

De cualquier forma estos resultados evidencian la presencia de diversas especies moleculares en un único pico por lo tanto la heterogeneidad podría deberse en parte a la glicosilación. Sin embargo cabe destacar, como se detalla en el capítulo 6 esta glicosilación es menos heterogénea que la que ocurre efectivamente cuando la proteína es expresada en células de mamífero. Por este motivo si bien la glicosilación es un factor que genera diversidad, otros componentes como ser la presencia de puentes disulfuro intermoleculares que se generen de forma espontánea por la presencia de la Cys 212 reactiva podría dar lugar a especies moleculares heterogéneas a pesar de trabajar con un mutante que fijaría a la proteína en un estado prefusión. A su vez cuando se realiza la determinación de masa total de la

proteína srEnv-BLVmut glicosilada por espectrometría de masa MALDI-TOF (**figura 5.11 F**) se observó que el peso molecular oscila entre 58-65KDa valor que coincide con el peso molecular absoluto determinado por SEC-MALLS para el monómero independientemente del tipo de escalado y purificación de proteína realizado.

A continuación se realizó la purificación de la proteína srEnv-BLVwt teniendo en consideración que parte de la eficiencia en la cromatografía de afinidad no era tan elevada como en el caso de la srEnv-BLVmut (**figura 5.7**). Esta proteína fue purificada a partir de 500mL de sobrenadante de cultivo de S2-EnvBLVwt inducido durante 30hs con CdCl₂ 5uM. La purificación por cromatografía de afinidad se realizó concentrando previamente el sobrenadante 8 veces y en presencia de avidina.

Se observa en la **figura 5.12 A** el pico correspondiente a la elución de la proteína. Posteriormente la proteína fue purificada por SEC utilizando una Sx200 16/60 y la fracción correspondiente al trímero fue sometida a una nueva SEC esta vez utilizando una columna de superosa 6 para mejorar la purificación. Las fracciones correspondientes al pico mayoritario fueron *pool*eadas, concentradas hasta 11,7mg/mL (**figura 5.12 B**). En la **figura 5.12 C** se observa la fracción correspondiente al *pool* trimérico proveniente de la superosa 6. Los datos de SEC-MALLS revelan la presencia de especies oligoméricas que oscilan en MW desde 300 a 500KDa con un promedio de 420.420KDa (delimitado entre líneas punteadas grises). En este ensayo la concentración de proteína utilizada fue de 1.1mg/mL (se corrieron 110ug en el MALLS). Finalmente los resultados de la SEC del trímero con Superosa 6 (**figura 5.12 C**) y del monómero con Sx200 10/300 (no se muestra) se analizaron por SDS-PAGE en condiciones de reducción/no reducción (**figura 5.12 D**). Se observó que la proteína srEnv-BLVwt se purifica y se logran ver ambas subunidades gp51 a 37KDa y el ectodominio de gp30 aproximadamente a 20KDa lo cual coincide con los valores esperados para proteínas glicosiladas dado que gp51 sin glúcidos tiene un MW de 31KDa y gp30 ectodominio más el tag 19KDa. Recordar además (se verá en el capítulo 3) que la glicosilación en células de insecto es menor que en células de mamífero.

srEnv-BLVwt

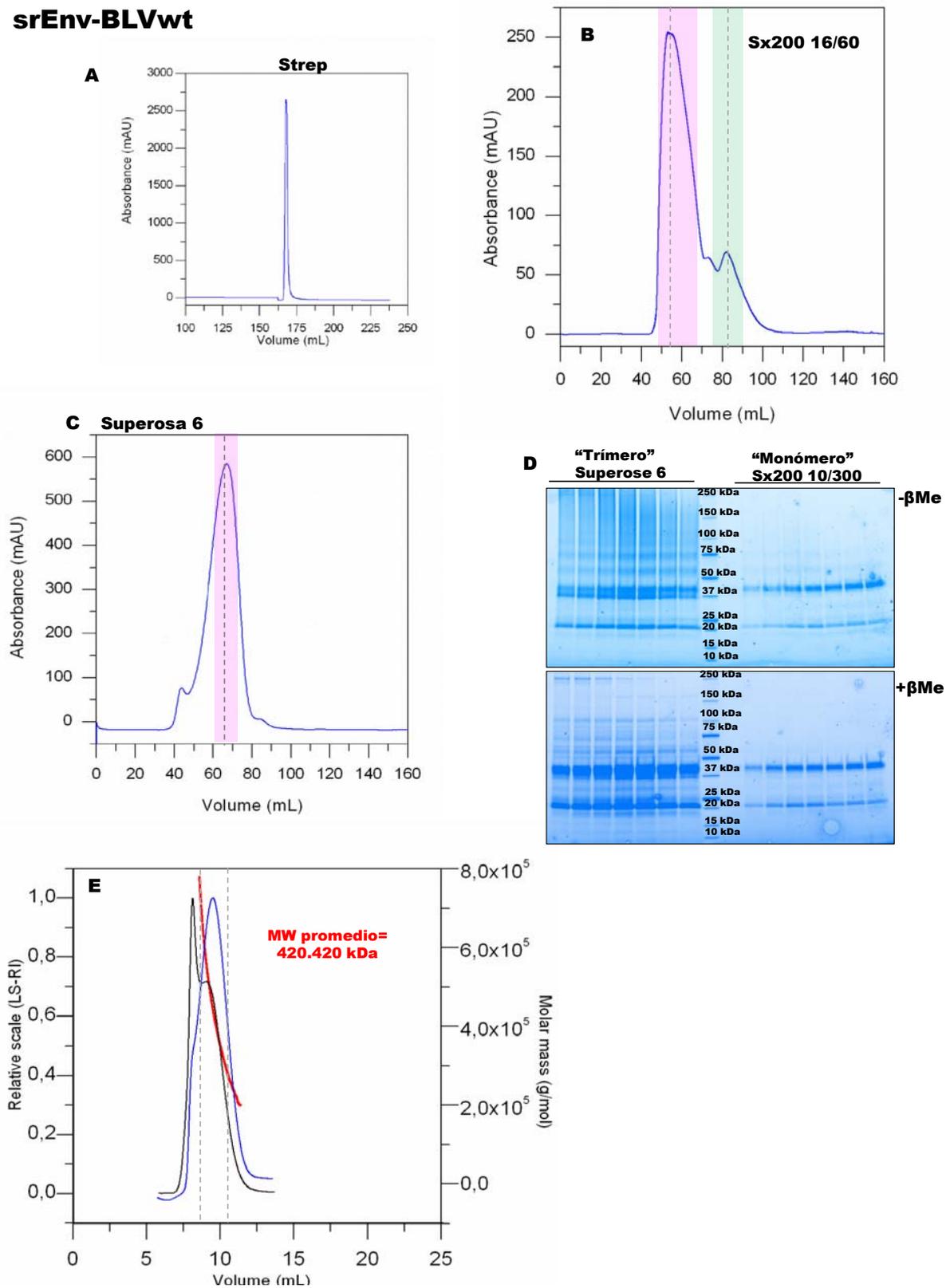


Figura 5.12: Esquema de purificación de la proteína srENV-BLVwt a partir de 500mL de sobrenadante concentrado 8x. Se agregó avidina y la inducción se realizó con CdCl_2 . Se observa el resultado de la cromatografía de afinidad (A). Las fracciones mayoritarias de la afinidad se cargaron en una Sx200 16/60 (Hiload) (B) donde se señala con línea punteada el pico máximo de las especies encontradas. En rosado se marca una especie oligomérica mayor a trímero y en verde el monómero (B). Ambas fracciones se purifican posteriormente por SEC (superosa-trímero, Sx200 10/300-monómero no se muestra) y se analizaron por SDS-PAGE en condiciones de reducción/no reducción (D) observándose bandas correspondientes a gp30 + tag (20kDa) y gp51 (37) kDa. Recordar que gp30 + tag PM teórico sin glúcidos=19kDa y gp51 PM teórico sin glúcidos=31kDa. (E) SEC-MALLS correspondiente a la fracción purificada obtenida en C

Estos resultados revelan que las especies oligoméricas presentes en este análisis son mayores que las encontradas para la proteína mutante y no se ajustan a la presencia de trimeros o dimeros de trimeros (aprox 360KDa) sino a especies moleculares mayores. De hecho el rango de pesos moleculares no es homogéneo y la distribución es bastante amplia 300-500KDa, esto a su vez demuestra que los oligómeros ya presentan un MW mayor al compatible con la formación de trimeros. En este caso esta gran variación presente en los MW de esta fracción no obedecería a la glicosilación presente en la proteína, en este caso se trata de una heterogeneidad mayor. Es posible que la presencia de estas especies esté relacionada con la formación de puentes disulfuro intermoleculares artefactuales que lleven a la formación de estos “agregados”. Como se plantea en la discusión la proteína Env es una proteína cuya activación depende de la isomerización del puente disulfuro intersubunidad (en un mismo monómero) para que se gatille la activación de la misma una vez que ocurre la interacción con el receptor. En este caso tenemos el ectodominio de la proteína wt sin alteración de las Cys presentes en la secuencia de modo que la Cys que es reactiva y ocasiona la isomerización esta disponible para generar otros puentes disulfuro artefactuales durante la expresión, concentración y/o purificación de la proteína.

En ensayos iniciales se visualizó que aparentemente la proteína Env-BLV tanto mutante como wt presentaba una expresión basal en ausencia de inductor, de hecho representaba más que un “leaking” como se mencionó anteriormente. Ambas proteínas se expresan en ausencia de inductor y las proteínas se expresan en buenas condiciones. Una posibilidad es que al tratarse de líneas estables y dado que estos plásmidos de expresión se integran entre 2-4 veces en el genoma, cabía la posibilidad de que el sitio de integración estuviera cercano a un promotor de expresión constitutivo que promoviera la expresión de estas proteínas. Sin embargo este comportamiento se repite independiente del evento de transfección por lo tanto podría inferirse que estas construcciones presentan algún motivo que las integra en sitios particulares dado que esto no suele ocurrir con las proteínas expresadas en *Drosophila*. De hecho la mayoría de las proteínas necesita ser inducida con tiempos de al menos 4-5 días²⁰⁶. La proteína sin inducir se purificó con un alto rendimiento y luego de la afinidad se purificó mediante gel filtración presentando especies moleculares correspondientes a trímeros y monómeros en picos que si bien no se definen por completo presentan una buena separación (**figura 5.13**).

srEnv-BLVmut

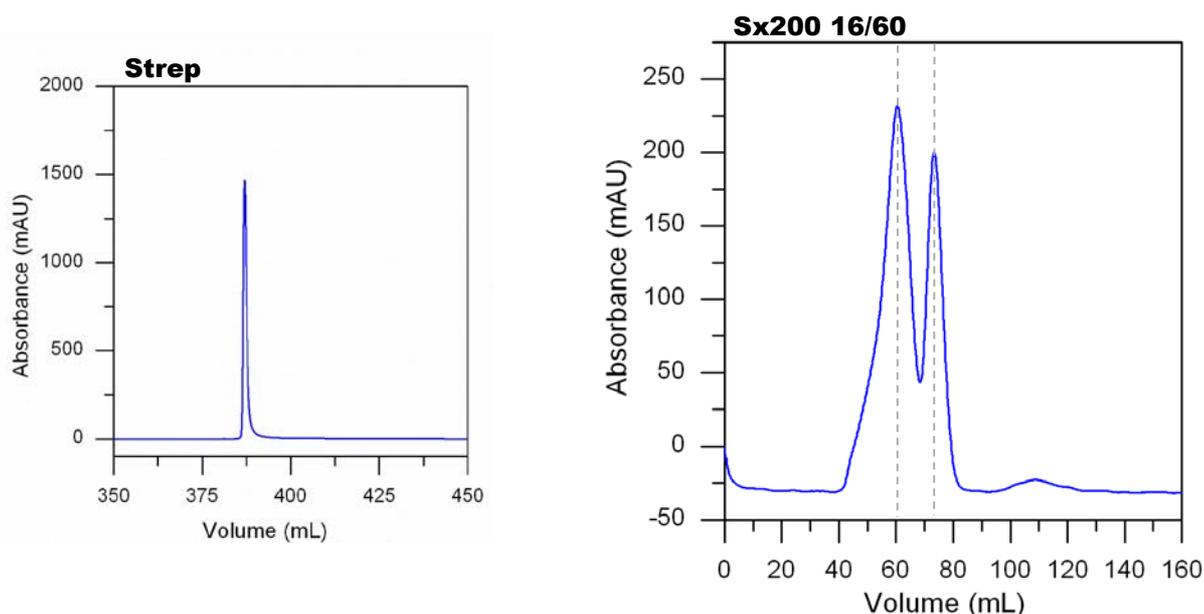


Figura 5.13: Purificación de srEnv-BLVmut a partir del sobrenadante de células S2 sin inducir. El sobrenadante se concentró 2x previo a la purificación mediante cromatografía de afinidad (Strep) y posterior cromatografía de exclusión molecular (Sx200 16/60). Luego de la SEC se observa la presencia de 2 picos (líneas punteadas) correspondientes a trímero ($V_e=60\text{mL}$) y monómero ($V_e=75\text{mL}$).

Posteriormente se estudió el efecto de la concentración de la proteína y condiciones de almacenamiento a fin de establecer si era posible concentrarla hasta valores de 10mg/mL sin que la misma agregara o las especies oligoméricas se modificaran y si por ejemplo era posible congelarla para su conservación y traslado. Como se observa en la **figura 5.14** la proteína srEnv-BLVmut puede concentrarse 10mg/mL sin que ello afecte la proteína. A su vez el almacenamiento de la proteína es posible congelando la proteína a -80°C sin aditivos y el agregado de glicerol al 10 o al 50% no afecta su oligomerización. En todas las SEC se observó la presencia de las tres especies oligoméricas sin embargo la mejor condición es aquella en la cual la proteína se congela en ausencia de aditivos.

Por otro lado, analizamos el efecto del pH sobre el estado de oligomerización de la glicoproteína logrando determinar que aparentemente los oligómeros se ven afectados, a menor pH se favorece la presencia únicamente de monómeros y trímeros como se observa en la **figura 5.15**

srEnv-BLVmut

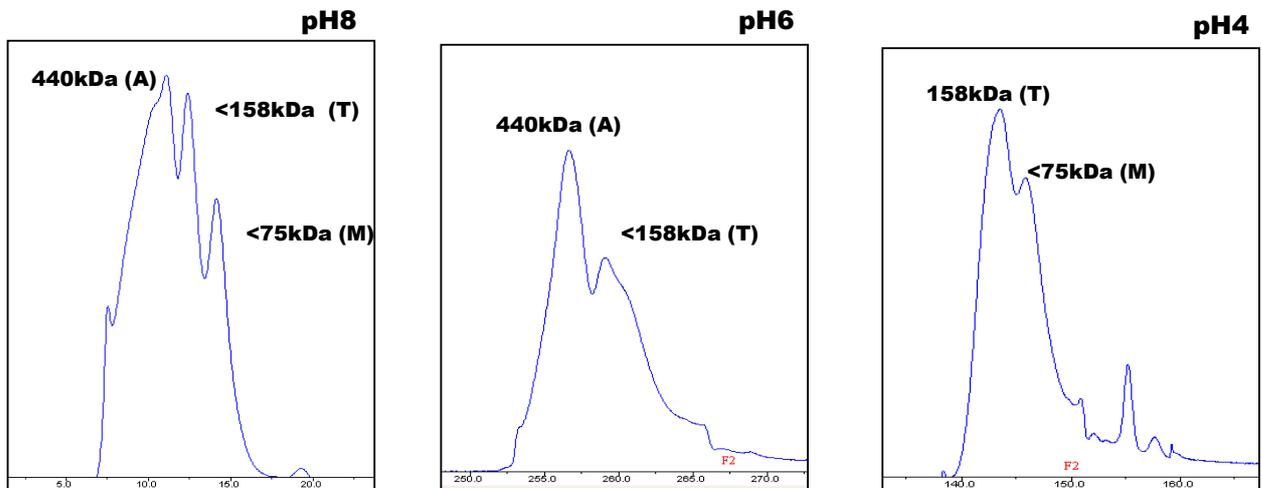


Figura 5.15: Efecto del pH de la proteína srEnv-BLVmut. Luego de la cromatografía de afinidad la proteína fue analizada por SEC (Sx200 10/300) en buffer TNE (pH8), MES (pH6) y acetato de sodio (pH4). La fuerza iónica se mantuvo en 150mM NaCl. Se observa que a medida disminuye el pH se favorece la presencia de especies de menor PM como trímero (T) y monómero (M) y desaparece la especie oligomérica de PM (A).

Con respecto a la **influencia de la fuerza iónica en la estabilidad** de la proteína la **figura 5.16** corresponde al análisis por SEC-MALLS de un *pool* monomérico y trimérico de la proteína EnvBLV mutante en presencia de 300mM NaCl (buffer con mayor fuerza iónica). En este caso se empleó el buffer 10mM Tris/300mM NaCl pH8 a diferencia del buffer 10mM Tris/150mM NaCl pH8 que se utilizó como buffer de referencia en los ensayos de SEC-MALLS. La proteína fue purificada a partir de 500mL sobrenadante de un cultivo de S2-EnvBLVmut el cual fue concentrado 2 veces y con adición de avidina previo a la cromatografía de afinidad.

Esta proteína fue posteriormente purificada por Sx200 16/60 y los picos correspondientes al trímero y monómero de srEnv-BLVmut (**figuras 5.16A-B** respectivamente) fue tomada de forma separada y posteriormente analizada por SEC-MALLS para analizar la estabilidad de las especies oligoméricas y su dependencia con la fuerza iónica. La **figura 5.16 A** corresponde al *pool* monomérico en presencia de buffer con alta fuerza iónica. Dos picos correspondientes a masas moleculares de 81.631 y 48.672KDa siendo el pico mayoritario el correspondiente al menor MW. Esta masa molecular es a la vez la más homogénea. Este MW es menor a las medidas que se realizaron anteriormente en las cuales el MW del monómero oscilaba en los 63KDa. Por su parte la **figura 5.16 B** corresponde al *pool* trimérico y revela la presencia de 3 picos correspondientes a MW de 151.988, 108.518 y 53.932 KDa

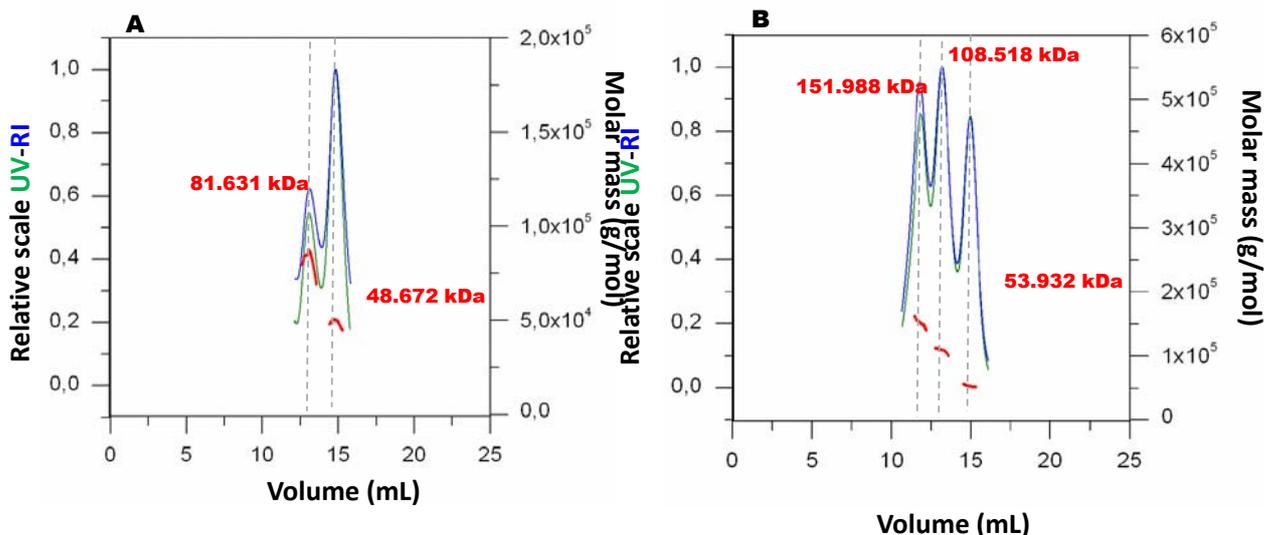


Figura 5.16: Efecto de la fuerza iónica de las especies moleculares correspondientes al monómero (izq) y trímero (der). El análisis se realizó por SEC-MALLS en presencia de buffer conteniendo 300mM NaCl (a diferencia del buffer original que contiene 150mM NaCl). Estas muestras fueron previamente purificadas por SEC (Sx200 16/60). En el eje de las y a la izquierda se muestran los valores de RI y LS en escala relativa de -0,1 a 1,1 (graficado como línea negra-LS- y línea azul-RI-) mientras que el eje de las y a la derecha indica la masa molecular. Esta masa fue determinada por el perfil de scattering en múltiples ángulos medido cada segundo a lo largo del pico de elución del trímero y se indica con un punto rojo. En los gráficos los puntos rojos aparecen como líneas discretas para cada pico presente en el gráfico.

Este ensayo preliminar se realizó debido a que recientemente se determinó la relevancia de las cargas electrostáticas en particular la participación de iones cloruro en la estabilidad y la función de la proteína Env-BLV^{143, 144}. Las interacciones electrostáticas (puentes salinos) están presentes en la región de heptadas y son críticas para estabilizar el core hexamérico (esto se demostró también para beta y gammaretrovirus¹⁴). De todos modos estos son resultados preliminares, no concluyentes sobre la influencia de la fuerza iónica en la proteína y debe mejorarse el diseño experimental para poder mejorar la estabilidad del trímero en la proteína Env-BLV completa.

Con respecto a la **caracterización estructural**, los resultados obtenidos hasta el momento en los ensayos de cristalización no fueron favorables dado que en ninguno de los screenings realizados se logró obtener cristales de la proteína Env (ni wt ni mutante para el sitio de furina) ya sea en la forma trimérica o monomérica. En la **figura 5.17** se muestra que se alcanzaron hits marginales que podrían corresponder a proteína agregada o a precipitante. En algunos casos se observó separación de fases pero no lograron verse cristales de ningún tipo (microcristales, etc).

srEnv-BLVmut

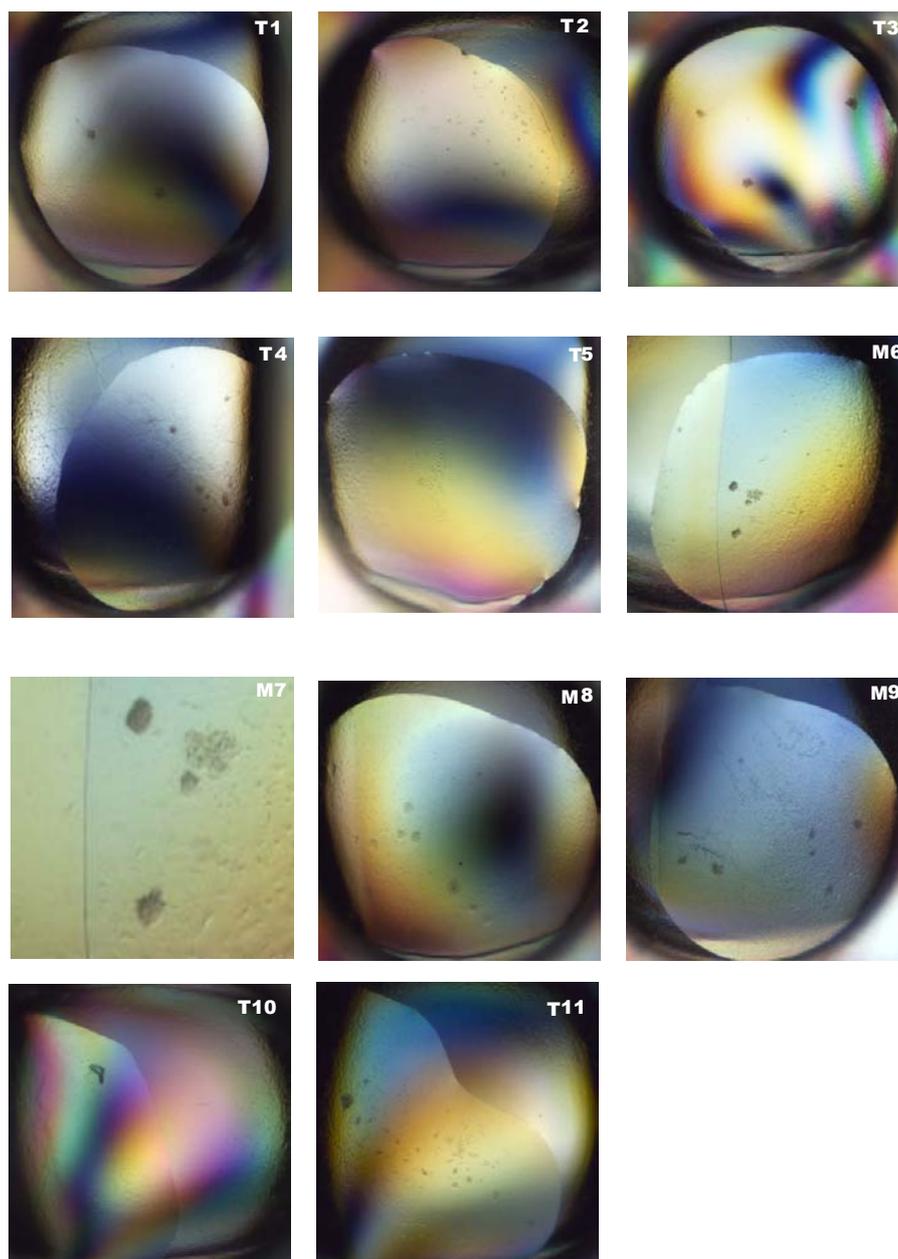


Figura 5.17: Ensayos de cristalogénesis de la proteína srEnv-BLVmut. **T1 (trímero):** precipitante-PEG 8000, buffer-CHES, sal-NaCl (Kit Wizard 1 &2-Emerald Biosystems). **T2 (trímero):** precipitante- PEG 20000, buffer-BICINE, aditivo- 1,4-dioxane (Kit Structure Screen 1&2- Molecular Dimensions limited). **T3 (trímero):** precipitante-PEG 20000, buffer- MES (Kit Structure Screen 1&2- Molecular Dimensions limited). **T4 (trímero):** precipitante-PEG 4000, buffer-TRIS, aditivo-acetato de sodio (JBS1 to JBS4- Jena Bioscience). **T5 (trímero):** precipitante- PEG 10000, buffer-imidazol (JBS1 to JBS4- Jena Bioscience). **M6 (monómero):** precipitante-PEG 8000, buffer-TRIS (Crystal screen 1 &2- Hampton). **M7 (monómero) :** precipitante-PEG 8,000, buffer-TRIS. **M8 (monómero):** precipitante-PEG 20000, buffer-MES (Kit Structure Screen 1&2- Molecular Dimensions limited). **M9 (monómero) :** precipitante-PEG 3350, sal- sulfato de sodio (Kit PEGion/Cryo-Hampton). **T10 (trímero) :** precipitante-PEG 1000, buffer-fosfato de sodio y potasio, sal-NaCl (Kit Wizard 1&2- Emerald Biosystems). **T11 (trímero) :** precipitante-PEG 8000, buffer-TRIS, sal-MgCl₂ (Kit Wizard 1&2- Emerald Biosystems).

Cabe destacar que estos primeros ensayos de cristalogénesis se realizaron en paralelo junto con la puesta a punto de la purificación de la proteína, y como se analizó por SEC-MALLS tanto en forma monomérica como en la forma oligomérica correspondiente al trímero esta no presenta monodispersión dando cuenta de que resulta difícil purificar proteína en un único estado oligomérico.

En el caso del monómero (resultados SEC-MALLS) la proteína tendría un equilibrio desplazado hacia la formación de estructuras oligoméricas de mayor peso molecular. Con respecto al trímero tanto en la construcción wt como mutante los resultados revelan la presencia de agregados, desnaturalización (no se muestra en la figura) pero claramente tampoco se logró obtener el trímero completamente puro. Si tenemos en cuenta que se trata de una proteína que posee muchos residuos de Cys formando puentes disulfuro (que participan activamente de la función de esta proteína) debemos tener en consideración la formación potencial de puentes disulfuro intermoleculares artefactuales que también dificulten la obtención de un trímero puro. En este sentido sería importante contar con un mutante (ver perspectivas) que fije el puente disulfuro intersubunidad evitando su isomerización de modo de garantizar que ese sería el único puente disulfuro presente y que la formación del trímero se debe únicamente a interacciones no covalentes como ocurre en la naturaleza. Por último no debemos olvidar el hecho de que se trata de una proteína glicosilada y esta modificación también evita la obtención de proteína monodispersa y pura, ya que pureza también implica que no haya heterogeneidad en las modificaciones postraduccionales.

Finalmente se realizó el **estudio de las propiedades antigénicas** de la proteína srEnv-BLVmut (**figura 5.18**). En primer lugar se optimizó el protocolo de ELISA para evaluar reactividad de sueros bovinos frente a la proteína srEnv-BLVmut. Originalmente nuestro laboratorio había optimizado un protocolo de ELISA (con potencial fin diagnóstico) empleando proteína p24 recombinante (producida recombinante en el laboratorio-Gonzalo Obal/Federico Carrión/Gonzalo Rama) como antígeno. El protocolo empleado para la proteína Env recombinante fue adaptado a partir del ELISA de p24. La proteína srEnv-BLVmut expresada y purificada a partir de células S2 permitió discriminar sueros seropositivos vs sueros seronegativos para BLV previamente evaluado mediante ELISA comercial (VMRD) y PCR. Asimismo esta proteína fue reconocida por el AcMo conformacional BLV1. Esto permite afirmar que la proteína srEnv-BLVmut es antigénica y permite la correcta discriminación de sueros inmunoreactivos frente a BLV (positivos 730, 677) y sueros no reactivos (negativos 656, 659) (**figura 5.18**).

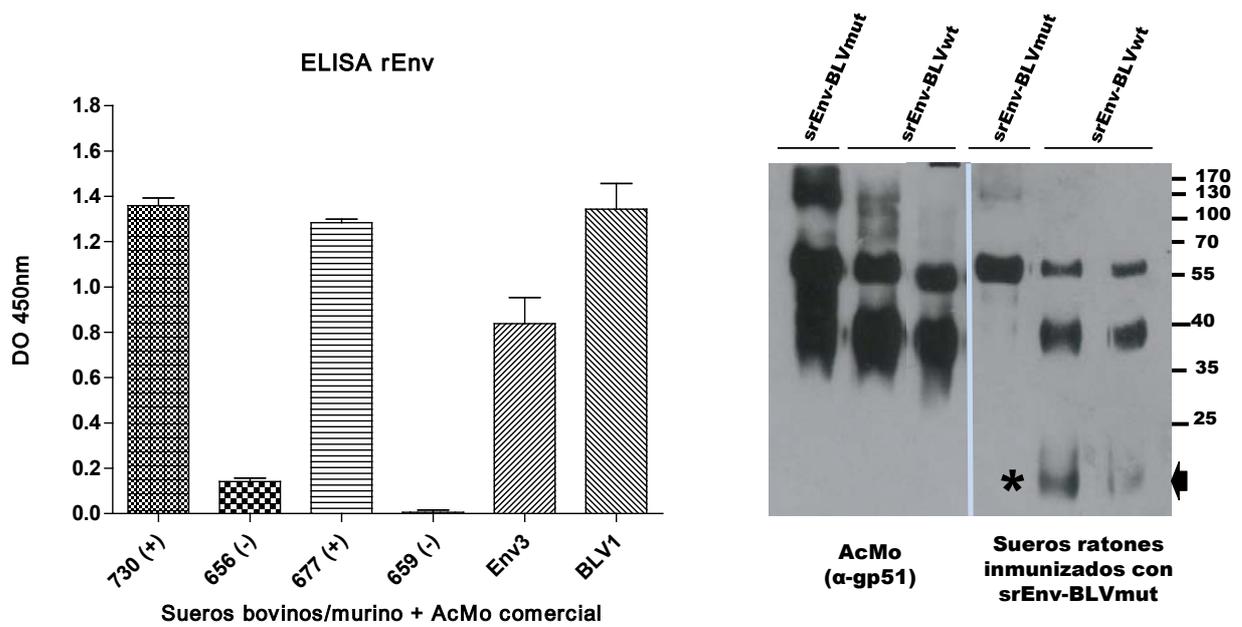


Figura 5.18: Propiedades antigénicas e inmunogénicas de las proteínas srEnv-BLVwt y srEnv-BLVmut. Izq. ELISA empleando srEnv-BLVmut como antígeno enfrentada a sueros bovinos de campo seropositivos y seronegativos para BLV. Der. SDS-PAGE/WB de las proteínas srEnv-BLVwt y srEnv-BLVmut enfrentadas al anticuerpo monoclonal comercial α -gp51 y a sueros de ratones inmunizados con la proteína srEnv-BLVmut. La flecha (y *) indican la presencia de bandas correspondientes a la proteína srEnv-BLVwt que no aparecen en presencia del AcMo.

El ELISA optimizado con la proteína recombinante producida en este trabajo posteriormente fue evaluado frente a un pool de sueros bovinos seropositivos y seronegativos para BLV en comparación con el ELISA comercial (VMRD) que actualmente representa el gold estándar para el diagnóstico de esta infección y presentó una sensibilidad del 92,5% y una especificidad del 93,3% (datos no publicados, tesis maestría Andrés Addiego, 2014). En nuestro caso la srEnvBLV-mut resultó ser antigénica, permitiendo discriminar sueros bovinos con infección natural por BLV y actualmente se está optimizando el ELISA para a corto plazo emplearla en ELISA diagnóstico sustituyendo al ELISA comercial en nuestro país (datos no publicados, tesis maestría Andrés Addiego, 2014). Asimismo esta proteína fue empleada para inmunizar ratones para comenzar estudio de respuesta humoral y celular (no se muestra en detalle por no ser parte de la tesis). En este sentido la proteína también resultó ser inmunogénica dado que los ratones desarrollaron anticuerpos anti-Env (Env3). En este sentido el suero de ratones inmunizados permitió reconocer ambas proteínas recombinantes srEnv-BLVmut y srEnv-BLVwt. Con respecto a la proteína recombinante salvaje este suero murino incluso permitió reconocer una banda correspondiente a gp30 generando de esta forma un reactivo de gran importancia dado que los anticuerpos comerciales únicamente permiten reconocer gp51.

5.5) CONCLUSIONES

Como se desprende de los resultados obtenidos, logramos -por primera vez- producir la proteína Env-BLV en forma soluble, expresada en células de *Drosophila* (S2) transfectadas de forma estable, y purificada mediante cromatografía de afinidad. Es importante destacar que se logró optimizar un protocolo de expresión/purificación de manera que fue posible obtener una gran cantidad (entre 11-17mg/L) de proteína purificada por litro de cultivo. Este tipo de rendimiento es se ha logrado con otras proteínas de fusión virales y también eucariotas²⁰⁶. Esto resulta indispensable para abordar la caracterización bioquímica, biofísica y estructural que se propuso realizar en esta tesis, y que se pretende continuar en el futuro. Debe notarse que este tipo de proteínas (oligoméricas, altamente glicosiladas) son sumamente difíciles de producir en estas cantidades, y de hecho no existen trabajos al respecto en BLV ni en Deltaretrovirus en general. A su vez, la adición de una etiqueta strep-tag permite obtener una preparación de proteína altamente enriquecida en forma sumamente sencilla.

Se trabajó con el ectodominio de la proteína Env (careciendo de TM y la cola citosólica C-terminal), usando 2 construcciones, una con el sitio natural de procesamiento proteolítico por furina y otra con el sitio mutado. Esto permitió producir: i) el ectodominio en su estado nativo conteniendo las subunidades gp51-gp30; y ii). una proteína mutante que no sufre procesamiento proteolítico, que mimetiza el estadio prefusión. Globalmente, ambas construcciones se expresaron en gran cantidad. Sin embargo, el procesamiento proteolítico de la versión salvaje de la proteína durante su síntesis no fue eficiente mientras que la escisión daba lugar a un complejo gp51-gp30 muy inestable, de rápida disociación, y fuerte tendencia a formar grandes agregados. A partir de estos resultados se decidió continuar con la caracterización bioquímica, biofísica y estructural en particular con srEnv-BLVmut dado que era más estable.

Con respecto a srEnv-BLVmut se determinó la estructura oligomérica de la proteína expresada (previamente identificada por espectrometría de masa) mediante cromatografía de exclusión molecular observando que la misma se encontró como monómero, dímero, trímero y un agregado de mayor peso molecular. Estos estados oligoméricos eran aparentemente estables en cada purificación ya que permanecían inalterados al purificarse de forma individual y no se veían afectados por el efecto de la concentración. Sin embargo se observó que el pH afecta la oligomerización, desplazando el equilibrio hacia las especies monomérica y trimérica a medida disminuye el pH.

Mediante SEC-MALLS se determinó que la forma monomérica de la proteína glicosilada tiene un peso molecular de 63KDa (datos que coincidieron con la determinación de masa total realizada por espectrometría de masa 58-65KDa). Por su parte el PM del trímero se estimó en aproximadamente 175KDa. Es interesante notar el hecho que las diferentes estrategias de purificación ensayadas rindieron una especie monomérica cuyo perfil de elución y PM (determinado mediante SEC-MALLS) fueron idénticos en todos los casos, indicando la estabilidad conformacional de esta especie. Para la especie

trimérica, por su parte, se observó cierta variación en el PM exhibido (± 10 -20kDa, SEC-MALLS). Esto es muy probablemente atribuible al hecho que en solución la proteína exhibe un equilibrio concentración-dependiente entre la forma monomérica, dimérica y trimérica. Este equilibrio se observó que es muy dinámico, resultando difícil (en el rango de condiciones ensayadas) obtener una especie oligomérica discreta. Por tanto, es lógico suponer que si bien resulta posible determinar con precisión el PM del monómero (especie discreta y bien resuelta cromatográficamente), la especie trimérica existe en un equilibrio dinámico (pobremente resuelto en la SEC) ocasionando la fluctuación del PM observado (si bien es $\leq 10\%$). En este sentido, se observó que el proceso de purificación Sx200 16/60 seguido de superosa 6 para el trímero y Sx200 10/300 para el monómero permite una mejor purificación ("polishing") de estas especies, debido a su mayor poder resolutivo. Esta técnica también se utilizó para delimitar de forma un poco más precisa qué fracciones elegir para separar las especies oligoméricas.

La proteína expresada sin inducción puede producirse con el mismo grado de pureza que mediante inducción, con un rendimiento comparativo solamente algo menor. Esto tiene dos ventajas importantes: a)- por un lado, una menor cantidad de proteína durante la producción evita la formación de agregados (proceso concentración-dependiente) y favorece la presencia de especies oligoméricas discretas estables; b)- por otro lado, disminuye el tiempo de producción, lo cual también contribuye positivamente a evitar la agregación, el cual es también un proceso tiempo-dependiente. En este sentido, por ejemplo, la proteína srEnv-BLVmut sin inducir la purificación se realizó con previa concentración del sobrenadante 2x; lo cual evitó que la proteína agregue y disminuyó el tiempo de purificación de la misma.

Se realizaron ensayos de cristalización a partir de monómero y trímero purificado pero debe mejorarse la purificación de estas especies y probar concentraciones crecientes de proteína.

El análisis de las especies oligoméricas mediante SEC-MALLS reveló la presencia de múltiples especies moleculares, las cuales existen en equilibrio dinámico entre dos formas predominantes, trimérica y monomérica, una especie dimérica minoritaria, presumiblemente menos estable (un oligómero de rápida transición) y especies oligoméricas de mayor peso molecular. El trímero así como los agregados de mayor peso molecular podrían aparecer como consecuencia de la presencia de puentes disulfuro intermoleculares artefactuales debido a la presencia de la cisteína 212 reactiva que participa en la isomerización durante la activación de la proteína. De ser este el caso una forma de comprobar la naturaleza de las especies oligoméricas observadas sería obtener trímero y diluirlo de forma tal que su equilibrio se desplace hacia la formación de monómeros. Esto no ocurrirá si el trímero es formado por enlace covalente por la presencia de puentes disulfuro artefactuales dado que la oligomerización en las glicoproteínas de fusión tipo I, II o III se producen por interacción no covalente.

Por su parte si las especies oligoméricas se forman por asociación no covalente de monómeros es posible que exista un equilibrio dinámico entre trímero y monómero (pasando por especies

diméricas) que justifique la presencia de las tres especies en la fracción de monómero separada por el volumen de elución correspondiente de la Sx200 16/60 por ej (**figura 5.9**). Es posible que el equilibrio dinámico esté desplazado hacia especies moleculares mayores, es decir del monómero al trímero siempre a favor de la formación de especies de mayor peso molecular.

Asimismo al ser proteínas metaestables es probable que puedan quedar fijas en una conformación luego de la activación de la misma por ejemplo y posiblemente el equilibrio pueda alterarse no pudiendo re-establecer el equilibrio anterior. Recordar que la activación implica un cambio conformacional con exposición del péptido de fusión.

Por otro lado la glicosilación es importante dado que en ningún caso, aún en las fracciones de proteína con varios pasos de purificación se logró obtener proteína 100% homogénea siendo por tanto un componente que contribuye a la heterogeneidad del PM de la proteína como se verá en el capítulo 6.

Uno de los principales problemas encontrados en la purificación de la proteína Env-BLV salvaje es la presencia de agregados como se mencionó anteriormente. En la expresión de la srEnv-BLVwt observamos que si bien la proteína se expresa correctamente (de hecho se expresa en gran cantidad aún en condiciones de no inducción) la misma forma agregados de alto peso molecular no compatibles con los oligómeros esperados sin importar que no se haya concentrado previamente el sobrenadante. En ambos casos entonces el análisis de oligómeros presente en la proteína srEnv-BLVmut y wt aún queda por esclarecer determinando si las especies observadas de forma preliminar corresponden efectivamente con lo que ocurre en condiciones nativas. Cabe recordar que para las glicoproteínas virales tipo I como el caso de la Env de BLV se establece que la formación de las estructuras oligoméricas (trímeros por ej) se debe a interacciones de tipo no covalente. Si bien los SDS-PAGE en condiciones de reducción/no reducción revelaron la presencia de especies moleculares de alto peso molecular estos resultados no fueron del todo evidentes y para ello es necesario realizar cromatografías de exclusión molecular en condiciones de reducción vs no reducción para elucidar la naturaleza de las especies encontradas. Como se mencionó anteriormente la proteína Env posee varias cisteínas que podrían dar lugar a la formación de puentes disulfuro artefactuales entre monómeros estableciendo la formación de especies estables. De ser este el caso la idea es generar nuevas construcciones eliminando alguno de los residuos de cisteína presentes como ya se ha comenzado a realizar hacia el final de esta tesis (ver perspectivas).

Con respecto a la proteína srEnv-BLVwt esta construcción podría ser adecuada para obtener monómero purificado ya que logra separarse bastante bien de las especies más grandes.

Por su parte se demostró que la proteína srEnv-BLVmut es antigénica e inmunogénica permitiendo el desarrollo de un ELISA diagnóstico para detección de muestras de suero bovino y a la vez

permitió comenzar el estudio de la respuesta inmune frente a la proteína Env así como obtener suero murino que permita la detección de gp30 para la cual no existe reactivo comercial.

5.6) PERSPECTIVAS

5.6.1. Análisis del estado de oligomerización de Env-BLV.

Con respecto a la presencia de puentes disulfuro artefactuales planteamos generar un mutante de cisteínas que evite la isomerización de estos residuos de modo que el único puente disulfuro presente sea el que une gp51 con gp30 fijando a la proteína en esta conformación. De este modo la proteína permanecería en un estado pre fusión pero sin necesidad de alterar el sitio de procesamiento proteolítico. Esta estabilización evitaría la formación de puentes disulfuro artefactuales haciendo más confiable el análisis de las estructuras oligoméricas presentes luego de la expresión, evaluando la formación de trímeros. En este sentido ya se generó la construcción de pT350/Env-BLV 33-437mut (C212A) en la cual se sustituyó por mutagénesis dirigida la cisteína reactiva C212 (que promueve la isomerización) por alanina, dejando fijo el puente disulfuro entre ambas subunidades mientras que el sitio de procesamiento proteolítico permanece en su forma nativa. Queda por establecer la línea estable para la posterior expresión, purificación y caracterización de la proteína. Este mismo residuo de cisteína reactivo ha sido mutado en la Env HTLV-1 y la proteína perdía capacidad de activar la fusión¹⁵⁰

Asimismo con el fin de continuar evaluando el tipo de estructura oligomérica se plantea la posibilidad de realizar la cromatografía de exclusión molecular en presencia de detergentes así como realizar geles nativos que permitan establecer las especies generadas. Para la estabilización de la forma trimérica de la proteína una de las alternativas posibles sería generar una construcción que presente un dominio de trimerización y también la remoción del doble strep-tag mediante corte con enteroquinasa.

5.6.2. Ensayos de cristalización de Env-BLV recombinante.

Con respecto a los ensayos de cristalogénesis se debe mejorar el rendimiento y calidad de las especies oligoméricas de las proteínas srEnv-BLVmut (sin el sitio de furina, trímero y monómero) y srEnv-BLVwt (monómero) con el fin de tener proteína suficiente para ensayos de cristalización. A su vez sería interesante realizar estos ensayos con proteína deglicosilada (deglicosilación enzimática) aunque es importante destacar la importancia de la glicosilación en el mantenimiento de la integridad estructural. A su vez la concentración de proteína es importante por tanto es necesario probar concentraciones crecientes de proteína para realizar ensayos de cristalogénesis habiendo previamente establecido la pureza y monodispersión de la misma. Una vez obtenidos los cristales se realizará la recolección de datos, determinación de la estructura y refinamiento. Las condiciones de cristalogénesis serán evaluadas y los hits iniciales serán optimizados. La calidad del cristal será chequeada por una

fuentes de rayos X. El set de datos completo será colectado en el sincrotrón (Soleil, ESRF) y procesados de acuerdo a métodos estándar de cristal simple. Las estructuras serán determinadas utilizando proteínas marcadas con Se-Met y técnicas de faseo de difracción anómala. Finalmente se realizará el refinamiento y validación del modelo se llevará a cabo de acuerdo a métodos establecidos.

5.6.3. Identificación del receptor celular de Env-BLV.

Se realizará la preparación de extracto de membranas de PBMCs o linfocitos B bovinos seronegativos para ensayos de inmunoprecipitación y *pull-down* con la proteína Env-BLV recombinante. Este es un abordaje inicial que nos permitirá determinar qué proteínas podrían estar interactuando con la proteína Env. Una vez fijada la proteína Env a la columna de afinidad se le harán pasar los extractos de PBMCs o linfocitos B bovinos seronegativos. Con respecto a este punto se realizó la construcción de gp51 unida a un tag de histidinas. La subunidad gp51 completa (sin el péptido señal) fue clonada en el vector para expresión en células S2 de *Drosophila* denominado pT850 que presenta un tag con 8 residuos de histidina (pT850 gp51-8xHis) para la purificación de la proteína con columna de níquel. Esta construcción se realizó con el fin de inmovilizar la subunidad a la columna para posteriormente pasar un lisado de linfocitos B bovinos o PBMC (seronegativos para BLV) con el fin de iniciar ensayos de búsqueda de receptor. Si bien (como veremos en el siguiente capítulo) es probable que los glicanos participen y se requiera de un mejor procesamiento de carbohidratos para ello, si la interacción es mediada por un receptor proteico podrían seleccionarse algunos candidatos. Los complejos formados serán analizados mediante electroforesis bidimensional y las diferentes proteínas presentes en los mismos serán identificadas por espectrometría de masa.

5.6.4. Ensayos de pull-down con mAbs utilizando la proteína Env recombinante

Esta actividad es parte importante en la caracterización conformacional de las proteínas Env recombinantes. Para ello la proteína Env será retenida en la columna de afinidad mediante su strep-tag y a continuación se le hará pasar el anticuerpo conformacional BLV-1 (dirigido contra la gp51) o un control de anticuerpos. Los complejos serán posteriormente eluidos y concentrados para posteriormente analizarse mediante SDS-PAGE. Asimismo se analizará por SEC los complejos Env-mAb con el fin de establecer la relación estequiometrica entre ambos. Se utilizaran ambas construcciones para llevar a cabo esta actividad.

Alternativamente se podría generar un Fab o VHH obtenido luego de la inmunización (hiperinmunización) con la proteína Env-BLV recombinante y seleccionando aquel que presente mayor afinidad de modo de expresar el complejo Fab-trimero con el fin de estudiar su estructura mediante microscopía electrónica.

6) Análisis bioquímico-glicosilación de la proteína Env-BLV

6.1) INTRODUCCIÓN

6.1.1. Glicosilación

La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales con mayor versatilidad, producto de la participación de gran número de enzimas y moléculas, otorgando a las proteínas un mayor grado de complejidad. En mamíferos se ha estimado que se requieren aproximadamente unas 700 proteínas para generar la diversa cantidad de glicanos presentes (>7000 estructuras) que son ensambladas únicamente a partir de 10 monosacáridos: fucosa (Fuc), galactosa (Gal), glucosa (Glc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), ácido glucurónico (GlcA), ácido idurónico (IdoA), manosa (Man), ácido siálico (SA) y xilosa (Xyl)^{190, 222}. La competencia entre glicosiltransferasas que poseen la misma preferencia por sitios aceptores de glicanos pero que transfieren residuos distintos influye fuertemente en la abundancia relativa de las estructuras glicánicas presentes en una célula o tejido. Por lo tanto la abundancia relativa de enzimas presentes en un tipo celular particular, su localización, la abundancia, el tráfico de sustratos para glicosilación y la disponibilidad de donadores de azúcares activados en los compartimientos secretorios determina el potencial biosintético en una célula determinada¹⁸⁴.

Existen varios tipos de glicosilación pero las principales y mejor estudiadas son la O- y la N-glicosilación. La N-glicosilación tiene lugar en la secuencia de aminoácidos NXS/T mientras que la O-glicosilación ocurre en residuos de serina y/o treonina. Las proteínas glicosiladas generalmente exhiben tanto macroheterogenicidad (ocupancia variable de los sitios de glicosilación) como microheterogenicidad (grado variable de tipo, corte y elongación del glicano unido a un sitio de glicosilación) contribuyendo a su complejidad⁵³. La glicosilación juega un papel importante en una variedad de actividades biológicas como ser la comunicación célula-célula, desarrollo, morfogénesis, embriogénesis, inmunidad, plegamiento de proteínas, transporte, modificación de las proteínas sanguíneas, desarrollo de mucosas y diferenciación^{156, 254, 268,88}. Una de las áreas más interesantes de la interacción proteína-glicano es la interacción entre los glicanos y los virus. Muchos virus presentan estructuras glicánicas largas en su superficie, las cuales juegan un papel crucial en su transmisión activa hacia la célula hospedera y también juegan un importante papel en mecanismos para evadir al sistema inmune del hospedero^{256 152}

6.1.2. N-glicosilación

En el proceso de la N-glicosilación la cadena de glicanos es unida a la proteína (el mismo proceso ocurre en las proteínas virales ya que el aparato biosintético pertenece a la célula hospedera) a un residuo de asparagina via el core trimanosil-chitobiosa o $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ y se dividen en glicanos ricos en manosa, híbridos o complejos. Los N-glicanos ricos en manosa sólo poseen residuos de manosa unidos al core, los glicanos complejos tienen antenas comenzando con GlcNAcs y los híbridos tienen una o dos antenas unidas al tercer brazo y residuos de manosa en el sexto brazo²⁴³ (figura 6A).

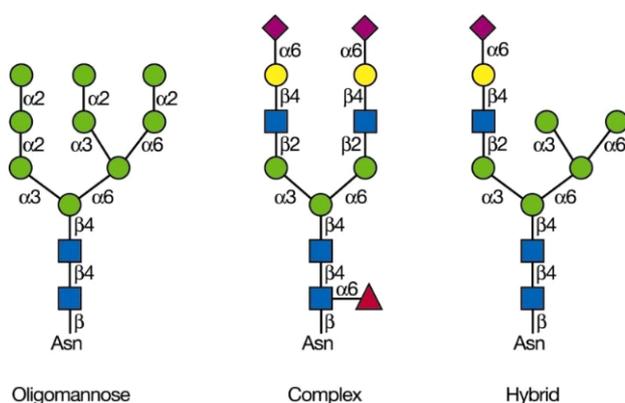


Figura 6A: Tipos de N-glicanos. Son 3 los tipos de N-glicanos que pueden unirse a la secuencia Asn-X-Ser/Thr en una glicoproteína madura: Oligomannosa, complejos e híbridos. Cada N-glicano contiene un core común $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$

Durante el proceso de biosíntesis de N-glicanos (figura 6B) al core inicial se unen residuos de manosa y posteriormente se adicionan sobre estos últimos residuos de glucosa debido a la actividad oligosacaryltransferasa presente en el RE. La mayoría de los N-glicanos son sintetizados a partir de un precursor común conteniendo el residuo $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Los residuos de glucosa son removidos subsecuentemente por glucosidasas 1 y 2 (la cadena de glicano en esta etapa corresponde a glicanos ricos en manosa 5-9 o glicanos simples). A continuación las cadenas de manosa son removidas de forma selectiva en el aparato de Golgi por la actividad manosidasa 1 y 2 que deja el core $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ unido a la proteína. Esta estructura es posteriormente modificada por la adición de distintos monosacáridos terminales como Gal, Fuc o GlcNAc. La fucosa se adiciona generalmente al residuo de GlcNAc involucrado en la unión del glicano con la proteína. El resultado final del proceso es convertir las estructuras glicánicas en estructuras con alto grado de complejidad (glicanos complejos). A pesar de que los glicanos muestran un grado de variabilidad en el componente terminal de sus monosacáridos, la heterogeneidad de glicanos complejos puede surgir también como resultado de la adición de ramas a las cadenas glicánicas. Esto da lugar a glicanos que muestran número distinto de cadenas que surgen del core $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Por tanto los glicanos complejos pueden existir en una forma que tengan estructuras con dos (bi-antenaria), tres (tri-antenaria) o cuatro (tetra-antenaria) unidas al core. En algunos casos también puede unirse GlcNAc a la cadena de manosa dentro de la estructura del core. Como se mencionó anteriormente luego de la unión a la proteína los glicanos son expuestos a glucosidasas y

manosidasas que dan lugar a glicanos ricos en manosa con 5-9 unidades de manosa como productos finales del procesamiento. Los glicanos con GlcNAc adicionados a la región terminal son denominados de tipo complejo. En mamíferos las antenas se elongan por galactosilación y terminan en sialilación o fucosilación (además del sitio de fucosilación que se encuentra en el core GlcNAc). La diversidad de los glicanos complejos es mayor que la de los glicanos ricos en manosa^{243, 244} (Figura 6B).

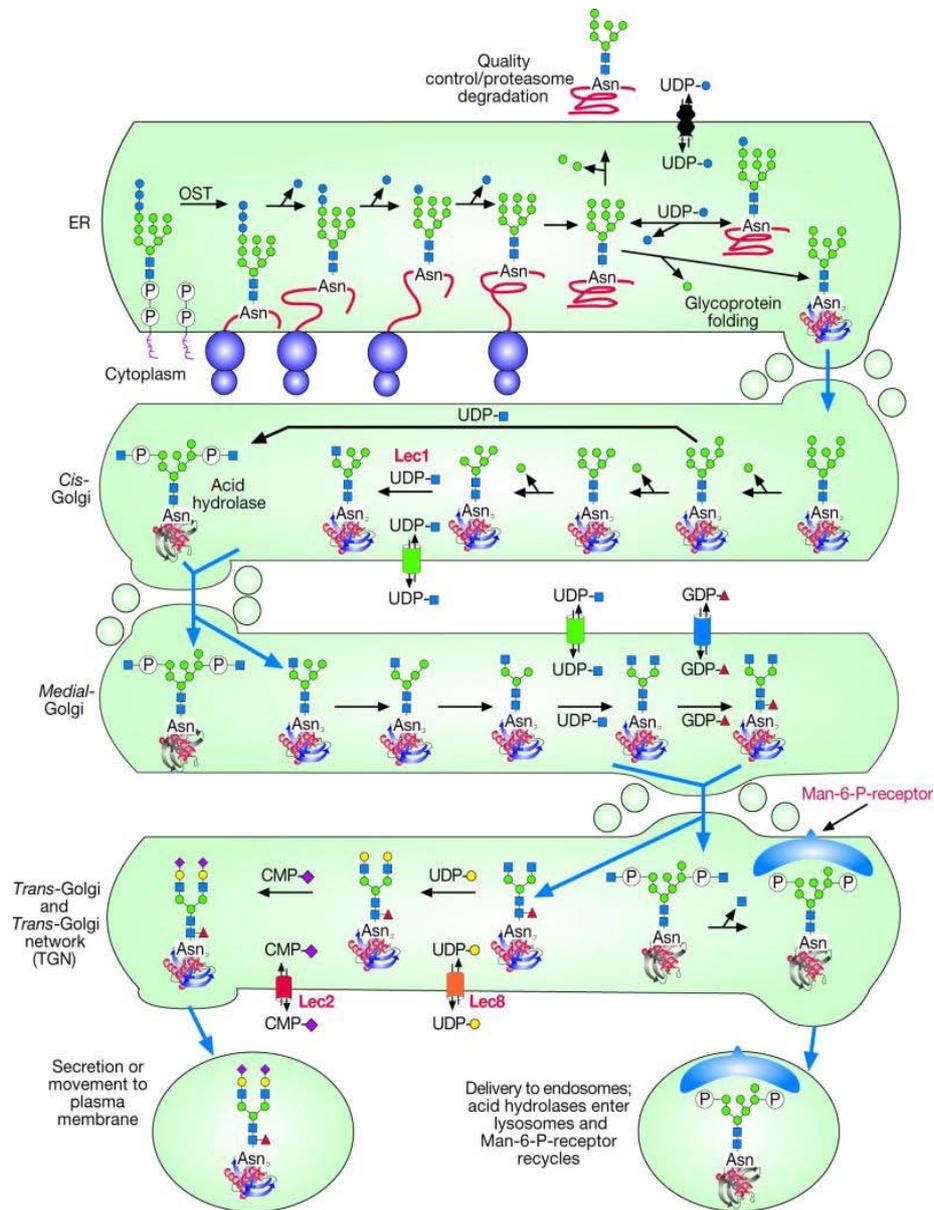


Figura 6B: Procesamiento y maduración de N glicanos. La síntesis de N-glicanos comienza con la transferencia de GlcNAc-1-P a una estructura presente en la cara citoplásmica de la membrana del retículo endoplásmico denominada dolicol que contiene un grupo fosfato. Luego de la transferencia el Dol-P-P-GlcNAc se extiende hasta Dol-P-P-GlcNAc₂Man₅ antes de pasar a la cara luminal a través de la membrana del RE. Una vez allí se agregan 4 manosas y 3 glucosas para dar lugar al dolicol-P-P-GlcNAc₂Man₉Glc₃. Este es transferido a la secuencia Asn-X-Ser/Thr durante la síntesis proteica a medida se trasloca al RE. A partir de esta transferencia, la glucosidasas remueven las 3 glucosas, y una manosidasa del RE remueve un residuo de manosa. El resto de las manosas son removidas en el compartimento cis del Golgi hasta generar Man₅GlcNAc₂Asn. La acción de la enzima GlcNAcT-1 en el compartimento medio del Golgi sobre Man₅GlcNAc₂Asn inicia la primera rama del N-glicano. La α -manosidasa II remueve los 2 residuos de manosa mas externos generando el sustrato para la enzima GlcNAcT-II. El N-glicano biantenarío resultante se extiende posteriormente por la adición de fucosa, galactosa y ácido siálico para generar posteriormente N-glicanos complejos (diversos azúcares, mayor número de ramas, etc). Extraído de Stanlev v cols²⁴³

La presencia de N-glicanos paucimanosídicos (2-3Man) es la característica más sobresaliente de la glicosilación en insectos. También son capaces de sintetizar glicanos oligomanosídicos siendo Man₉GlcNAc₂ la estructura glicánica principal. Poseen además la capacidad de convertir manosa en fucosa. Hasta hace poco tiempo se pensaba que los insectos sólo eran capaces de sintetizar este tipo de glicanos simples, sin embargo se reportó que los insectos podrían tener los primeros pasos biosintéticos para generar glicanos complejos. En insectos por tanto es necesaria la presencia de una β 1,2 N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnTI) (**figura 6C**). Presenta también glicanos difucosilados pero en general posee N-glicanos cuyo GlcNAc inicial está unido a una α 1,3 fucosa. Esta modificación está presente en glicoproteínas de plantas y de algunos insectos y está presente en *Drosophila*²³³.

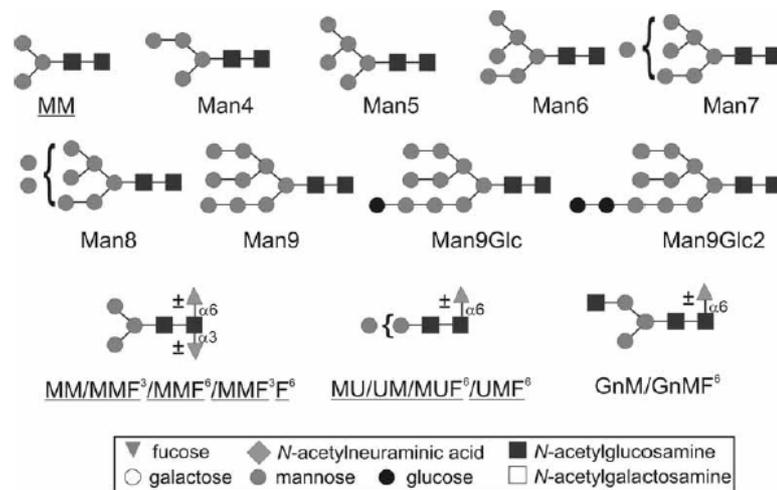


Figura 6C: Estructuras glicánicas encontradas en varias especies de insectos. Subrayado se muestran los glicanos paucimanosídicos.

Si bien los insectos producen principalmente N-glicanos paucimanosídicos también es cierto que esta vía tiene la capacidad de producir N-glicanos complejos e híbridos. Esta característica varía entre especies de insectos pero se ha comenzado a aceptar que la glicosilación en insectos es más compleja que lo que se creía previamente si bien los intermediarios mayoritarios son los N-glicanos paucimanosídicos.

6.1.3. O-glicosilación

La unión de O-glicanos a la cadena polipeptídica se da generalmente a través de residuos de serina o treonina pero a diferencia de lo que ocurre en la N-glicosilación la adición de O-glicanos no requiere una secuencia consenso para la transferencia de estos glicanos a la proteína. La unión inicial del O-glicano a la proteína en general ocurre mediante la adición de GalNAc aunque otros monosacáridos también pueden emplearse como glucosamina y manosa. Los O-glicanos se elongan mediante glicosiltransferasas específicas y la terminación de la cadena de O-glicanos se logra mediante la adición

de monosacáridos específicos como GlcNAc, GalNAc y ácido siálico. La O-glicosilación también está involucrada en la formación de proteoglicanos. Estos consisten en un core al cual se unen uno o varios glucosaminoglicanos (GAGs) los cuales son polisacáridos formados por unidades de disacáridos repetidas (aminoazúcar y ácido urónico), un ejemplo de ello es el heparán sulfato (GlcNAc + ácido glucurónico)²⁴⁴. El otro tipo de O-glicosilación es la de tipo mucina, modificación que se caracteriza por la adición inicial de GalNAc al grupo OH del aminoácido serina o treonina. Esta etapa inicial en la biosíntesis de estos O-glicanos da lugar al antígeno Tn (GalNAc unida a S/T). Estos glicanos están presentes en mucinas, proteínas que se caracterizan por dominios repetidos ricos en prolina, treonina y serina (**figura 6D**). A partir del antígeno Tn puede formarse un core para la O-glicosilación mediante la adición de GlcNAc (core 1), Gal (Antígeno T-core 3) o Gal seguida de la adición de ácido siálico (sialil Tn-core 1 sialilado). Asimismo los core 1 y 3 pueden sufrir la adición de GlcNAc dando lugar a los core de O-glicosilación 2 y 4 (**figura 6D**)²⁴⁸

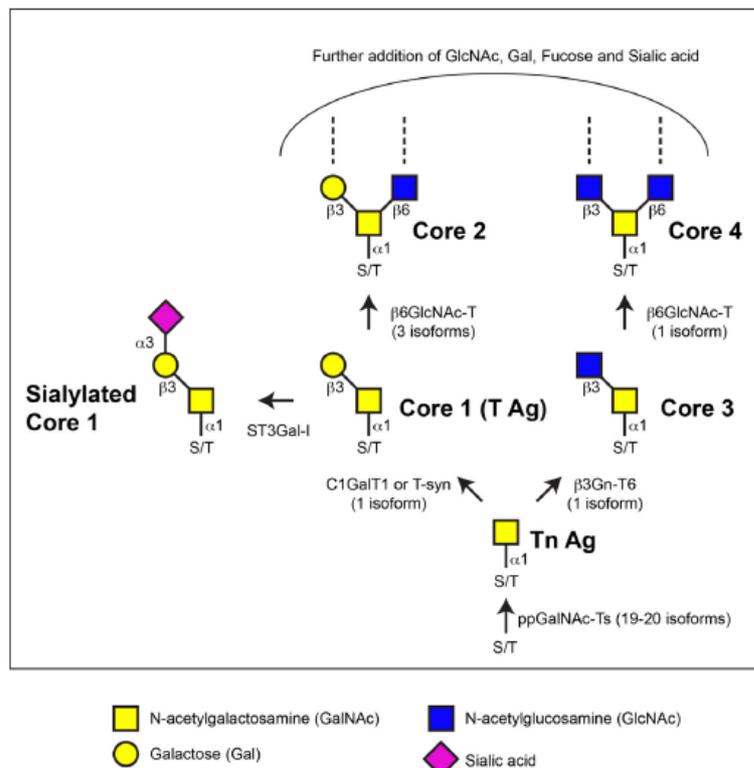


Figura 6D: Biosíntesis de O-glicanos tipo mucina. Extraído de Tran & Ten Hagen²⁴⁸.

Estos core de O-glicanos pueden ser luego modificados o extendidos con la adición de otros azúcares como GlcNAc, Gal, Fuc y SA creando estructuras lineales o ramificadas. Estas últimas se ven en mamíferos y generalmente terminan en ácido siálico. En *Drosophila* sin embargo estos O-glicanos tienden a ser más cortos y consisten principalmente en antígeno Tn y antígeno T^{13, 193}. Por otra parte, se ha demostrado también que en *Drosophila* no habría glicanos que contengan ácido siálico y en su lugar contienen ácido glucurónico como azúcar terminal cargado negativamente¹³.

6.1.4. Análisis de glicanos.

Dada la complejidad de la glicosilación en términos de la gran variedad, el gran número de potenciales combinaciones de glicosilación así como su macro y microheterogeneidad, el análisis de sitios de N- y O-glicosilación en la proteína y en particular el análisis de los glicanos (N y O) requiere de un abordaje experimental empleando varias técnicas complementarias. Para la detección de glicoproteínas glicosiladas en general se emplean métodos de tinción (basados principalmente en el ácido periódico de Schiff, PAS) y métodos basados en la afinidad empleando: lectinas que unen específicamente mono u oligosacáridos (ej lectin-blot), enzimas o anticuerpos (ej anti-Tn)²⁰³. Por su parte el estudio del análisis de la estructura de glicanos puede realizarse mediante cromatografía o espectrometría de masa tanto en la proteína glicosilada o una vez que los glicanos han sido purificados. Este último abordaje es el más preciso para el análisis de N-glicanos. Para ello en primer lugar los glicanos deben ser removidos mediante el clivaje enzimático, en general disponible para N-glicanos, por ej la glucoamidasa o glicosidasa F (PNGase F) corta el enlace entre el primer grupo GlcNAc inicial y el residuo de asparagina (N o Asn) convirtiéndolo en ácido aspártico (D o Asp). Esta enzima corta la mayor parte de N-glicanos (ricos en manosa, híbridos, multisialilados) hasta aquellos formados por estructuras tetra-antenarias así como también oligosacáridos conteniendo residuos sulfatados. La PNGase F no corta si el oligosacárido contiene una fucosa en posición α 1,3 a nivel del GlcNAc inicial del core o si hay GlcNAc individuales unidos a la Asn. En ese caso debería emplearse otra glicosidasa como la PNGase A, teniendo en cuenta que la misma no es eficiente para cortar glicanos presentes en la proteína intacta o en péptidos grandes dado que no posee accesibilidad a los mismos posiblemente por su peso molecular y para emplearla la proteína debe ser previamente digerida con tripsina por ej. Finalmente para proteínas nativas pueden emplearse endoglicosidasas que cortan el N-glicano entre dos GlcNAc pertenecientes al core. Estas enzimas son bastante específicas. Los glicanos también pueden liberarse por oxidación química por ej por β eliminación (O-glicanos) e hidrazinólisis²⁰³.

Luego de la liberación los glicanos deben purificarse de proteínas, sales y detergentes. Para ello existen métodos basados en la capacidad de los oligosacáridos de unirse a perlas de carbono (método de desalting basado en carbono grafito). La elución de los oligosacáridos se realiza con acetonitrilo (ACN) mientras que aquellos cargados también requieren ácido trifluoroacético (TFA). También se pueden emplear membranas Nafion o resinas AG-50 ambas de intercambio catiónico que unen sales, proteínas pero no glicanos. Luego de la purificación se pueden realizar dos abordajes para el análisis de la estructura glicánica: la cromatografía y la espectrometría de masa. Los glicanos pueden ser analizados en su forma nativa, reducidos, permetilados o marcados con fluoróforos. La elección del tipo de marcación (derivatización) está determinada por el método de separación y detección elegidos²⁰³.

Para la cromatografía en general se emplean glicanos marcados fluorescentes que mejoran la detección. La molécula fluorescente se une al extremo reductor del glicano vía una aminación reductiva. Los fluoróforos más usados son: ácido 2-aminobenzoico (2-AA). 2-aminobenzamida (2-AB) y 2-

aminopiridina^{11, 24}. La marcación con una molécula fluorescente permite la detección de glicanos por fluorescencia con alta sensibilidad así como la detección por MS con mayor sensibilidad comparada con los glicanos nativos (dado que la incorporación de grupos funcionales en la molécula aumenta la eficiencia de ionización)¹⁰.

Para la separación cromatográfica los métodos más utilizados son: intercambio aniónico débil (WAX), cromatografía de intercambio aniónico de alta performance con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD, debido a las presencia de grupos redox funcionales), cromatografía líquida de alta performance en fase normal (NP-HPLC), cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), cromatografía líquida con carbón grafito poroso, cromatografía en fase reversa. El método cromatográfico más utilizado es el NP-HPLC (es considerado como un método con alta reproducibilidad y alta resolución). En este método se emplea un estándar externo de dextrano parcialmente hidrolizado derivatizado con 2-AB y el tiempo de retención del glicano desconocido (en relación al estándar) es convertido en unidades de glucosa GU. Este valor de GU es comparado en una base de datos de valores experimentales para obtener la asignación de estructuras preliminares para el glicano en cuestión⁴⁴. Esta cromatografía presenta la desventaja de que puede poseer baja resolución frente a algunos glicanos. La secuencia del glicano se valida posteriormente con un arreglo de exoglicosidasas, esto es mediante la aplicación secuencial de exoglicosidasas específicas que corten monosacáridos terminales a partir del extremo no reducido de la glicoproteína. Las exoglicosidasas comúnmente utilizadas son: α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -manosidasa, α -sialidasa, β -N-acetilhexosaminidasa y α -L-fucosidasa (**Figura 6E**)²¹³.

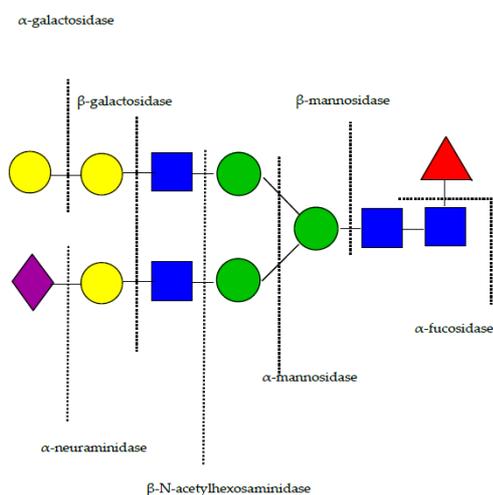


Figura 6E: Esquema de la digestión con exoglicosidasas. Extraído de Mauko¹⁶⁸

Actualmente también se utiliza la separación de glicanos derivatizados con 2-AB mediante HILIC en fase estacionaria con funcionalidad amida dado que existen bases de datos para la identificación de glicanos basada en las propiedades de retención mediante esta técnica⁴⁴.

Por su parte el análisis de glicanos por MS se basa en la ionización, fragmentación e identificación por espectrometría de masas de los fragmentos. Las dos fuentes principales de ionización para el análisis de oligosacáridos son el ESI (electrospray ionization) y el MALDI (desorción/ionización láser asistida por matriz). Antes de ser procesada la muestra debe ser desalada para evitar el enmascaramiento de la ionización. En MALDI (generalmente acoplado a un analizador TOF) el analito es ionizado a través de la matriz generalmente a un único ion con sodio $[M+Na]^+$. Distintas matrices se aplican para el trabajo con glicanos pero la más utilizada es la de ácido 2,5-dihidrobenzoico (DHB) la cual promueve los clivajes en el anillo a diferencia de la matriz de ácido α -ciano-hidroxicinnámico (CHCA) que promueve el corte de los enlaces glicosídicos.

En la espectrometría de masa la ionización debe ser considerada, a pesar de que la mayoría de los análisis proteómicos y glicómicos se realizan en modo reflector positivo (positive ion mode) los motivos glicánicos son diversos y si alguno contiene ácido siálico la ionización podría no suceder. En ese caso puede emplearse el modo reflector negativo (negative ion mode) pero el análisis de fragmentación (MS/MS realizados en modo positivo) no podría realizarse. Para trabajar en este modo existen varias estrategias, entre las que destacamos la desialilación y la permetilación (lo cual estabiliza los residuos de ácido siálico). La fragmentación de los glicanos se realiza ya sea clivando tanto los enlaces glicosídicos entre monosacáridos o los enlaces dentro de un anillo monosacárido⁶⁵

Pese a la gran cantidad de tecnologías disponibles la caracterización completa de glicanos por MS es compleja: no sólo la cantidad de glicanos es limitante sino también la estructura isobárica de muchos monosacáridos isómeros (con los mismos PM que difieren en el enlace y ramificación) impide la identificación específica basada solamente en el número de átomos de C. La fragmentación de los mismos colabora pero es necesario emplear varias técnicas en simultáneo. Finalmente para establecer los sitios de glicosilación, en el caso de la N-glicosilación como se mencionó anteriormente la remoción de un motivo N-glicánico por la PNGase F (o A) resulta en la conversión de la Asn en Asp con un cambio en una unidad de masa por cada sitio de N-glicosilación. Por tanto cuando una proteína deglicosilada es digerida con tripsina, los péptidos que están unidos al motivo glicánico serán 1Da más pesados que la masa teórica esperada. A su vez sometiendo estos péptidos a fragmentación cada péptido que posea D en lugar de N se identifica como previamente unido a un motivo glicánico.

La glicosilación aumenta la diversidad del proteoma a niveles que no se comparan con otras modificaciones postraduccionales. Esto se ve favorecido porque cada aspecto en la glicosilación puede modificarse incluyendo: el sitio de unión del glicano, el tipo de azúcar unido a una proteína particular, la estructura del glicano (cadenas ramificadas o no ramificadas), el largo del glicano. La glicosilación a diferencia de la transcripción o la traducción no requiere de molde (pero si de enzimas presentes en la célula hospedadora) y por tanto cada evento de glicosilación no tiene por qué seguir los mismos pasos. La glicosilación no es una simple modificación sino un conjunto de modificaciones en el cual un sitio de glicosilación único en un péptido puede tener un número de isoformas de glicano con distintos largos de

cadena y ramas asociadas. A nivel analítico debido a esta heterogeneidad no hay un cambio de masa único asociado con la glicosilación como en otras modificaciones y de hecho los péptidos modificados aparecen como una curva amplia en lugar de aparecer como picos discretos en el espectro de MS.

6.1.5. Glicosilación en proteínas de fusión virales.

Los virus utilizan la glicosilación de la célula hospedera para modificar proteínas codificadas por el genoma viral y presentes en la superficie de los viriones. Este proceso finalmente puede impactar en la estabilidad, antigenicidad e invasión de la célula hospedera por parte de estas glicoproteínas virales. La N-glicosilación de proteínas virales de superficie promueve un correcto plegamiento de las proteínas y su tráfico posterior empleando chaperonas y factores de plegamiento del hospedero. La alteración de un sitio o sitios de glicosilación puede impactar dramáticamente en la supervivencia y transmisibilidad del virus. Pequeños cambios pueden alterar el plegamiento y la conformación, afectando porciones de toda la molécula^{145, 178, 242}. A su vez cambios en la glicosilación pueden afectar la interacción con receptores y generar que un virus sea mejor reconocido por factores innatos del sistema inmune y menos reconocidos por anticuerpos afectando la replicación viral e infectividad.

En este sentido el grado de glicosilación de las proteínas virales es variable, no sólo en cuántas glicosiladas están sino también en la estructura de los glicanos unidos. En el virus del dengue por ejemplo la proteína E posee pocos sitios de glicosilación mientras que la proteína gp160 de HIV-1 (en particular gp120) es altamente N-glicosilada siendo una de las funciones de esta elevada glicosilación la evasión de la respuesta inmune.

Como se mencionó anteriormente la glicosilación puede participar en los aspectos funcionales de las proteínas virales como en el caso de la proteína F de paramyxovirus dado que determinados sitios de glicosilación son esenciales para la actividad biológica de la proteína. El otro papel importante asignado a la glicosilación durante el ciclo replicativo es en la entrada del virus a la célula donde tiene lugar la interacción con los receptores celulares que en muchos casos son glicoproteínas. Glicanos utilizados como receptores celulares son por ejemplo el ácido siálico (Influenza, Sendai) y proteoglicanos tipo heparán sulfato (HSV-1, HCMV y HRSV). La alteración en los sitios de glicosilación puede tener consecuencias dramáticas para los virus^{145, 242} pudiendo afectar el plegamiento de las proteínas, su conformación e incluso zonas distantes al sitio de glicosilación por enmascaramiento o cambios conformacionales. Pese a que la incorporación de carbohidratos puede enmascarar epitopes, la pérdida de alguno de ellos puede resultar en un empaquetamiento de las regiones de la glicoproteína involucradas en epitopes de neutralización, reduciendo la accesibilidad y por tanto facilitando el escape inmune²⁸⁴. Patrones alterados de glicosilación también pueden contribuir al escape de respuesta de células T²⁴⁰.

6.1.5.1 HA y Env HIV-1: dos de las glicoproteínas virales más estudiadas a nivel glucosídico

La **proteína HA** del virus Influenza es una glicoproteína viral clase I presente en la superficie de la envoltura viral (junto con NA) y media la entrada del virus a la célula hospedera. Esta proteína contiene básicamente N-glicanos y presenta 6 sitios potenciales de N-glicosilación.

El número de sitios de glicosilación en HA varía entre subtipos y parece incrementar en los años siguientes a una pandemia. Estos glicanos adicionales y alteraciones en su localización dan lugar al enmascaramiento y desenmascaramiento de epitopes^{274, 281, 282}. Los glicanos presentes, además de derivar del hospedero (y ser por tanto pobremente inmunogénicos) son heterogéneos (complejos, híbridos y oligomanosídicos) y los sitios de glicosilación son utilizados generalmente de forma diferencial en virus de distintos clados o subtipos^{99, 100}. En esta proteína los glicanos claramente participan de la evasión de la respuesta inmune basándose en las altas tasas de mutación y la variación en la secuencia. Esto es lo que se cree que ocurre en el mecanismo de deriva antigénica en virus H3N2 donde sucesivos eventos de glicosilación han creado un escudo de glicanos que evita la accesibilidad y el reconocimiento por anticuerpos. El número de sequons (secuencias N glicosilables NXS/T) en la hemaglutinina del virus pandémico H3 aumentó de 6 a 10 desde su ingreso a la población en 1968²⁴¹ y se asume que este aumento genera una proteína más refractaria a los anticuerpos y si bien estos cambios pueden afectar la unión al receptor, no afectan la fusión viral.

Asimismo los glicanos cercanos al sitio de unión al receptor son cruciales para la replicación y liberación del virus en un mecanismo donde la glicosilación modula la afinidad de unión y controla la especificidad del receptor^{62, 133, 260, 288}.

Env-HIV-1 es la glicoproteína de superficie presente en HIV-1 formada por las subunidades gp120 y gp41 que se ensamblan en un trímero de heterodímeros como se describió en el capítulo 5..

Con respecto a la glicosilación gp120 de HIV es la proteína más glicosilada de las proteínas virales presentes y una de las mayormente glicosiladas en la naturaleza¹⁸⁷, dado que tiene un promedio de 24 sitios potenciales de N glicosilación en su secuencia consenso que abarca 500 residuos siendo el 50% de su masa molar contribuida por carbohidratos.

La glicosilación de gp120 puede cambiar la exposición de epitopes para anticuerpos neutralizantes. El número de sequons en Env de HIV y SIV varía enormemente entre individuos infectados y esta variación constituye un mecanismo de escape inmune durante el curso de una infección por estos retrovirus³⁶. Inicialmente la región altamente glicosilada de la proteína gp120 env se llamó la cara inmunológicamente silenciosa y se estableció que los motivos de carbohidratos aparecían como antígenos propios para el sistema inmune dado que se utilizaba la maquinaria del hospedero. Este escudo de glicanos formado (o glycan shield)²⁶⁹ reducía la antigenicidad de una gran parte de la superficie de gp120 y esto se cumple para varios de los N-glicanos presentes en gp120. El escudo de glicanos formado a partir de mutaciones y adición posterior de N glicanos podría dar protección contra los anticuerpos neutralizantes del hospedero durante el curso de la infección²⁶⁹. La adición de glicanos

puede otorgar un mecanismo de evasión humoral que no afecte la unión del virus a la célula hospedera. El escudo de glicanos resultado de la acumulación de cambios en distintos individuos generando el escape de anticuerpos neutralizantes⁸³ representa un mecanismo de persistencia viral a pesar de aumentar el repertorio de anticuerpos. Es interesante destacar sin embargo que no todas las configuraciones son permitidas en el escudo de glicanos debido a que muchas veces existen restricciones estructurales.

Sin embargo la idea de que los glicanos sólo funcionaban como escudo de glicanos protegiendo regiones conservadas de gp120 era parcialmente correcta dado que posteriormente se determinó que una proporción de N-glicanos sería vulnerable al reconocimiento de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro (bnAbs o broadly neutralizing antibodies). Se observó entonces que algunos glicanos de la Env de HIV-1 poseen características que los hacen inmunogénicos y dan lugar al desarrollo y amplificación de linfocitos B que median su reconocimiento^{147, 262, 263}. Más específicamente se describió que los glicanos de la Env de HIV son densamente empaquetados lo que limita enormemente el procesamiento de carbohidratos individuales por la maquinaria de glicosilación de la célula hospedera durante la maduración del virus y deja una alta proporción de glicanos en la Env como glicanos de oligomanosa inmaduros (IOM- immature oligomannosidic glycans). Estos representan del 46-98% del total de glicanos presentes en la superficie de Env. En partículas nativas de HIV se encontraron principalmente glicanos incompletamente procesados del tipo Man₅₋₉GlcNac₂. Este proceso es atípico dado que la N-glicosilación en mamíferos está estrictamente compartimentalizada y sigue una vía de procesamiento unidireccional y altamente ordenada. Esto podría explicarse: 1) por impedimentos estéricos que impiden el reconocimiento del sustrato por parte de las glicosidas / glicosiltransferasas. En este sentido al parecer la proteína Env de HIV evita el procesamiento de glicanos residente en el Golgi-medio al menos en parte a través de las consecuencias estéricas causadas por la oligomerización; 2) porque la envoltura viral está físicamente secuestrada de los compartimientos que contienen dichas enzimas. A diferencia de lo que sucede con los epitopes proteicos existe una alta conservación en algunos residuos glicanos expresados en gp120 de HIV derivados de clados diferentes.

Estos glicanos se localizan a nivel del dominio externo del monómero en el lado opuesto al sitio de unión a CD4 y también en dominios de trimerización de gp120. Pese a que estos glicanos inmaduros oligomanosídicos derivan de la célula hospedera aparecen como no propios al sistema inmune debido a su denso empaquetamiento y a la naturaleza de los mismos representando motivos no encontrados usualmente en las glicoproteínas del hospedero.

Como se mencionó anteriormente muchos glicanos son altamente conservados en gp120. Por ej el anticuerpo neutralizante de amplio espectro 2G12 está dirigido contra un epitope que contiene glicanos ricos en manosa. Este bnAb, junto con otros 2 (uno dirigido contra el sitio de unión a CD4 y el otro dirigido contra una región cercana a la membrana (MPER) en gp41) fueron aislados de pacientes denominados neutralizantes de elite (1% de los pacientes infectados)^{18, 19, 33}. El epitope esta compuesto

básicamente por carbohidratos, es dependiente de manosa y esta región es altamente conservada en gp120. La conservación de este epítipo en gp120 sugiere un rol funcional en la infección y podría relacionarse con la unión del HIV al receptor de manosa, DC-SIGN u otras lectinas facilitando la entrada en la célula hospedera.

Los parches de glicanos IOM son blanco de varios bnAbs no solo 2G12 sino también PGT128 y PG9 (asociados a los loops variables V1/V2 y V3)^{25, 261, 262}. Se han obtenido estructuras del complejo 2G12 con motivos $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ demostrando que 4 carbohidratos pueden interactuar simultáneamente con el paratope y con distintas afinidades y que es la multivalencia lo que determina la gran afinidad del anticuerpo⁴⁰. Sin embargo la elucidación exacta del epítipo para 2G12 aun no se ha determinado y quizás este sea el motivo por el cual si bien se han intentado mimetizar estos glicoconjugados de forma recombinante no se lograron generar verdaderos bnAbs aunque se generen anticuerpos.

A su vez y en este sentido se demostró que el perfil de N-glicosilación de gp120 está profundamente influenciado por las células donde esta proteína se sintetice, de qué origen son estas células y el tipo de actividad metabólica que presentan, en particular en lo referente a glicanos complejos. Por este motivo la glicosilación diferencial de la misma cadena aminoacídica afecta de forma significativa la unión de Env a anticuerpos presentes en sueros de pacientes infectados por HIV²¹⁸.

Por otra parte el análisis realizado de partículas obtenidas a partir de células de pacientes infectados muestra un perfil totalmente diferente al de las proteínas recombinantes codificadas por plásmidos que se expresan en los mismos tipos celulares, indicando que las proteínas virales que van a formar una partícula y las proteínas recombinantes individuales podrían seguir diferentes caminos intracelulares transitando diferentes regiones del aparato de Golgi produciendo finalmente glicoproteínas con perfiles de glicosilación distintos⁶⁷. En la gp120 de HIV-1 los glicanos alrededor de los loops variables y el sitio de unión al receptor están completamente procesados como glicanos complejos en la proteína gp120 recombinante. Sin embargo, Doores et al⁶⁷ encuentran que al analizar viriones nativos obtenidos a partir de células de pacientes infectados el patrón de glicosilación es más simple: >98% de los glicanos son $\text{Man}_5\text{-}9\text{GlcNAc}_2$, es decir que no muestran la actividad enzimática residente a nivel de las vesículas del Golgi. Es claro entonces que la glicosilación de HIV es totalmente divergente en comparación al perfil de la célula que infecta. El bloqueo hacia el procesamiento de N-glicanos complejos tendría lugar a nivel de la actividad GnT I del Golgi. En este sentido es importante la tasa de glicanos ricos en manosa vs glicanos complejos la cual es específica del tipo de célula y dependiente del estado metabólico durante la síntesis de gp120 Env. Esta variación afecta el reconocimiento de anticuerpos presentes en un suero policlonal.

Los sitios de glicosilación pueden preservarse para enmascarar sitios de anticuerpos neutralizantes pero la eficiencia en la replicación y el acceso a los sitios de unión al receptor pueden ejercer de fuerza opositora, de hecho varios sitios pueden perderse en gp120 sin perder la

infectividad¹⁹⁶. La gp120 posee un alto contenido en manosas en posiciones fijas en la env de HIV mientras que los glicanos complejos se hallan en posiciones que son más variables. Esto podría ocurrir dado que las interacciones de estos oligosacáridos ricos en manosa en HIV con DC-SIGN y otra lectinas tipo C tendrían un papel importante en la infectividad del virus¹⁵³ sugiriendo que podría haber un costo en el fitness si se disrumpe esta orientación.

Con esto es posible observar la dualidad que existe con respecto a la glicosilación en HIV-1, la glicosilación media la evasión inmune pero también genera una respuesta inmune pronunciada en zonas que el virus no puede modificar.

6.1.5.2 Env-BLV

Como se describe en el capítulo 5 la proteína Env de BLV se sintetiza como precursor gp72 (de 515 aminoácidos) el cual es modificado postraduccionalmente en particular por la adición de N-glicanos. La subunidad gp51 (51KDa) de BLV es la que presenta mayor cantidad de sitios potenciales de N-glicosilación. Esta proteína posee un core proteico de 268 aminoácidos (30KDa) y un componente glucídico de aproximadamente 21KDa representando un 40% del peso total de la proteína.

Si bien es una proteína altamente glicosilada el porcentaje de glúcidos incorporados (40%) es bastante menor al que incorpora la gp120 de HIV-1 (60%) en relación al esqueleto proteico. De todos modos y como se mencionó anteriormente estas modificaciones postraduccionales son sumamente relevantes dado que el perfil de glicosilación de las proteínas de superficie de los retrovirus se relaciona con su función en la penetración viral, en su actividad inmunogénica por lo que es importante para el diagnóstico y para eventuales estrategias de vacunación. Al igual que en el resto de las proteínas Env retrovirales la mayor contribución de glicanos se produce por N-glicosilación.

No existe hasta el momento ningún trabajo que aborde esta problemática a nivel de la gp51 de BLV. Los trabajos previos intentaron establecer el componente glucídico de Env en particular gp51 mediante abordaje empleando lectinas pero no desde un punto de vista analítico y que permitiera analizar cada uno de los sitios de N-glicosilación potenciales. Se postula que la adición de carbohidratos a la subunidad SU de BLV potencialmente crea la estructura de “glycan shield” confiriendo resistencia a los virus frente a la respuesta inmune del hospedero²⁶ y modular la unión del virus a la membrana celular. Se desconoce sin embargo si la Env de BLV al igual que la de HIV-1 posee motivos glicánicos reconocidos por anticuerpos neutralizantes. Recientemente se han desarrollado estrategias para analizar la glicosilación en SU mediante la inhibición farmacológica de distintas vías de glicosilación, la interferencia con la unión de glicanos y la alteración de sitios de N glicosilación mediante mutagénesis dirigida en provirus infeccioso. Este es un trabajo abordado desde el punto de vista funcional y al día de hoy no hay resultados de relevancia excepto que la mutagénesis de los potenciales sitios de N-glicosilación da lugar a virus recombinantes defectuosos en la infectividad en particular en la capacidad

de formar sincicios excepto el sitio correspondiente a la N230 que sorprendentemente generaba mutantes con una elevada capacidad para formar sincicios (siendo un mutante hiperreplicativo)⁵⁶.

6.2) OBJETIVO ESPECIFICO

Con respecto a este objetivo específico se busca profundizar en el estudio analítico de los sitios de N-glicosilación y la composición de N-glicanos con el fin de contribuir al desarrollo de futuros trabajos que evalúen estas proteínas en el marco de una infección viral así como una correcta disposición de glicanos en el espacio de lograrse la elucidación de la estructura.

Para comenzar el análisis glicoproteómico de la proteína Env de BLV las preguntas planteadas fueron las siguientes: i) cuáles son los sitios potenciales de N- y O- glicosilación de la proteína Env de BLV? ii) es posible determinar si los sitios están glicosilados mediante un abordaje glicoproteómico? iii) es posible analizar el componente glicánicos en las proteínas Env-BLV nativa y recombinante? iv) es diferencial la glicosilación entre la proteína nativa y la proteína recombinante? v) afectan los glicanos el reconocimiento por parte de sueros seropositivos para BLV?

6.3) ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para alcanzar este objetivo específico las actividades realizadas fueron las siguientes:

6.3.1. Predicción mediante análisis *in silico* de sitios de N- y O- glicosilación potenciales en la proteína Env-BLV.

Para la predicción de sitios de N- y O- glicosilación se emplearon los programas NetNGlyc 1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) y NetOGlyc 3.1 (www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/). Se consideraron como potenciales todos los sitios que mostró el programa independientemente que fueran considerados positivos o negativos. El umbral que utilizan estos programas es de 0,5 y muchos de estos sitios quedan en el límite por lo tanto es necesario confirmarlos y evaluar si están o no glicosilados. En estos motores de búsqueda se incluyó la secuencia de la proteína Env-BLV nativa (secuencia de la cepa FLK-BLV) así como de las proteínas recombinantes descritas en el capítulo II: srEnv-BLVwt (proteína Env-BLV recombinante soluble wt) y srEnv-BLVmut (proteína Env-BLV recombinante soluble mutada en el sitio de furina).

6.3.2. Análisis de la presencia de glicosilación en la proteína Env-BLV obtenida a partir células FLK-BLV.

6.3.2.1. Análisis de la presencia de glicosilación en la proteína Env-BLV obtenida a partir de partículas virales purificadas.

La preparación de partículas virales purificadas de BLV fue analizada por

2D SDS-PAGE/WB empleando anticuerpos dirigidos contra la proteína gp51; en paralelo se corrieron geles bidimensionales para tinción con CCB o AgNO₃ cuyos spots fueron posteriormente analizados por espectrometría de masa como se describió anteriormente (capítulo 1 proteoma).

6.3.2.2. Análisis de la presencia de glicosilación en la proteína gp51 purificada a partir de sobrenadante de células FLK-BLV, se realizó mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados para análisis posterior por 2D SDS-PAGE y espectrometría de masa. Para la purificación de la proteína gp51 se utilizaron 250-500mL de sobrenadante de cultivo de FLK-BLV clarificado/filtrado. El sobrenadante fue cargado en una columna de IMAC (immobilized-metal affinity chromatography) la cual previamente fue preparada con buffer PBS conteniendo ZnSO₄ 1M, lavando la columna posteriormente con H₂O. Esta IMAC con iones Zn²⁺ fue empleada para la purificación de gp51 ya que esta proteína contiene una región de unión a Zn²⁺. La columna fue equilibrada con 10 CV (volumen de columna) de buffer PBS que fue utilizado como buffer de unión. El sobrenadante fue cargado a la columna con un flujo de 1mL/min seguido del lavado de la columna con 20CV de PBS. Finalmente la elución fue realizada empleando 10CV de PBS-EDTA 300mM. Luego de la IMAC se colectó la fracción conteniendo la proteína y se volvió a unir esta fracción a la columna realizando un lavado con gradiente de NaCl 1M con 10CV (desde 0-100% B) a un flujo de 0,5mL/min. Luego se realizó un lavado con PBS y posteriormente la proteína se eluyó en gradiente de PBS-EDTA 300mM (10CV 0-100% B). Finalmente la purificación se completó mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) utilizando una columna Superdex 200 (10/300) en AKTA. Todas las fracciones se evaluaron por SDS-PAGE/WB utilizando el AcMo α -gp51 y se colectaron las fracciones correspondientes a la proteína según la reactividad presente y finalmente se polearon. Con esta fracción se realizaron geles bidimensionales para tinción con CCB en paralelo junto con 2D SDS-PAGE/WB empleando el AcMo dirigido contra gp51 para el análisis posterior de spots seleccionados para su identificación por MS.

6.3.3. Evaluación de la reactividad de sueros bovinos seropositivos para Env-BLV en presencia y ausencia de glúcidos.

6.3.3.1. Ensayo de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) en presencia de PNGase F. Para este ensayo se utilizó la proteína srEnv-BLVmut (expresada y purificada como se detalla en el capítulo 5 de esta tesis) glicosilada y deglicosilada. La deglicosilación se realizó sin desnaturalización previa. Se deglicosilaron 100ug de proteína [1,42 μ g/ μ L] utilizando el siguiente protocolo (siguiendo las indicaciones del fabricante): 10 μ L G7 (10x)+ 70,4 μ L proteína (100 μ g)+ 1 μ L PNGase F (500U/ μ L, New England Biolabs-NEB)+18,6 μ L H₂O (Vf= 100 μ L). Incubación ON a 37°C.

Ambas proteínas recombinantes se emplearon como antígeno en la técnica de ELISA utilizando placas de 96 pocillos Nunc-Maxisorp. Los pocillos se sensibilizaron con 5 μ g/mL de proteína por pocillo (5 μ g/well) diluida en buffer carbonato/bicarbonato (pH9) toda la noche a 4°C. Se lavó con PBS-Tween20 0,1% (5 veces). Los pocillos se saturaron luego con PBS-leche 5%-Tween20 0,2% durante 1 hora a 37°C. Se repitió el mismo esquema de lavado y se incubaron con 100 μ L de los sueros de campo diluidos

1/500, positivos: 616, 677, 686, 718, 730 y negativos: 656 y 659 durante 1h a 37°C diluidos en PBS-leche 5%-Tw20 0,2%. A su vez se incubaron pocillos con suero de ratones inmunizados con la proteína srEnv-BLVmut recombinante (suero policlonal Env3 como se describió en el capítulo 2 de la tesis) diluida 1:5000 así como con el anticuerpo monoclonal BLV1 (VMRD, USA) dirigido contra un epítipo conformacional de gp51 (diluido 1:1000) ambos diluidos en PBS-leche 5%-Tw20 0,2% durante 1h a 37°C. Se repitió el mismo esquema de lavado y los pocillos se incubaron con 100µL del conjugado correspondiente: anti-bovino HRP (1:10000) o anti-ratón HRP (1:5000) diluidos en PBS-leche 5%-Tw20 0,2% durante 45min a RT. Finalmente se lavó la placa 5 veces con PBS-Tw20 0,1% y la reacción se reveló con el sustrato TMB (8.7ug/mL) en buffer acetato 0.1M pH 5. El desarrollo de color se detuvo empleando H₂SO₄ 3N y se midió la absorbancia a 450nm (Multiskan FC Microplate Reader Thermo Scientific).

6.3.3.2. Ensayo de ELISA en presencia de metaperiodato de sodio. El metaperiodato de sodio es un oxidante suave el cual en medio levemente ácido oxida grupos cis-glicol de carbohidratos en grupos aldehído reactivos. Para ello se sensibilizaron placas de ELISA Nunc-Maxisorp con 5ug/mL de la proteína srEnv-BLVmut desalada, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente los pocillos se lavaron con buffer acetato 50mM pH 4,5 y se incubó 1h a RT en oscuridad con metaperiodato de sodio 20mM diluido en buffer acetato. Luego se lavó con buffer acetato, se bloquearon los grupos aldehído con PBS-glicina 1% durante 30 minutos y finalmente se realizó un lavado con PBS-Tween 0.1%. A continuación se realizó el ELISA con el protocolo descrito en 3.3A empleando los sueros bovinos seropositivos: 594, 616, 677, 686, 730; los sueros bovinos seronegativos: 656, 659, 717, el suero murino obtenido de ratones inmunizados con la srEnv-BLVmut (suero Env3) y el AcMo BLV1 (VMRD, USA).

6.3.4. Evaluación de la reactividad diferencial de lectinas frente a las proteínas Env-BLV nativa y srEnv-BLVmut.

6.3.4.1. Análisis de la presencia de glicosilación en la proteína Env-BLV nativa obtenida a partir de partículas virales purificadas de BLV. Se realizaron ensayos con lectinas biotiniladas (lectin-blot) con el fin de establecer qué tipo de carbohidratos estaría presente en la proteína. Para ello 5 (correspondiente a la muestra de partículas virales purificadas de BLV) fueron cargados en un gel de poliacrilamida al 12% y posteriormente transferidos a una membrana de nitrocelulosa como se describe anteriormente (capítulo 1). La membrana fue bloqueada con PBS-BSA 3% ON a 4°C. Una vez bloqueada, la membrana fue cortada en tiras para realizar la incubación con las lectinas biotiniladas individuales. Se emplearon las siguientes lectinas: Uea-1, PNA, ECA, HPA y WGA cuya especificidad y nombre científico se describen en la tabla 6.1. Las lectinas biotiniladas se emplearon en una concentración de 1ug/mL (diluidas en PBS-CaCl₂ 10mM) y se incubaron durante 1h a 37°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,1% (10min c/u) previo a la incubación con avidina-peroxidasa (diluida 1:2000 en PBS-BSA 1%) 45min a RT. Se repitió el mismo esquema de lavados. Finalmente se agregó el sustrato

quimioluminiscente ECL. Los films revelados y fijados se escanearon y analizaron con un software de análisis de imágenes.

Tabla 6.1: Lista de lectinas biotiniladas empleadas en los ensayos de lectin- blot y ELISA

Lectinas	Abreviat	Especificidad
<i>Canavalia ensiformis</i> -FITC	Con A	α -man, α -glc
<i>Ulex europeus</i> -FITC	UEA-1	α -L-fucose
<i>Arachis hypogaeae</i> -FITC	PNA	β gal(1 \rightarrow 3)galNAc
<i>Triticum vulgare</i> -FITC	WGA	(glcNAc) ₂ , NeuNAc
<i>Vicia villosa</i>	VV	GalNAc α -Ser/Thr (Tn-Antigen)
<i>Sambucus nigra</i>	SNA	Neu5Ac α 2-6Gal(NAc)-R
<i>Euonymos europaeus</i>	EEA	Gal α 1-3(L-Fuca α 1-2)Gal β 1,3/4- β -GlcNAc; Gal α 1-3Gal
<i>Erythrina cristagalli</i>	ECA	β gal(1 \rightarrow 4)glcNAc
<i>Helix pomatia</i>	HPA	galNAc (N-acetyl- α -D-galactosamine)

6.3.4.2. Ensayo con lectinas formato ELISA empleando la proteína srEnv-BLVmut. Para este ensayo se utilizó proteína srEnv-BLVmut glicosilada [1,1mg/mL] desalada. Esta proteína se diluyó en buffer carbonato/bicarbonato (pH9) para sensibilizar las placas con 10ug/pocillo durante 1h a 37°C. Se emplearon placas de 96 pocillos Nunc-Maxisorp. Se lavó la placa con PBS-Tween20 0,1% (3 veces). Los pocillos se saturaron luego con PBS-BSA 1% durante 45min a 37°C. Se repitió el mismo esquema de lavado y se incubaron con 100 μ L de la dilución de lectinas. Todas las lectinas fueron diluidas en PBS-CaCl₂ 10mM. A su vez a las lectinas ConA y PNA se les agregó el catión Mn²⁺. Las lectinas biotiniladas utilizadas figuran en tabla 6.1. Las lectinas se incubaron durante 1h a 37°C y se repitió el mismo esquema de lavado. Finalmente se incubó 30min a 37°C con streptavidina conjugada a IRDye800 (Molecular Probes) se lava 5 veces con H2O destilada y se visualiza mediante un Odyssey imager a 800nm (Li-COR Biotechnology, Lincoln).

6.3.5. Identificación mediante abordaje glicoproteómico de la glicosilación en la proteína srEnv-BLVmut.

Para el tratamiento con PNGaseF de la proteína srEnv-BLVmut total así como de la fracción purificada por SEC correspondiente a monómero y oligómero la proteína fue inicialmente desnaturalizada, previo a la incubación con PNGase F, con una solución conteniendo 5% SDS y 10% en buffer fosfato 50mM durante 10min a 95-100°C llevándose luego de la incubación a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó Nonidet P-40 (NP-40) a una concentración final de 1% antes de agregar la PNGase F. Los N glicanos se digirieron con 500U de PNGase F en buffer fosfato pH 7,6 ON a 37°C con agitación. El procedimiento de posterior de 1D y 2D electroforesis y espectrometría de masa es

el mismo que el descrito en el capítulo 1 de la tesis. En estos ensayos se emplearon tiras de gradiente de pH tanto 3-11NL como 4-7L.

6.3.6. Asignación de N-glicanos presentes en la proteína srEnv-BLVmut y la Env-BLV nativa.

Esta actividad específica se realizó en colaboración con Gleysin Cabrera (Laboratorio de Glicobiología, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba) y con la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del IPMON. Para analizar el componente N-glucídico de las proteínas Env-BLV nativa y recombinante mutante (100ug de proteína mínima) fueron tratadas con PNGase F según actividad específica 5.

Los N-glicanos se colectaron y purificaron posteriormente mediante precipitación alcohólica de proteínas empleando etanol al 70%. Posteriormente los oligosacáridos no derivatizados se purificaron mediante columna grafitada (GlycoClean H, Prozyme, Cat. GKI 4025). La columna se equilibró con 3mL solvente B (50% v/v acetonitrilo y 0,1% de ácido trifluoracético) y 6mL solvente A (5% v/v acetonitrilo y 0,1% ácido trifluoracético). Posteriormente se aplicó la muestra, se lavó con H₂O/solvente A y finalmente se eluyó con 4 volúmenes de 0,5mL de solvente B dejando eluir cada fracción antes de aplicar la siguiente. Finalmente los eluatos se secaron en centrifuga evaporadora al vacío (speedVac). Se colectaron los N glicanos y se marcaron con 2AB (2-aminobenzamida) (marcador fluorescente) para separarse posteriormente por HPLC. Previo al marcaje se realizó una curva de calibración con maltopentacárido para cuantificar los oligosacáridos marcados con 2AB midiendo el área correspondiente a diferentes cantidades de muestra. Esta curva se empleó posteriormente para la cuantificación de los N-glicanos en estudio. Brevemente los glicanos se disolvieron en una solución 0,35M de 2AB en DMSO-ácido acético glacial (7:3, v/v) conteniendo cianoborohidruro de sodio (1M) incubándose la reacción a 65°C durante 2h. Luego de la incubación la mezcla marcada se aplicó a un papel Whatman (10cm x 3cm ancho) y se realizó una cromatografía en papel utilizando acetonitrilo a RT durante 90min. Se cortó el spot fluorescente empleando un transiluminador y los N-glicanos marcados se eluyeron del papel lavando 4 veces con agua para finalmente colocarlos en speed vac a RT. La separación de los N-glicanos derivatizados se realizó por NP-HPLC (fase estacionaria normal) empleando una columna de fase normal Amida 80 y la detección se realizó mediante fluorescencia a $\lambda_{ex}=330\text{nm}$ y $\lambda_{em}=420\text{nm}$. Las condiciones de gradiente fueron las siguientes: solvente A-50mM formiato de amonio pH 4,4 y solvente B-acetonitrilo.

Tabla 2. Método de separación de los derivados 2AB (180 min)

Tiempo(min)	Flujo(mL/min)	Formiato	Acetonitrilo
0	0.4	20	80
132	0.4	53	47
135	0.4	100	0
137	1.0	100	0
142	1.0	100	0
145	0.4	100	0
147	0.4	20	80
167	0.4	20	80
Tiempo de corrida: 167 min			

Adaptado de Gleysin Cabrera "Manual de Procedimientos-Uruguay" 2013

Los tiempos de retención de los N-glicanos fueron calculados en GU (Glycan Units, unidades de glucosa), relativos a la mezcla de oligómeros de glucosa con grado de polimerización desde 1-15 a partir de un estándar de dextrano hidrolizado. Estas unidades de glucosa (GU) se determinaron estandarizando para cada corrida con un patrón de oligómeros de glucosa obtenidos de un hidrolizado parcial de dextrano. La cantidad de cada oligosacárido presente en las muestras fue calculado midiendo las áreas de picos individuales y luego comparando estos valores con los valores obtenidos de una curva estándar 2AB con maltopentasacárido. Para la asignación de estructuras preliminares los valores de GU experimentales se comparan con los valores reportados en la GlycoBase de Dublin-Oxford Glycobiology Laboratory (http://glycobase.ucd.ie/cgi-bin/profile_upload.cgi).

Finalmente la muestra fue tratada con distintas exoglicosidasas para confirmar las estructuras y en paralelo se evaluó por MALDI-TOF. Para la digestión secuencial con exoglicosidasas de los N-glicanos se emplearon las muestras (hasta 1 nmol) derivatizadas previamente con 2-AB. Las enzimas utilizadas fueron las siguientes: *Arthrobacter ureafaciens* sialidasa (ABS)-Hidroliza el ácido siálico (Neu5Ac and Neu5Gc) enlazado α 2-6-3 & -8 al extremo no reductor; *Bovine kidney* α -fucosidasa (BKF)-Hidroliza residuos de fucosa enlazados α 1-2 al extremo no reductor con mayor eficiencia que la fucosa unida α 1-3 & -4. Digiere fucosa del núcleo enlazada α 1 -6; *Bovine testis* β -galactosidasa (BTG)-hidroliza galactosa del extremo no reductor unida β 1-3 y 1-4; *Streptococcus pneumoniae* hexosaminidasa (GUH, SPH)-digiere GlcNAc β 1-2Man > GlcNAc β 1-6Man > GlcNAc β 1-4Man; *Jack bean* α -mannosidasa (JBM)-hidroliza manosa α 1-2,3>6. La digestión se realizó de forma secuencial y en el orden en que se citan arriba. Los N-glicanos marcados se digirieron en un volumen de 10uL con estas enzimas durante 18h a 37°C en buffer acetato de sodio 50mM. Luego de la incubación las enzimas fueron removidas por filtración utilizando filtros Amicon Micropure-EZ (posee membrana de unión a proteínas). Finalmente se

realizó el análisis por espectrometría de masa (MALDI TOF-MS) de los N-glicanos purificados los cuales se midieron con modo reflector positivo.

En algunos casos se realizó la separación de los N-glicanos derivatizados en cromatografía de intercambio aniónico (Weak Anion eXchange-HPLC) empleando como estándar N-glicanos aislados de fetuina de suero bovino. Este estándar contiene una mezcla de N-glicanos sialilados mono-, di-, tri- y tetrasialilados que se obtienen por deglicosilación con PNGasaF de fetuina de suero bovino (Sigma). En primer lugar se inyectó el estándar de N-glicanos de fetuina y posteriormente las muestras. Finalmente se compararon la posición de elución de los picos de la muestra problema con los del estándar de N-glicanos de fetuina.

6.4) RESULTADOS Y DISCUSION

Conocer la glicosilación de esta proteína era uno de los aspectos básicos hacia la caracterización bioquímica. En primera instancia se determinó *in silico* los sitios potenciales de N- y O- glicosilación presentes en las proteínas Env-BLV nativa, srEnv-BLVwt y srEnv-BLVmut mediante los programas NetNGlyc 1.0 y NetOGlyc 3.1. En base a estos análisis bioinformáticos sobre la secuencia aminoacídica se pudo predecir la existencia de 7 sitios potenciales de N-glicosilación en gp51 (N129, N203, N230, N251, N256, N271, N287) y 2 en gp30 (N351, N398) así como 3 sitios de O-glicosilación en gp51 (T232, T290, T297). La posición de residuos de asparagina corresponden a la secuencia de la proteína Env-BLV nativa (**fig 1 y anexo tesis**).

**Sitios de N-glicosilación potenciales en la proteína Env-BLV nativa secuencia
FLK-BLV (NetNGlyc 1.0)**

```

MPKKRRSRRRPQPIIRWVSLTLTLALCRPIQTWRCSLSLGNQQWMTAYNQEAKFSISIDQILEAHNQS67PFCAKSPRYTL 80
DSVNGYPKIYWPPQGRRRFGARAMVTYDCEPRCPYVGADRFDCPHWDNAS129QADQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTW 160
EIWGYDPLITFSLHKIPDPPQDFPQLNSDWVPSVRSWALLLN203QTARAFDCAICWEPSPPWAPEILVY230NKTISSSGPGL 240
ALPDAQIFWV251NTSS256FNTTQGWHHPSQRLLE271NVSQGNALLLPPISLV287NLSTASSAPPTRVRRSPVAALTLGLALS320VGLTGI
NVAVSALSHQRLTSLIHVLEQDQRLITAIN351Q398THYNLLNVASVVAQNRRGLDWLYIRLGFQSLCPTINEPCCFLRIQ400ND
IIRLGDQLPQRSVSTDWQWPWNWDLGLTAWVRETIH480SVLSLFLALFLFLAPCLIKCLTSRLLKLLRQAPHFPEISLT
PKPDSDYQALLPSAPEIYSHLSPVKPDYINLRPCP*

```

**Sitios de N-glicosilación potenciales en la proteína Env recombinante soluble
expresada en Drosophila (NetNGlyc 1.0)**

srEnv-BLVwt

```

SDLNMKLCILLAVVAVFVGLSLGRSTWRCSLSLGNQQWMTAYNQEAKFSISIDQILEAHNQS59PFCAKSPRYTLDSVNGYPK 80
IYWPPQGRRRFGARAMVTYDCEPRCPYVGADRFDCPHWDNAS121QADQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIWGYDPL 160
ITFSLHKIPDPPQDFPQLNSDWVPSVRSWALLLN195QTARAFDCAICWEPSPPWAPEILVY222NKTISSSGPGLALPDAQIF 240
WV243NTS248SFNTTQGWHHPSQRLLE263NVSQGNALLLPPISLV279NLSTASSAPPTRVRRSPVAALTLGLALS320VGLTGINVAVSALS
HQRLTSLIHVLEQDQRLITAIN343Q390THYNLLNVASVVAQNRRGLDWLYIRLGFQSLCPTINEPCCFLRIQ400NDIIRLGDQL
PLSQRVSTDWQWPWNWDLGLTAWVRETIH480GPFE480DDDDKAGWSHPQFEKGGGSGGGSGGGWSHPQFEK*

```

srEnv-BLVmut

```

SDLNMKLCILLAVVAVFVGLSLGRSTWRCSLSLGNQQWMTAYNQEAKFSISIDQILEAHNQS59PFCAKSPRYTLDSVNGYPK 80
IYWPPQGRRRFGARAMVTYDCEPRCPYVGADRFDCPHWDNAS121QADQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIWGYDPL 160
ITFSLHKIPDPPQDFPQLNSDWVPSVRSWALLLN195QTARAFDCAICWEPSPPWAPEILVY222NKTISSSGPGLALPDAQIF 240
WV243NTS248SFNTTQGWHHPSQRLLE263NVSQGNALLLPPISLV279NLSTASSAPPTRV292NNSPVAALTLGLALS320VGLTGINVAVSALS
HQRLTSLIHVLEQDQRLITAIN343Q390THYNLLNVASVVAQNRRGLDWLYIRLGFQSLCPTINEPCCFLRIQ400NDIIRLGDQL
PLSQRVSTDWQWPWNWDLGLTAWVRETIH480GPFE480DDDDKAGWSHPQFEKGGGSGGGSGGGWSHPQFEK*

```

Figura 6.1: Sitios potenciales de N-glicosilación (numerada la N según secuencia) en las proteínas Env-BLV nativa (arriba), Env recombinante soluble wt (srENV-BLVwt) (medio) y Env recombinante soluble mutante en el sitio de furina (srENV-BLVmut) (abajo). Se señalan en azul el péptido señal, en negro gp51, en rojo gp30, en gris dominio TM-cola citoplasmática y en fucsia el sitio de corte por EK - 2 strep tag. Programa NetNGlyc 1.0

Es importante destacar sin embargo que los programas de predicción presentan un umbral de 0.5 debajo del cual el sitio no es considerado “glicosilable”. En el anexo se puede observar que los sitios de N-glicosilación como N256 y N351 en la Env-BLV nativa (N248 y N343 en las proteínas recombinantes) presentan valores umbral mayores a 0.45 por lo tanto deben tenerse en consideración. Lo mismo ocurre con los sitios de O-glicosilación en los cuales el programa solo establece que el sitio T297 en la Env-BLV nativa (T289 en las proteínas recombinantes) sería glicosilable. Al igual que en el caso anterior los residuos T232 y T290 en la Env-BLV nativa (posiciones T224 y T282 en las proteínas

recombinantes) poseen valores de predicción mayores a 0.47. Si bien en este trabajo de tesis el estudio detallado se realizó para los sitios de N-glicosilación nuestra hipótesis es que son 3 los sitios potenciales de O-glicosilación en esta proteína (**anexo tesis**). Otro aspecto importante a tener en cuenta está vinculado con la doble mutación generada en la proteína recombinante (srEnv-BLVmut) con el fin de eliminar el sitio de reconocimiento por furinas. Para generar este mutante los residuos R300 y R301 fueron sustituidos por N (el procedimiento se describe en el capítulo 5) generando un nuevo motivo NXS/T (NNS en este caso) que no figura como sitio potencial por el programa (y de hecho se confirmó que no está glicosilado, ver tabla 2) pero que era de suma relevancia analizarlo por las implicancias que podría tener en la conformación de la proteína recombinante.

Para comenzar a analizar la presencia de la glicosilación en esta glicoproteína de superficie en las partículas virales, en primera instancia se evaluó si las partículas virales purificadas de BLV eran reconocidas por lectinas confirmando la presencia de proteínas glicosiladas. En el primer ensayo (**figura 6.2**) si bien se evaluaron escasas lectinas, la única lectina que presentó reactividad fue la WGA que reconoce GlcNAc y NeuNAc. Es interesante destacar que la presencia de ácido siálico (NeuNAc) es una constante en las proteínas virales de superficie^{210, 241 103, 253}. Si bien este fue un ensayo preliminar el reconocimiento por la WGA da indicio de la presencia de GlcNAc y ácido siálico en las preparaciones de partículas virales purificadas de BLV compatible con la N-glicosilación. La WGA permitió reconocer bandas de 15, 35 y 70 KDa que podrían corresponder a Env o a fragmentos de la misma.

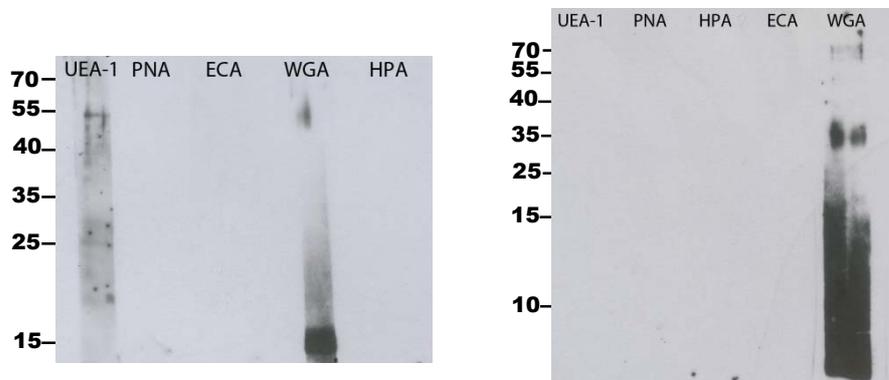


Figura 6.2: Lectin blot empleando partículas purificadas de BLV. Cada blot representa una preparación individual de partículas virales. Estas muestras se enfrentaron a un panel de lectinas. Se observa que únicamente la WGA reconoce la preparación de partículas virales en ambos casos.

Por su parte el análisis por espectrometría de masa de los spots obtenidos a partir de las partículas virales purificadas permitió identificar esta proteína únicamente mediante la identificación de dos únicos péptidos con un m/z : $1113,5995 \pm 0.05$ y $2404,2004 \pm 0.1$ Da (**figuras 4.10, 4.11, 4.13, 4.21**) pertenecientes a gp51 ninguno de los cuales posee sitios potenciales de N- u O-glicosilación. Dada la dificultad que representa el estudio glicoproteómico de proteínas como gp51 y en particular cuando la misma se encuentra presente en una mezcla compleja de proteínas (como en preparaciones de

partículas virales), se optimizó un protocolo para la purificación de gp51 a partir del sobrenadante de FLK-BLV. De este modo la glicosilación podría analizarse en una proteína generada en células de mamífero similar a la proteína nativa en lo referente al procesamiento de carbohidratos que ocurre durante la expresión de la proteína. Sin lugar a dudas el mejor sistema para analizar este tipo de modificación sería la purificación de esta proteína derivada de PBMCs de animales infectados con BLV. Sin embargo en ambos casos la cantidad de proteína purificada podría resultar insuficiente para este tipo de ensayos.

Para la purificación de gp51 nativa se empleó el sobrenadante utilizado para la purificación de partículas virales clarificado/filtrado (previo a la ultrafiltración tangencial) y se purificó gp51 a partir del mismo mediante una cromatografía de afinidad por unión a metales (IMAC), en este caso Zn^{2+} , dado que gp51 posee un sitio de unión a Zn^{2+} (aa 104-123). La proteína gp51 sale enriquecida en las fracciones de eluato denominadas F4-F6 (**figura 6.3 A**). Posteriormente se realizó una SEC para mejorar la purificación de la proteína y las fracciones se corrieron en SDS-PAGE/WB para evaluar la presencia de gp51 en los distintos picos obtenidos (**figura 6.3 B y C**). La proteína no salió en el volumen de elución correspondiente a su peso molecular (55-75KDa si consideramos el radio hidrodinámico) sino que eluyó en un pico de alto peso molecular conteniendo especies superiores a 440KDa. Esto implica que la proteína se encuentra formando agregados en el momento de la purificación.

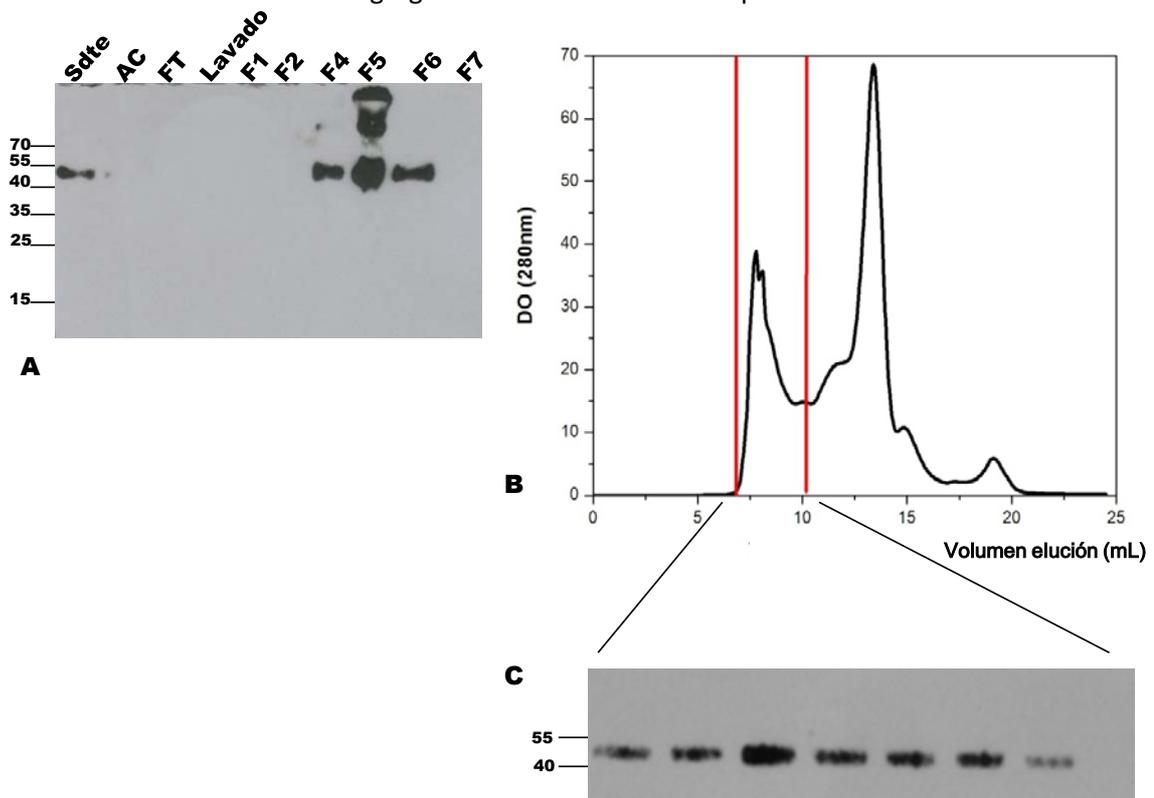


Figura 6.3: Purificación de gp51 a partir de sobrenadante de células FLK-BLV para evaluar posibles modificaciones postraduccionales. **A:** Análisis por SDS-PAGE/WB de las fracciones colectadas durante el proceso de purificación de gp51 por IMAC (con Zn^{2+}). En las fracciones F4-F6 se observa la elución de la proteína. **B:** La fracción F5 obtenida por IMAC (21A) fue corrida en una gel filtración Sx200 10/300. Todas las fracciones eluidas en la corrida fueron analizadas por SDS-PAGE/WB (revelado con anti-gp51) y las fracciones conteniendo la proteína se señalan entre líneas rojas. **C:** Análisis por SDS-PAGE/WB de las fracciones de la SEC conteniendo la proteína gp51 purificada.

Si bien las herramientas de detección (ej anticuerpo monoclonal) permiten identificar solamente la subunidad gp51 es factible que sea ésta la subunidad mayoritariamente presente dado que la gp51-gp30 como tal es inestable. A su vez el sobrenadante deriva de células crecidas en RPMI 1640 que contiene glutatión por tanto es factible que se reduzca el puente disulfuro presente entre ambas subunidades. De todos modos gp30 permanecería unida a la membrana pero sería interesante utilizar el suero policlonal obtenido de ratones inmunizados con srEnv-BLVmut (se detalla en el capítulo 5) para determinar si se purifica también algo de gp30.

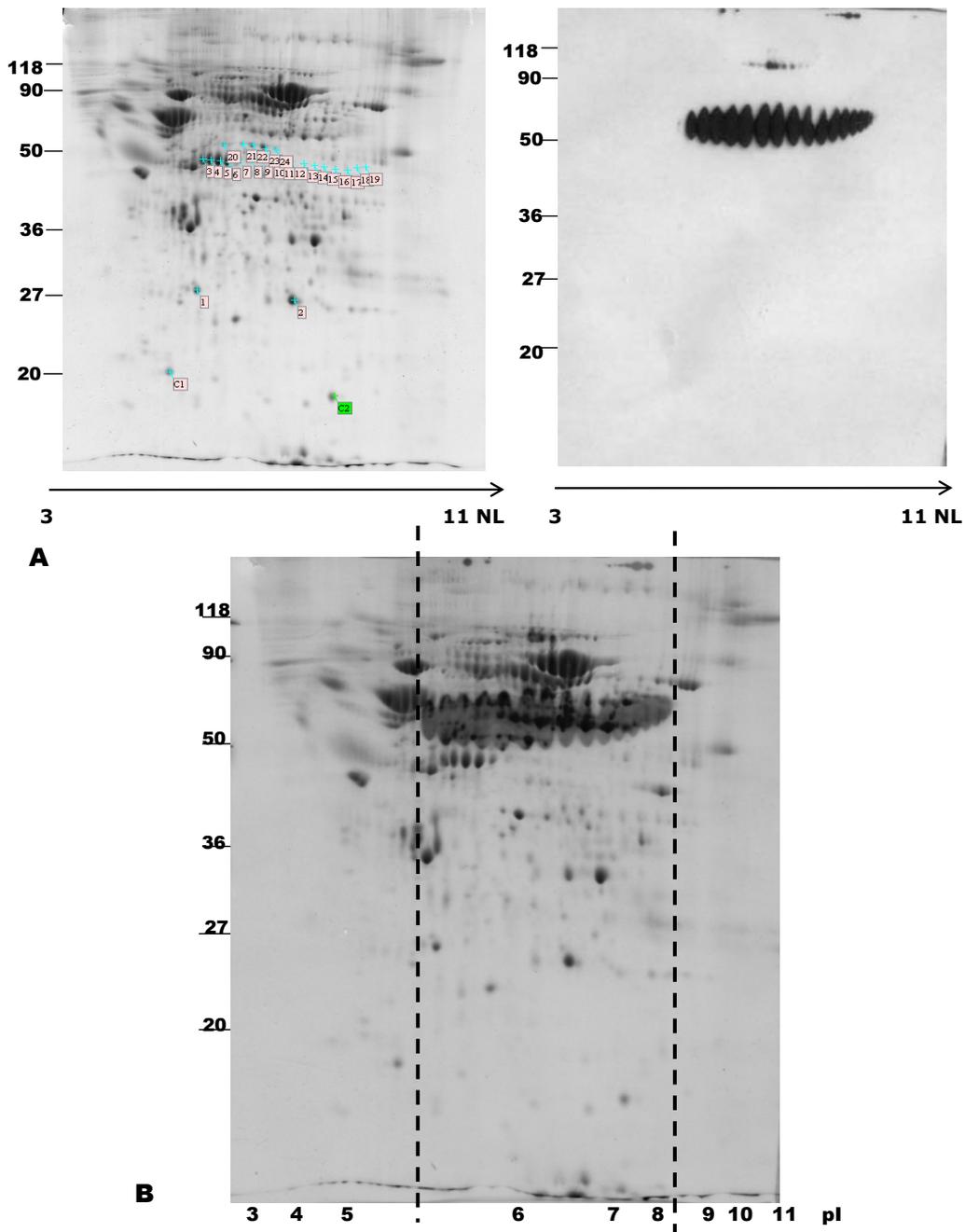


Figura 6.4: Análisis por 2D SDS-PAGE (CCB y WB) del pool de gp51 purificada (IMAC + SEC). **A:** Izq. 2D SDS-PAGE/CCB. Se observan los spots cortados y enviados para su análisis por espectrometría de masa. Como control se eligieron 2 spots (C1 y C2) fuera del rango de PM de la proteína. Der. 2D SDS-PAGE/WB (AcMo anti-gp51). Se observa el mismo patrón de reactividad que en el caso de las partículas virales purificadas. Este tren de spots podría ser compatible con N-glicosilación. **B:** Superposición de imágenes correspondientes a las fig 22A (izq/der) con el fin de elegir cuáles spots analizar por MS. La línea punteada define el sitio donde se halla este tren de spots y el pI correspondiente (5,5-8).

Empleando la proteína purificada a partir del sobrenadante de células FLK-BLV se realizaron 2D SDS-PAGE para tinción con CCB y para WB (**figura 6.4 A**), este último presenta el patrón de spots característicos observados para esta proteína. Ambos geles se superpusieron (**figura 6.4 B**) y en base a ello se eligieron los spots a cortar para la identificación por MS junto con 2 spots por fuera de la zona correspondiente a gp51 (como control). El tren de spots observado para gp51 estaría entre 5,5-8 de pI por tanto ello da idea nuevamente de que este tren de spots sea resultado de la incorporación de ácido siálico (en particular ácido 5-N- acetilneuramínico) aunque también podría tratarse de monosacáridos sulfatados. De todos modos la asignación de estos grupos únicamente con respecto al pI (basados en el resultado de la 2D) es compleja. En un trabajo publicado se establece que cada residuo de ácido siálico disminuye entre 0.1-0.3 unidades el pI de la proteína²².

Lamentablemente en ninguno de los spots analizados a partir de la proteína purificada de sobrenadante de FLK-BLV fue posible identificar gp51 revelando que la escasa cantidad de proteína purificada presente no era suficiente para este tipo de determinación. Estos espectros presentaban en su mayoría proteínas de origen ovino (por las células) o bovino (por el SFB). De todos modos en base a estos primeros resultados preliminares utilizando sobrenadante de células FLK-BLV (mamífero) logramos establecer que la proteína Env ya sea formando parte de la partícula viral así como en su forma purificada (gp51) presenta como modificación postraduccional la glicosilación, en particular la N-glicosilación. Sin embargo estudiar la glicosilación directamente en la proteína gp51 purificada obtenida a partir de células de mamífero es complejo no solo por la escasa cantidad de proteína que se logra purificar sino que a su vez el problema principal radica en la presencia de grupos de glicanos que estarían presentes en uno o varios sitios potenciales de N-glicosilación (**figura 6.1**) y dadas las características de la glicosilación en mamíferos serían glicanos complejos.

Esto dificulta enormemente la identificación por espectrometría de masa dado que son péptidos glicosilados que vuelan de forma inadecuada. Los péptidos glicosilados son péptidos de alto peso molecular debido a la presencia de glicanos que hace que los péptidos queden fuera del rango de masas detectable para ser analizados (identificados o secuenciados). Por ello se requiere en general del análisis de N-glicanos por un lado y del esqueleto proteico por otro.

El éxito en la expresión de la proteína Env recombinante soluble (en particular la mutante) en células S2 de *Drosophila* permitió no solo avanzar en cuanto a las características bioquímicas-biofísicas de la misma sino también en los aspectos glicoproteómicos. Si bien es cierto que la incorporación de carbohidratos es diferencial en células de insecto vs células de mamífero en términos de la escasa complejidad de los componentes N- y O-glicánicos presente en insectos, justamente esta simpleza permitió asignar la mayoría de los sitios potenciales de N-glicosilación con abordajes proteómicos sencillos (MS y MS/MS con o sin deglicosilación previa). A su vez se purificaron los N-glicanos y se analizó el componente glucídico de los mismos, tanto para la proteína recombinante como para la proteína obtenida a partir de partículas virales de BLV lográndose por primera vez caracterizar el tipo de N-glicanos presente en ambas proteínas.

Como se describe en el capítulo 5 la proteína Env recombinante (wt y mutante) fue utilizada para la optimización de un ELISA (**figura 5.18**) presentando excelentes propiedades tanto antigénicas (con sueros bovinos) como inmunogénicas (al ser inoculada en ratones). Utilizando este formato de ELISA se analizó la contribución de los glúcidos al reconocimiento de la proteína en particular por parte de los sueros bovinos. Estos ensayos se realizaron con la proteína srEnv-BLVmut. Si el escudo de glicanos (glycan shield) opera enmascarando sitios antigénicos importantes (reconocidos por anticuerpos neutralizantes) se podría suponer que la liberación de estos glicanos de la proteína (recombinante en este caso) generaría un aumento en el reconocimiento por parte de los sueros bovinos seropositivos. Sin embargo se observó que la deglicosilación parcial de la proteína srEnv-BLVmut utilizando la PNGaseF dio lugar a una proteína cuya reactividad disminuye de forma considerable en ausencia de glicanos (**figura 6.5**). Se trata de deglicosilación parcial dado que las proteínas que derivan de células de insecto suelen presentar fucosa en posición α 1,3 unida al GlcNAc inicial y la PNGaseF es incapaz de cortar a nivel de la Asn si esta unida a este tipo de residuo.

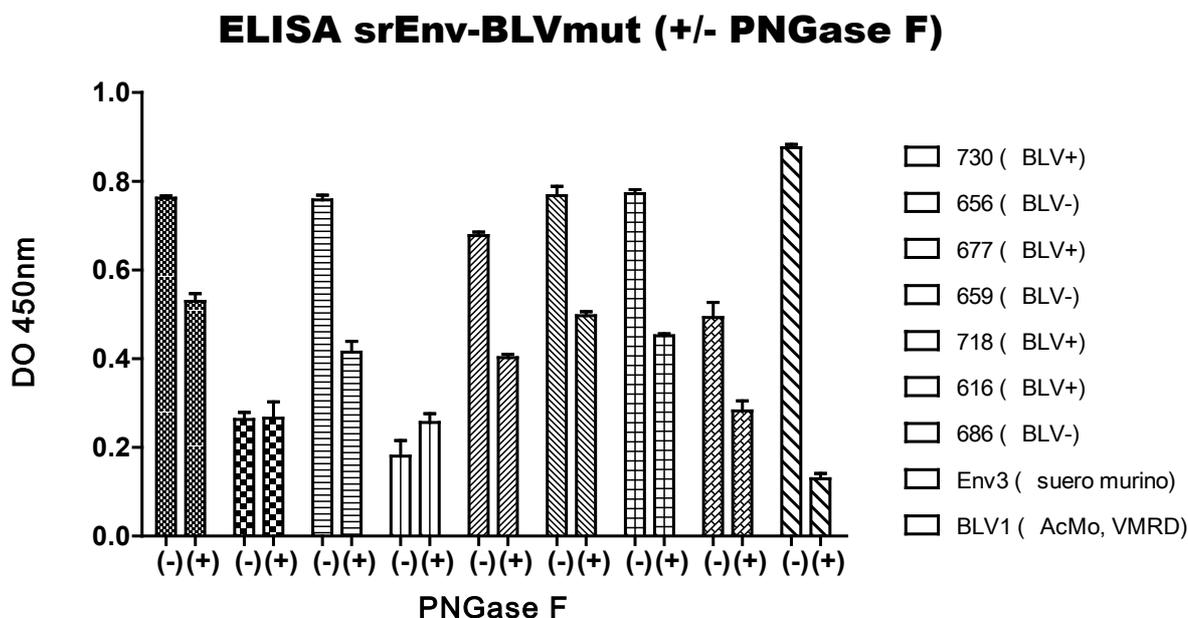


Figura 6.5: Reactividad de sueros bovinos BLV (+ y -), suero murino (ratones inmunizados con srENV-BLVmut) y anticuerpo monoclonal BLV1 por ELISA empleando srENV-BLVmut como antígeno en presencia y ausencia de PNGaseF. El valor de corte (cutoff) se calculó en base al promedio de los controles negativos-control de sustrato, control de primario y control de secundario- $(0,04985) + 3$ desvios standard ($3\sigma=0,0198$). El valor de corte se sustrajo de todos los valores de DO (a 450nm).

Los resultados del ELISA en presencia de PNGase F fueron realizados sólo para la proteína recombinante pero teniendo en cuenta los resultados del ensayo de ELISA (**figura 5.18**), con resultados de sensibilidad y especificidad prácticamente iguales al ELISA comercial (que emplea proteína gp51 obtenida a partir de células de mamífero) esto valida el ensayo de ELISA realizado en presencia de PNGaseF (datos no publicados, tesis maestría A. Addiego 2014). De todos modos no es posible realizar

un paralelismo de como afectaría este tratamiento a la proteína nativa, si las diferencias serían las mismas, etc. En este sentido lo ideal sería comparar ELISA con PNGase F utilizando como antígeno a la proteína purificada de células de mamífero vs células de insecto. Al tratarse de proteínas generadas en células de insecto con N-glicanos paucimanosídicos (2-3 Man) u oligomanosídicos con residuos de fucosa, es interesante pensar que el pool de anticuerpos presente en el suero bovino podría reconocer este tipo de motivos glicánicos no presentes en glicoproteínas de mamíferos siendo por tanto antigénicos y esto podría explicar la caída de la reactividad una vez que se quitan los glicanos. Por otro lado en HIV⁶⁸ se demostró que la proteína gp120 obtenida nativa a partir de PBMC también presenta estructuras oligomanosídicas Man₅₋₉GlcNAc₂ similares a las que se observan en *Drosophila*. Esto por tanto apoyaría la hipótesis de la existencia de clones de linfocitos B que producen anticuerpos dirigidos contra glicanos presentes en la proteína. Los glicanos por tanto podrían operar en la evasión inmune aunque al parecer en retrovirus también constituyen determinantes antigénicos de importancia. Es posible que dentro del pool de anticuerpos presentes en animales infectados con BLV posiblemente se encuentren aquellos que sean capaces de reconocer motivos glucídicos presentes en la proteína y la ausencia de los mismos en presencia de PNGase F o metaperiodato de sodio (ver más abajo) elimine dichos epitopes. De hecho en HIV-1 se demostró que uno de los llamados “broad neutralizing antibodies” más potentes, 2G12, reconoce un motivo glicánico presente en gp120 rico en Man₉GlcNAc₂ (immature oligomannose type)^{33, 40}.

Para todos los sueros positivos se cumple que en presencia de PNGase F la reactividad disminuye mientras que en el caso de los sueros negativos no hay cambios visibles. Por su parte el suero murino y el anticuerpo monoclonal comercial presentan una reducción en la reactividad en presencia de la glicosidasa. Es interesante destacar la diferencia en la reactividad para el anticuerpo monoclonal que es prácticamente de pérdida de la reactividad, en este sentido y dado que se trata de un epitope de tipo conformacional podemos apoyar la hipótesis que establece que los glucídicos son un componente estructural importante en el mantenimiento de la integridad de la proteína.

Por su parte la presencia de glucídicos atípicos en N-glicanos en mamíferos como α 1,3 fucosa y glicanos paucimanosídicos pero si presentes en el procesamiento de proteínas glicosiladas en insectos podría ser responsable también de la elevada inmunogenicidad presente en ratones que fueron inmunizados con la proteína srEnv-BLVmut expresada a partir de células S2 de *Drosophila*. Estos azúcares diferenciales podrían contribuir al desarrollo de una buena respuesta inmune (al menos humoral) en ratones. En vertebrados e invertebrados la adición de fucosa se da mediante enlace α 1,6 en el residuo terminal de la N-acetilglucosamina. En *Drosophila* y otros invertebrados sin embargo la fucosa también puede adicionarse mediante enlace α 1,3 en el mismo residuo dando lugar a N-glicanos difucosilados o estar presente como glicanos con α 1,3 fucosa⁹². Esto apoya los resultados de ELISA (**figuras 6.5 y 6.6**) en cuanto a la inmunorreactividad diferencial de los sueros frente a la proteína glicosilada y deglicosilada.

Figura 6.7: Contribución de N-glicanos a la masa molecular de srENV-BLVmut. Análisis por SDS-PAGE/WB (empleando α gp51) de fracciones purificadas de srENV-BLVmut correspondientes a picos de 75 y 150kDa obtenidos por SEC (Sx200 10/300) en condiciones de reducción (+ β Me) y no reducción (- β Me). En ambas condiciones se realizó tratamiento de la proteína monomérica (75kDa) y oligomérica (150kDa) con PNGase F. El marcador de PM (PageRuler-Fermentas) fue sembrado con proteína srENV-BLVmut. *representan la altura de las bandas correspondientes a 75kDa.

La contribución de los carbohidratos al peso molecular de la proteína recombinante también fue evaluada mediante SDS-PAGE/WB (**figura 6.7**) luego del tratamiento con PNGase F. La proteína srEnv-BLVmut fue purificada mediante cromatografía de afinidad y posterior SEC con la separación de los picos de 75KDa y 158KDa. Ambas fracciones fueron deglicosiladas observándose un cambio sustancial en el peso molecular de las mismas en presencia de PNGase F tanto en condiciones de reducción como no reducción, demostrando la contribución de la presencia de carbohidratos (en este caso N-glicanos) en el PM de la proteína “monomérica” y en el oligómero correspondiente al trímero. Esto confirma el cálculo en base a los sitios potenciales de glicosilación que establece que un 40% del peso molecular de la proteína sería ocasionada por carbohidratos. En condiciones de reducción el monómero presenta bandas de 35 y 25KDa en ausencia y presencia de PNGaseF, respectivamente. Esta diferencia en 10KDa puede atribuirse a la presencia de N-glicanos. Para el oligómero en condiciones de reducción y en ausencia de PNGase F aparecen 2 bandas correspondientes a 100-130KDa compatibles con la presencia de trímeros y una banda a 55KDa correspondiente al monómero (dado que estamos en condiciones de reducción). En condiciones de reducción y en presencia de PNGase F en la fracción correspondiente al oligómero aparecen también 2 bandas una de ellas a 170KDa. Es posible que en ausencia de N-glicanos queden expuestas áreas hidrofóbicas presentes en la proteína que generen su agregación²⁵⁹ y da lugar a una banda de mayor peso molecular. Por su parte aparece otra banda un poco mayor a 40KDa. Si comparamos esta banda (compatible con la proteína monomérica) con la banda de 55kDa nuevamente estamos en una diferencia de PM de aproximadamente 10KDa similar a lo que ocurre con la fracción monomérica. Por su parte en condiciones de no reducción no existen diferencias con respecto al PM de las bandas presentes en condiciones de reducción y la misma diferencia en presencia y ausencia de PNGase F se mantiene (55 vs mayor a 40KDa). Podemos establecer entonces que los carbohidratos incrementan en 10KDa el PM de la proteína. Si consideramos que la proteína srEnv-BLVmut posee un PM teórico sin glúcidos de 49,8kDa, la proteína glicosilada tendría entonces un PM con glúcidos de aprox 60KDa similar a lo observado en el gel y a su vez este peso molecular fue calculado y estimado por MALLS en 63KDa (**figura 5.9**). Por tanto esta diferencia que se observa en el gel se debe a la pérdida de la mayoría de los carbohidratos presentes en la proteína demostrando además que la contribución viene principalmente por la presencia de N-glicanos. Para la proteína nativa (en particular para la subunidad gp51) se estima que los carbohidratos representan el 40% del peso molecular de la proteína siendo el

PM teórico de la subunidad gp51 sin glúcidos de 31kDa. En este sentido si bien no tenemos datos de deglicosilación de la proteína srEnv-BLVwt y tampoco datos concretos por MALLS del PM de las subunidades o del monómero sí se pudo observar por SDS-PAGE que la subunidad correspondiente a gp51 posee un PM de aprox 40-45kDa lo cual representaría aproximadamente un 27% de contribución de carbohidratos al PM de la subunidad gp51 (51kDa) (**figura 5.12**). Esta diferencia se explica debido al tipo de glicanos que se incorporan en la proteína nativa expresada en células de mamífero (glúcidos complejos con presencia de ácido siálico por ej) en comparación con la glicosilación presente en nuestro sistema de producción (células de insecto-*Drosophila*) cuya glicosilación se basa en la presencia de glicanos simples y por tanto con una menor contribución al peso molecular de la proteína. Igualmente lo ideal sería determinar la contribución de carbohidratos al PM de la proteína nativa.

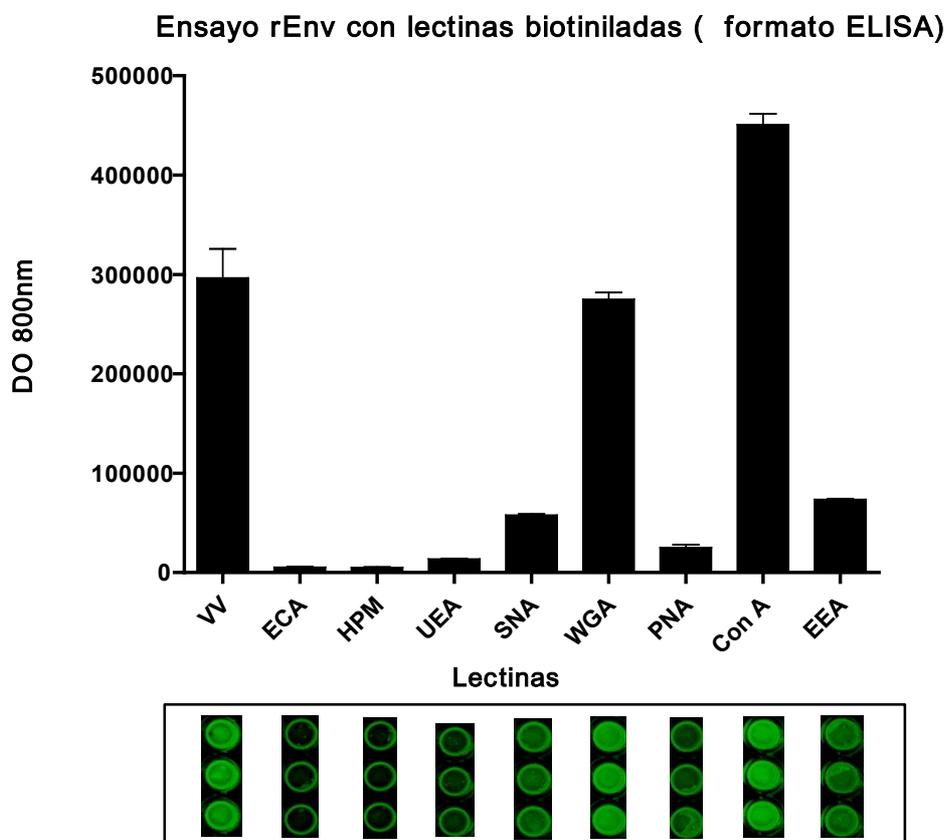


Figura 6.8: Evaluación de la reactividad de lectinas biotiniladas frente a la proteína srEnv-BLVmut con el fin de establecer *a priori* que tipos de glicanos están presentes en la proteína. El ensayo fue realizado por triplicado y se observa en la gráfica la absorbancia medida en Odyssey a 800nm (arriba), debajo a modo ilustrativo se muestra como se visualizan los pocillos, luego del agregado de la streptavidina conjugada con el IRDye800.

En relación a los motivos glúcidos presentes en la proteína srEnv-BLVmut el ELISA realizado con lectinas biotiniladas (**figura 6.8**) fue una primera aproximación en la identificación de cuáles serían los glúcidos presentes en esta proteína recombinante. Mientras que las lectinas ECA, HPM, UEA no reconocen sus motivos en esta proteína, PNA, SNA y EEA presentan una reactividad débil frente a la proteína. Finalmente ConA, WGA y VV presentan la mayor reactividad de todo el panel de lectinas

estudiado. Estos resultados fueron confirmados mediante “lectin blot” empleando la mayoría de las lectinas utilizadas en el ensayo anterior.

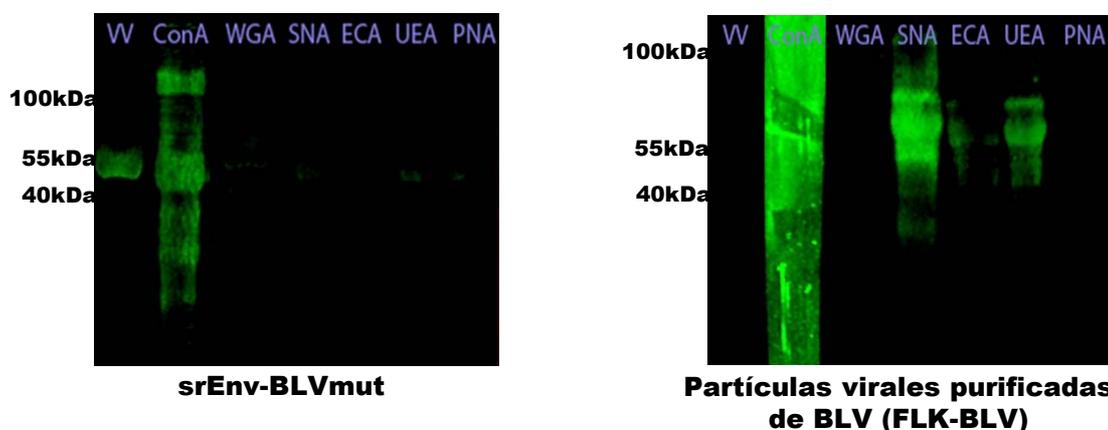


Figura 6.9: Lectin-blot empleando la proteína recombinante (izq-srEnv-BLVmut) expresada en células S2 de *Drosophila* o partículas virales purificadas de BLV obtenidas a partir de células de mamífero persistentemente infectadas (FLK-BLV)(der)

Se comparó la reactividad de las lectinas frente a srEnv-BLVmut con el reconocimiento de lectinas frente a la preparación de partículas purificadas de BLV obtenidas de células de mamífero (**figura 6.9**). En el caso srEnv-BLVmut el *lectin blot* muestra que el reconocimiento está dado por las lectinas ConA y VV, lectinas cuya reactividad fue mayoritaria en el ensayo anterior (**figura 6.8**) mientras que para el caso de las partículas virales purificadas de BLV el reconocimiento se dio exclusivamente por las lectinas UEA y SNA, la primera coincide con lo demostrado en el ensayo preliminar con lectinas biotiniladas (**figura 6.2**). La reactividad con SNA a su vez confirma la hipótesis de la presencia de ácido siálico en esta proteína expresada en células de mamífero que vinculamos a la presencia del tren de spots en la 2D de partículas virales. A su vez la lectina WGA debería haber presentado reactividad tanto para las partículas virales (**figura 6.2**) como también para la proteína srEnv-BLVmut (**figura 6.8**) dado que la misma dilución de lectina fue empleada en ambos ensayos (**figuras 6.8 y 6.9**). Es probable que hubiera existido algún problema técnico durante el desarrollo del lectin blot con respecto a la WGA que haya influido en la ausencia de la reactividad (ej: durante la incubación). Finalmente el lectin blot de partículas virales en presencia de ConA no permite sacar conclusiones relevantes dado que es probable que el bloqueo no haya funcionado. En todos los casos las lectinas reconocen proteínas cuyas bandas coinciden con la proteína recombinante (55-60KDa) y con la proteína gp51 (o Env) nativa (mayor a 60KDa).

La marcada reactividad que presentó la lectina VV llevó a pensar en la posibilidad de que efectivamente los sitios de O-glicosilación presentes en la proteína srEnv-BLVmut efectivamente estuvieran ocupados con O-glicanos dado que VV reconoce GalNAc (antígeno Tn y también antígeno T) si bien es cierto que lectinas que reconocen motivos similares como HPM no presentaron reactividad alguna. Con respecto a este punto se ha demostrado que proteínas derivadas de células S2 de

Drosophila son capaces de expresar proteínas con O-glicanos tipo mucina con estructuras predominantes de antígeno T (Galb1-3GalNAca-Ser/Thr), y antígeno Tn (GalNAca-Ser/Thr)²³⁶.

Con respecto a la glicosilación diferencial presente en la proteína nativa y recombinante es interesante tener esto en cuenta si se desean hacer estudios de especificidad del receptor. Para HA de influenza por ej que une ácido siálico se ha demostrado que el patrón de glicosilación afecta la especificidad de la unión al receptor^{58, 154}. En este sentido se vio que la HA expresada en células de mamífero tiene una alta especificidad y baja afinidad. HA expresada en células HEK293S GnTI(-), las cuales producen glúcidos con alto contenido en manosa dado que carecen de la N-acetilglucosaminiltransferasa I, da lugar a N-glicanos no complejos que presentan una especificidad menor y mayor afinidad y finalmente las células de insecto conteniendo 3 residuos de manosa presentan la mejor afinidad pero la más baja especificidad. Es necesario tener en cuenta el tipo de proteína que se está expresando al realizar una búsqueda de receptor por ejemplo para BLV en el cual aún no se ha determinado el receptor específico para la entrada del virus a los linfocitos B.

Env (SU-TM gp72)

```

1   SDLNMKLCIL LAVVAFVGLS LGRSTWRCSL SLGNQQWMTA YNQEAKFSIS
51  IDQILEAHNQ SPFCAKSPRY TLDSVNGYPK IYWPPPQGRR RFGARAMVTY
101 DCEPRCPYVG ADRFDCPHWD NASQADQGSF YVNHQILFLH LKQCHGIFTL
151 TWEIWGYDPL ITFSLHKIPD PPQDFPQLN SDWVPSVRSW ALLLNQTARA SU (gp51)
201 FPDCAICWEP SPPWAPEILV YNKTISSSGP GLALPDAQIF WVNTSSENTT
251 QGWHHPSQRL LFNVSQGNAL LLPPISLVNL STASSAPPTR VNNSPVAALT
301 LGLALSVGLT GINVAVSALS HQRLTSLIHV LEQDQQLIT AINQTHYNLL
351 NVASVVAQNR RGLDWLYIRL GFQSLCPTIN EPCCFLRIQN DSIIRLGDLO TM (gp30)
401 PLSQRVSTDW QWPWNWDLGL TAWVRETIHG PFEDDDDKAG WSHPOFEKGG
451 GSGGGSGGGS WSHPOFEK

```

Figura 6.10: Resumen de péptidos obtenidos por MS a partir de srEnv-BLVmut (secuencia Env recombinante) donde se señalan: en rojo péptidos identificados en proteína glicosilada, en rojo subrayado péptidos identificados en proteína deglicosilada, en azul péptido señal BiP, en violeta SU (gp51), en negro TM (gp30) ectodominio y en verde 2 aa adicionales presentes en la construcción.

La proteína srEnv-BLVmut purificada (**figura 5.7**) fue identificada mediante espectrometría de masa con una cobertura inicial de aprox 60% (**figura 6.10**) (recordar que la obtenida a partir de las partículas virales purificadas sólo se alcanzó el 6%). El incremento en la cobertura se debe principalmente a la ausencia de glicanos complejos presentes en un sistema de expresión de insecto lo cual genera glicopéptidos de menor peso molecular y por tanto resulta en un aumento sustancial en la capacidad de análisis de esta proteína. Como mencionamos anteriormente el sistema de glicosilación de *Drosophila* podría representar un problema a la hora de asignar interacciones específicas por ej en su interacción con lectinas o sueros bovinos, no pudiendo comparar con la proteína nativa (en ensayos de ELISA de sueros positivos con partículas purificadas con y sin PNGase por ej) dada la escasa cantidad de partículas purificadas. Sin embargo para estudios analíticos de sitios potenciales de N-glicosilación (**figura 6.1**) esta proteína recombinante es abundante permitiendo estudios de glicosilación para la asignación de estos sitios dado que los péptidos glicosilados menos complejos pueden verse por masa y la deglicosilación permitió confirmarlos (**figura 6.11**).

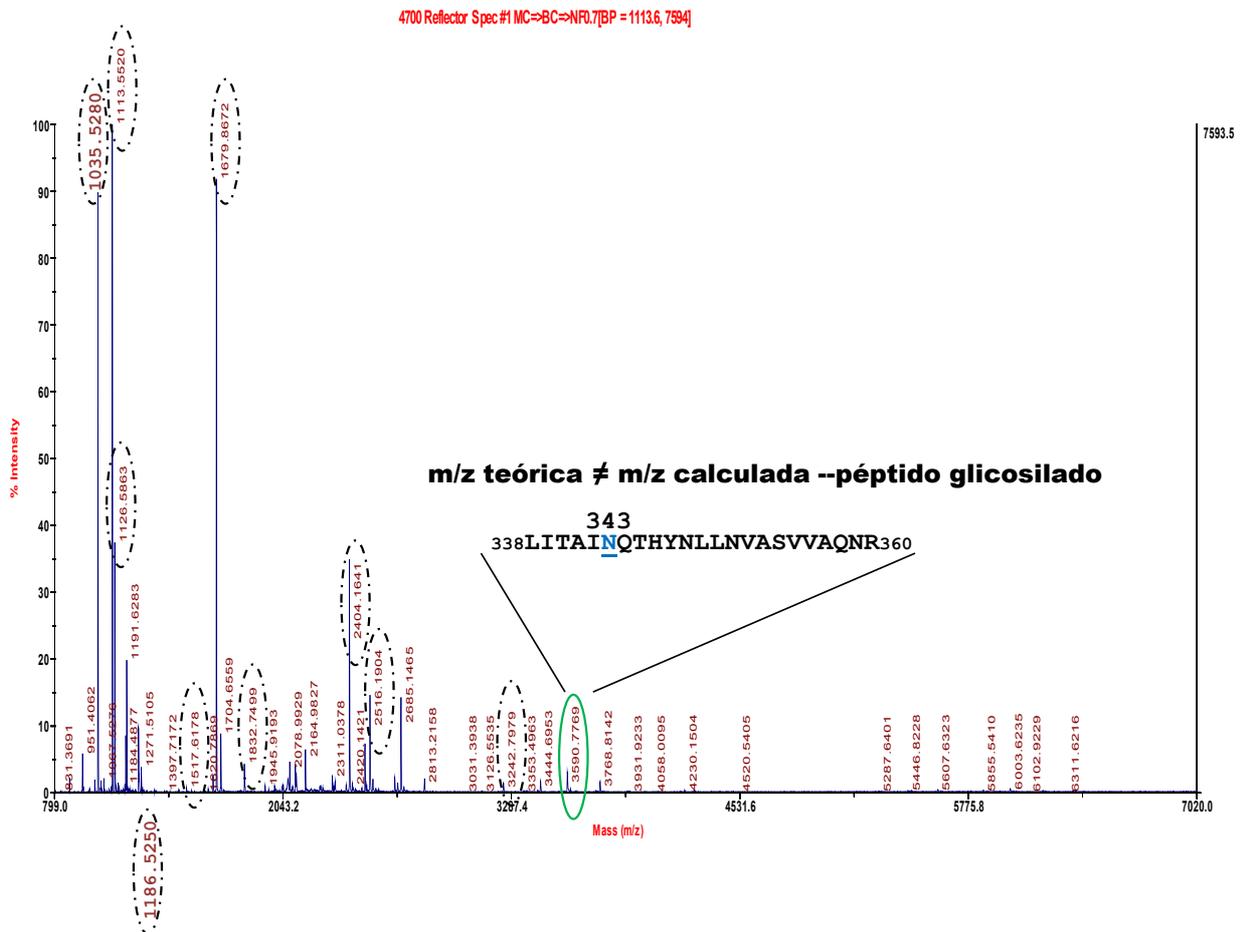


Figura 6.11: Lista de masas de MS (m/z) obtenidas experimentalmente a partir de srEnv-BLVmut en solución. En óvalo punteado gris se marcan los m/z identificados cuya masa coincide con los valores esperados luego de la digestión con tripsina. En óvalo lleno verde muestra el m/z correspondiente a un péptido glicosilado (aa 338-360) que presenta un sitio de N-glicosilación.

Una vez deglicosilada la cobertura de péptidos identificados en la srEnv-BLVmut alcanzó el 84% (figura 6.10). Cabe aclarar que el sitio 292 aparece como sitio potencial de N-glicosilación en la proteína srEnv-BLVmut (figura 6.1) dado que como se mencionó anteriormente para anular el sitio de procesamiento proteolítico se sustituyeron 2 argininas por 2 asparaginas generando entonces un nuevo sitio potencial de N-glicosilación.

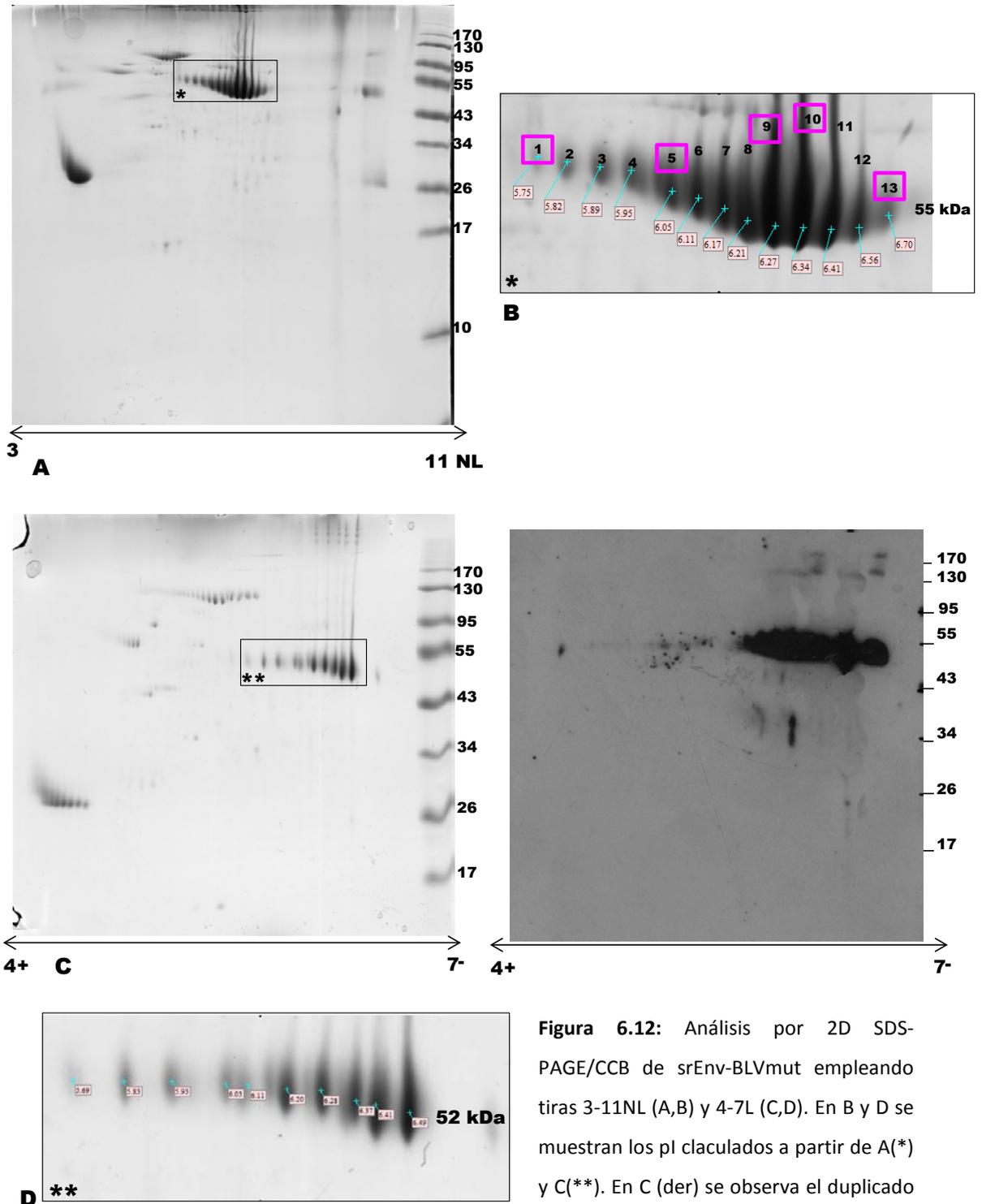
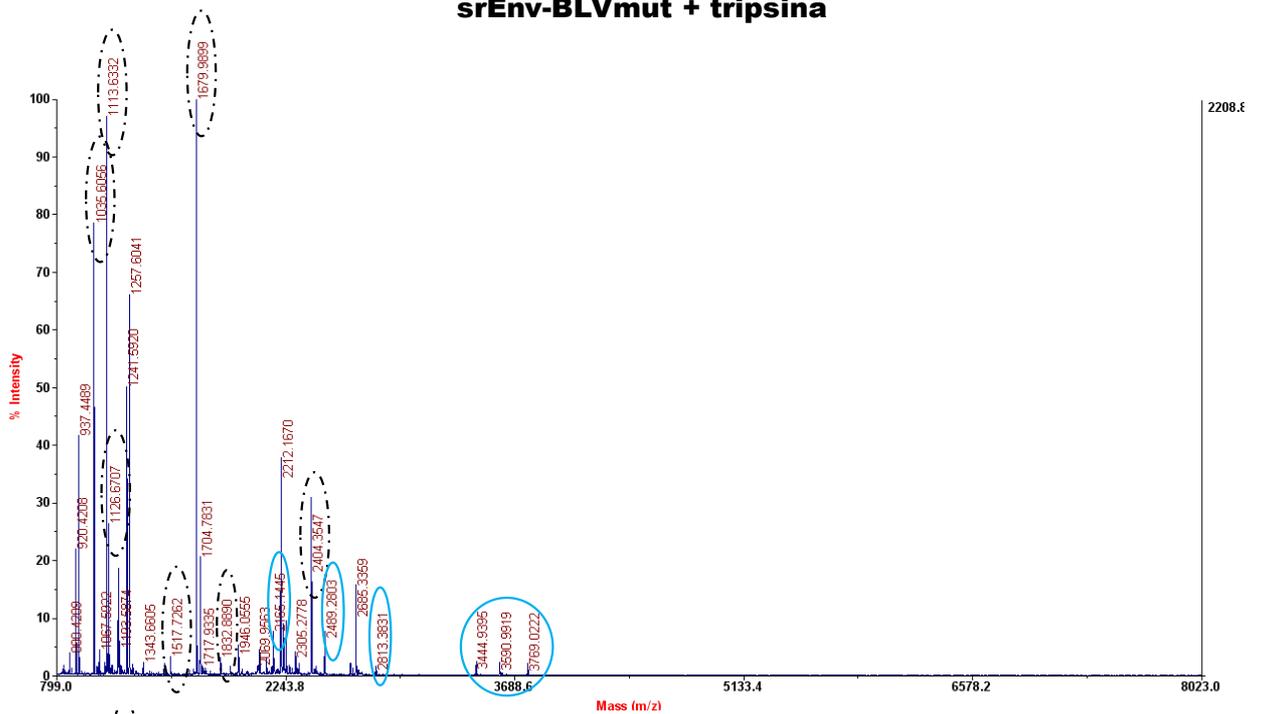


Figura 6.12: Análisis por 2D SDS-PAGE/CCB de srEnv-BLVmut empleando tiras 3-11NL (A,B) y 4-7L (C,D). En B y D se muestran los pI calculados a partir de A(*) y C(**). En C (der) se observa el duplicado del 2D SDS-PAGE revelado por WB con anti-gp51 (AcMo, BLV2)

En paralelo se realizó una 2D-SDS-PAGE/WB para la proteína srEnv-BLVmut empleando el anticuerpo monoclonal comercial BLV2 (VMRD) dirigido contra gp51 (**figura 6.12**), donde se visualiza nuevamente el tren de spots observado con la muestra de partículas virales muy similar al obtenido de partículas en ausencia de SFB (**figura 4.22**). Una vez definido el rango de pI experimental en esta proteína recombinante ajustamos las condiciones del IEF con el fin de resolver mejor los spots correspondientes a la proteína Env. Se utilizaron entonces tiras de 4-7 lineales (que mejoran la resolución de los spots) con el fin de seleccionar spots y evaluar modificaciones en los mismos (**figura 6.12**).

Spots de 2DE

srEnv-BLVmut + tripsina



srEnv-BLVmut + PNGase F + tripsina

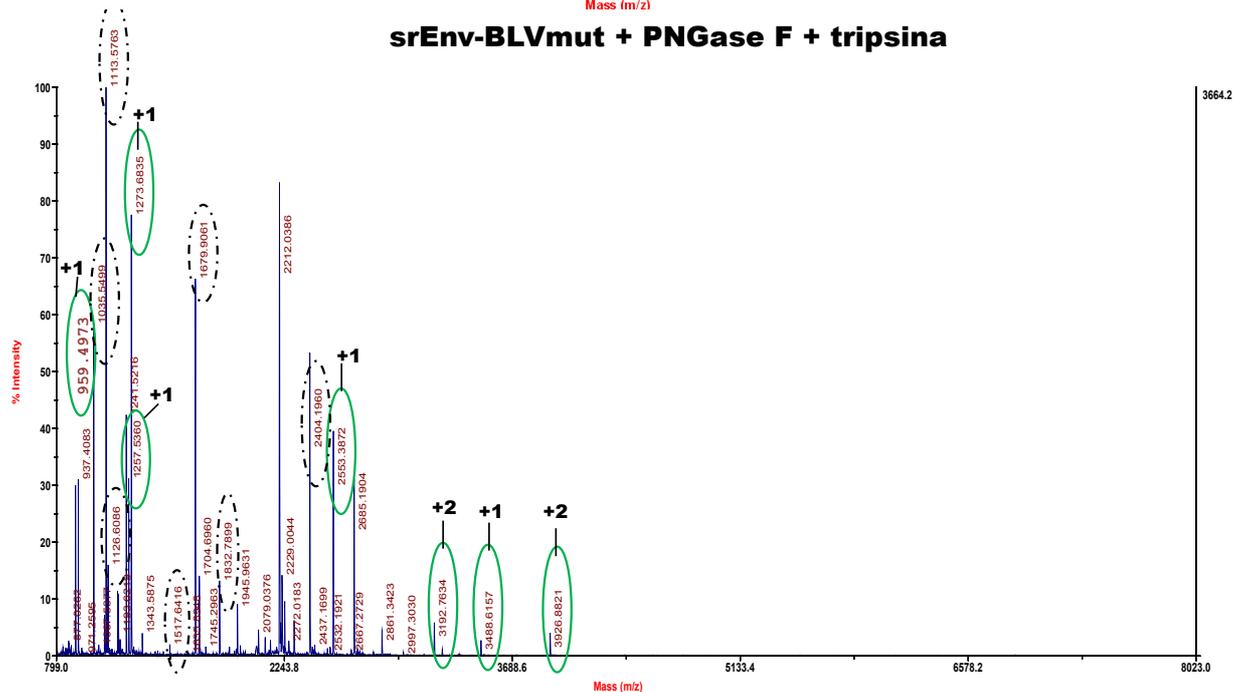


Figura 6.13: Análisis por espectrometría de masa de spots de 2D SDS-PAGE/CCB de la proteína srEnv-BLVmut glicosilada (arriba) y deglicosilada (abajo). En óvalo punteado gris se señalan los m/z cuya masa coincide con los valores teóricos de digestión triptica. Los óvalos llenos celestes indican péptidos glicosilados al desaparecer luego del tratamiento con PNGaseF. Los óvalos llenos verdes representan los péptidos cuyas m/z pertenecientes a Env aparecen luego de la deglicosilación. Se señalan con +1 la aparición de un sitio de N-glicosilación (+1Da N-D) y con +2 la presencia de 2 sitios de N-glicosilación (+2Da N-D).

La incorporación de geles 2D permitió distinguir y separar spots que identificaban a la proteína Env (en clara diferencia con lo que ocurría en la preparación de partículas virales) estableciendo un rango de pI para la proteína recombinante que van desde los 5.75 a los 6.70 según se observa en **figura 6.12** donde ambos extremos del tren de spots a 55KDa permitieron identificar péptidos tripticos pertenecientes a Env por MS (**figura 6.13**). Esta vez la medida es más precisa de lo que calculamos previamente para gp51 en partículas virales dado que efectivamente estamos detectando la proteína por 2D-SDS PAGE teñido con CCB, sin contaminación con BSA. srEnv-BLVmut (sin el péptido señal) tiene un pI calculado teórico de 6.27 y por tanto el rango de spots pertenecientes a la misma (confirmados por MS ver **figura 6.12 B y D**) abarca el pI teórico calculado. Por su parte la proteína Env-BLV nativa (sin el péptido señal) tiene un pI de 8.19 mientras que la gp51 nativa (sin péptido señal) tiene un pI de 7.74.

Al parecer los spots obtenidos a partir de la srEnv-BLVmut están dentro del rango de pI definidos para la Env nativa calculados previamente empleando partículas virales (5,5-8) y si bien abarca el pI teórico los spots presentarían un corrimiento hacia pI mas ácidos a diferencia de lo esperado para proteínas que no poseen glúcidos cargados negativamente (ej ácido siálico) como las expresadas en células de insecto.

Una explicación posible para la aparición de spots entre 5.75 y 6.70 para la proteína recombinante podría deberse a la presencia de O-glicanos cargados por ej ácido glucurónico previamente reportado como componente de O-glicanos en *Drosophila*^{27, 236}. Asimismo en el trabajo reportado por Schwientek y cols²³⁶ se encontró evidencia que la O-glicosilación tipo mucina en células S2 crecidas en medio libre de suero (como en el caso de la proteína Env, recordar que la misma fue producida en S2 adaptadas a medio sin SFB ver capítulo 5) está limitada a la presencia de antígeno Tn (GalNAc α -Ser/Thr) y el antígeno T (Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr), y al parecer este patrón sería bastante restringido. Esta hipótesis se vio sustentada por los resultados de ELISA (con lectinas) y lectin blot (**figuras 6.8 y 6.9**) donde se observa que la proteína recombinante presenta una clara reactividad con la lectina VV la cual reconoce específicamente antígeno Tn (GalNAc) y es indicio de la presencia de O-glicosilación. Sin embargo la reactividad con VV no explica la presencia de ácido glucurónico dado que VV sólo reconoce GalNAc. De todos modos los trabajos reportados en *Drosophila* y en particular en la línea celular S2 mostraron que los O-glicanos presentes en la misma están constituidos por ácido glucurónico dada la disponibilidad de este carbohidrato cargado cuando no se dispone de ácido siálico. La presencia entonces del tren de spots presente en la proteína srEnv-BLVmut a diferencia de lo que

ocurre con la Env-BLV nativa no correspondería a la N-glicosilación sino a la presencia de O-glicanos cargados y ello explicaría el corrimiento observado hacia pI más ácidos. Para confirmar nuestra hipótesis de la presencia de O-glicanos con ácido glucurónico en *Drosophila* habría que realizar el mismo ensayo con lectinas pero utilizando lectinas específicas que reconozcan ácido glucurónico, y también realizar extracción de O-glicanos por β eliminación alcalina y analizarlos por MS.

El uso de tiras con un gradiente de pI más acotado 4-7L (**figuras 6.12 y 6.14**) permitió a su vez confirmar este resultado (tanto por CCB como por WB) no encontrando spots con pIs superiores a 6,5. A su vez el tratamiento con PNGase F de srEnv-BLVmut (**figura 6.14**) confirma la hipótesis anterior. Por un lado la adición de PNGase F corta los N glicanos (excepto los que tengan fucosa en posición α 1-3 unida al residuo GlcNAc terminal reducido). Si el tren de spots fuera resultado únicamente de la N-glicosilación, los spots convergerían en escasos spots revelando la presencia de especies N-glicosiladas que se irían “perdiendo”. Sin embargo por el contrario los spots cambian de peso molecular (compatible con el hecho de que la pérdida de N-glicanos provoca la disminución del PM) pero no alteran el patrón observado y de hecho se genera un corrimiento hacia pI aún más ácidos. Esto puede explicarse por la presencia de O-glicanos que no fueron removidos y asimismo es resultado de la acción de la PNGase F la cual al cortar los N-glicanos sustituye la asparagina glicosilada por un ácido aspártico incrementando aun más el corrimiento hacia pI ácidos (se muestra con flechas en la **figura 6.14** abajo).

Si comparamos las proteínas en presencia y ausencia de PNGaseF (**figura 6.14**) se observa que aparecen en el caso de la proteína tratada especies moleculares de 55, 50-35, 25 y > a 15KDa lo cual revela la pérdida de N-glicanos (la proteína srEnv-BLVmut presenta un PM de aprox 63KDa **figura 6.14**). Los spots correspondientes a las especies moleculares de 25, 15KDa podrían ser resultado de la degradación de la proteína (**figura 6.14**). Finalmente se muestra un ensayo de deglicosilación parcial de srEnv-BLVmut donde claramente se observa por un lado el cambio en el peso molecular así como el shift hacia pI más ácidos (**figura 6.14**).

Como se mencionó anteriormente se observó que el número de péptidos tripticos pertenecientes a Env obtenidos en el espectro luego del análisis de la proteína recombinante era sustancialmente mayor al obtenido en la identificación a partir de las partículas virales purificadas. Esto permitió comenzar el abordaje hacia la asignación de sitios potenciales de N-glicosilación (**figura 6.1**) como verdaderos sitios o no. Un ejemplo de ello se muestra en la figura 6.11 en la cual el péptido aa338-360 posee un sitio potencial de N-glicosilación (N343 en la secuencia de srEnv-BLVmut) y cuya m/z teórica es de 2551.39Da. Mediante fragmentación y tratamiento con PNGase F se determinó que el péptido triptico que identifica esta región corresponde a un péptido glicosilado de 3590.77Da que una vez deglicosilado da lugar al péptido con un m/z 2553.39Da correspondiente a la secuencia LITAINQTHYNLLNVASVVAQNR (**figura 6.15**). Esto implica que la asparagina 343 está glicosilada. El incremento en +2Da de la m/z teórica vs la experimental deglicosilada (**tabla 6.2**) es resultado del

cambio N-D generado por el corte de la PNGaseF incrementando en +1 y a eso se suma el componente monoisotópico del péptido (+1Da por MALDI).

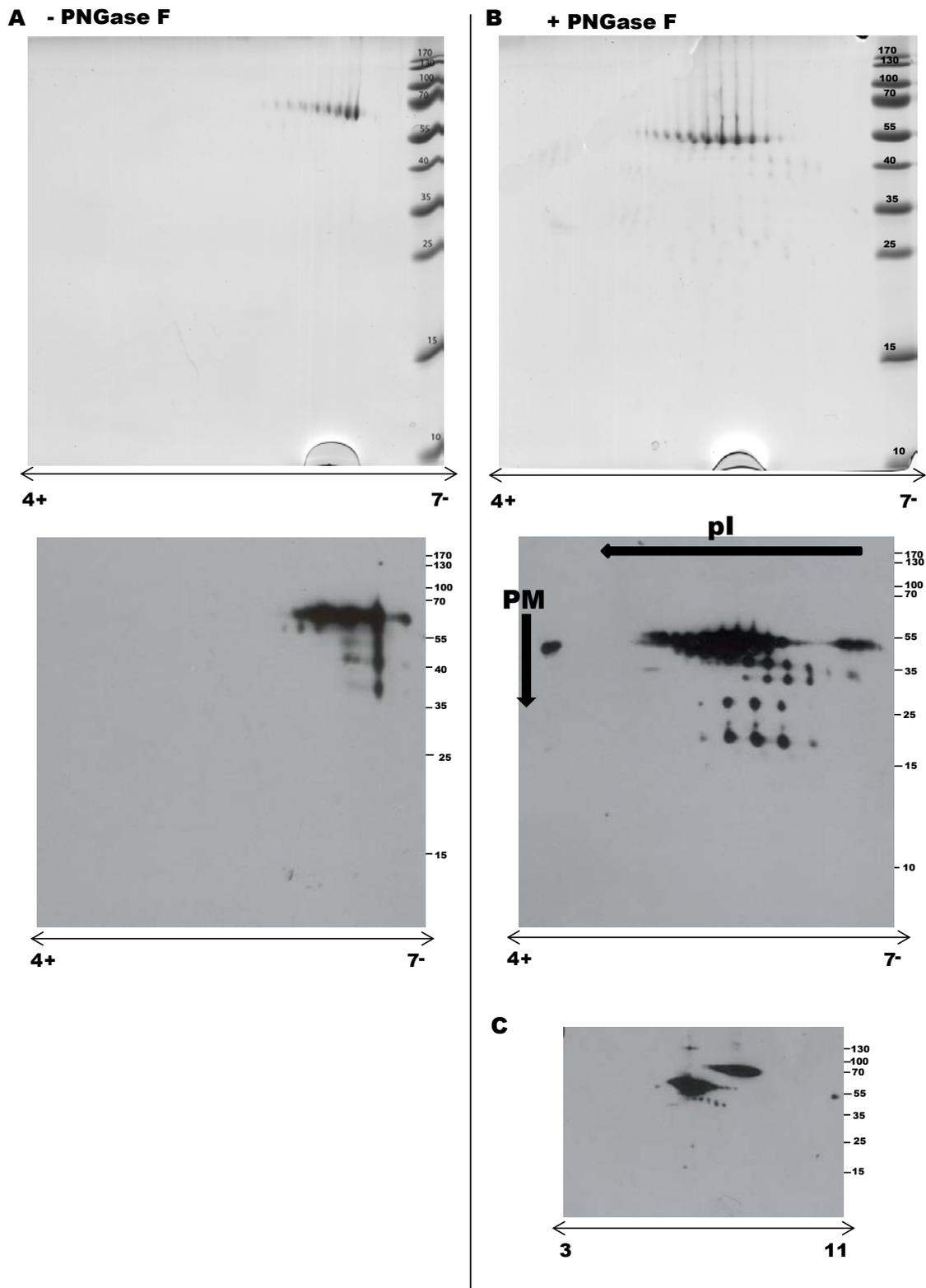
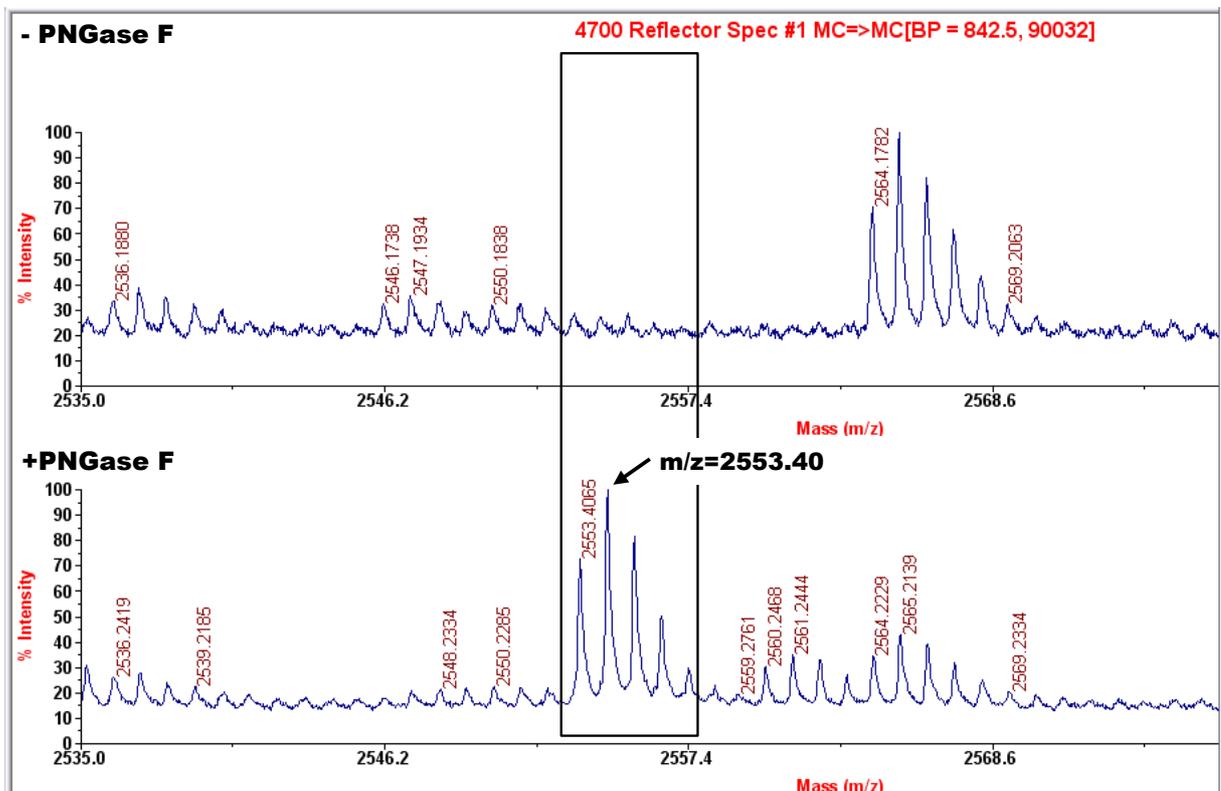


Figura 6.14 : Análisis por 2D SDS-PAGE/CCB de srEnv-BLVmut en presencia y ausencia de PNGaseF (**AyB**). En duplicado las mismas muestras se corrieron en 2D SDS-PAGE para WB (**AyB abajo**) empleando anti-gp51 (AcMo, BLV2). Se señala el corrimiento en PM y pI luego del tratamiento con PNGaseF (**B abajo**). **C**) 2D SDS-PAGE/WB de srEnv-BLVmut luego de la deglicosilación parcial donde se aprecia el corrimiento.

Péptido glicosilado (m/z=3590.78): LITAINQTHYNLLNVASVVAQNR



m/z experimental=3590.70

m/z teórico= 2551.39

m/z con PNGaseF = 2553.40

$\Delta m/z$ (3590.7-2551.39)=1,039Da (Hex)3-HexNAc-(dHex)HexNAc

Estructura propuesta

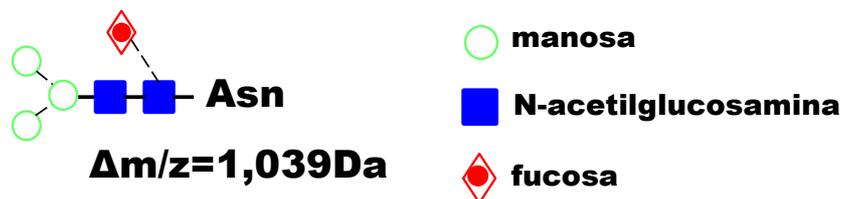


Figura 6.15: Análisis del péptido glicosilado con m/z=3590.78. Análisis por MS de la proteína en ausencia (-PNGaseF) y presencia (+PNGaseF) de la glicosidasa donde se señala la aparición del péptido tríptico correspondiente al péptido deglicosilado confirmando que se trataba del péptido glicosilado. Abajo: se muestran los m/z experimental, teórico y calculado luego de la deglicosilación junto con la estructura propuesta según el $\Delta m/z$ obtenido.

La **tabla 6.2** muestra los valores de los m/z calculados por el programa GPMW3 con digestión teórica con tripsina. Esta digestión se realizó experimentalmente previo al análisis por MALDI-TOF. En la columna m/z experimental figuran las masas de los péptidos encontrados luego del análisis de la

proteína recombinante con un delta +1Da. En la tabla 1 (en rojo) se incluyen aquellos péptidos (en los cuales se detectaron péptidos glicosilados en la srEnvBLV-mut) y cuyas m/z experimentales se confirman luego del tratamiento con PNGaseF permitiendo asignar los péptidos glicosilados a la secuencia (**figuras 14-19 ver más adelante**). Luego del tratamiento con PNGaseF un Δ m/z +1 implica que en el sitio de corte de la PNGaseF esa asparagina fue sustituida por un aspártico lo cual implica que el sitio estaba glicosilado. Un Δ +3 en secuencias con 2 Asn implica que ambos residuos están glicosilados (como se mencionó anteriormente en todos los casos los péptidos ya presentan un incremento de m/z= +1Da por ser monoisotópicos).

Este tratamiento se aplicó a la proteína srEnv-BLVmut en solución (**figura 6.16**), realizando posteriormente la medida de masa y también se realizó previo a una 2D SDS-PAGE en la cual se cortaron spots y se evaluaron por MS (**figura 6.13**). En ambos casos se compararon las proteínas control vs las tratadas con PNGase F (**figuras 6.16 y 6.13**). Cuando se comparan los espectros globales de la proteína en solución sin y con PNGase F se observa la presencia de péptidos trípticos pertenecientes a la proteína Env que en la muestra control no aparecían (ej en figura 14, m/z 959.52 y 1273.63Da) con una diferencia de +1Da por el corte con la enzima. Asimismo se observó por el contrario que en las muestras control se encontraron péptidos por ej 3590.77Da que en la muestra deglicosilada no estaban presentes lo cual implica que se trataba de un péptido glicosilado. El espectro perteneciente a la comparación de srEnv-BLVmut con y sin PNGaseF presentó más abundancia de péptidos cuando se trabajó con la proteína obtenida a partir de spots de una 2D SDS-PAGE/CCB (**figura 6.13**). Por tanto la deamidación del residuo de N en el sitio de unión del glicano luego del tratamiento con la PNGase F se utilizó como indicador preliminar de una potencial glicosilación en cada sitio (figura 15, +1, +2). Es importante destacar que previamente confirmamos que no existía deamidación previa de asparaginas (en sitios potenciales de glicosilación) previo a la deglicosilación evitando la identificación de falsos sitios de glicosilación.

<u>aa</u>	<u>m/z teórico</u> <u>Da</u>	<u>m/z</u> <u>experimental Da</u>	<u>Péptidos tripticos</u>
1- 6	706.33		SDLNMK
7- 23	1742.04		LCILLAVVAFVGLSLGR
24- 27	548.27		STWR
28- 46	2169.97		CSLSLGNQQWMTAYNQEAK
47- 66	2246.09		FSISIDQILEAHNQSDFCAK
67- 69	358.20		SPR
70- 80	1255.61	1256.57	YTLDSVNGYPK
81- 89	1112.58	1113.55	IYWPPPQGR
90- 90	174.11		R
91- 91	174.11		R
92- 95	449.24		FGAR
96-105	1182.49		AMVTYDCEPR
106-113	878.38		CPYVGADR
114-142	3428.59		FDCPHWDNASQADQGSFYVNHQILFLHLK
143-167	3003.49		QCHGIFTLTWEIWGYDPLITFSLHK
168-188	2403.19	2404.16	IPDPPQPDFPQLNSDWVPSVR
189-199	1271.70	2165.02	SWALLLNQTAR
200-223	2743.28		AFPDCAICWEPSPPWAPEILVYNK
224-259	3923.90		TISSSGPGLALPDAQIFWVNTSSFNNTQGWHP SQR
260-290	3189.78		LLFNVSQGNALLLPPISLVNLSTASSAPPTR
291-323	3241.81	3242.78	VNNSPVAALTLGLALSGLTGINVAVSALSHQR
324-337	1678.90	1679.87	LTSLIHVLEQDQQR
338-360	2551.39	3590.78	LITAINQTHYNLLNVASVVAQNR
361-361	174.11		R
362-369	1034.55	1035.53	GLDWLYIR
370-387	2036.94		LGFQSLCPTINEPCCFLR
388-395	957.52		IQNDSIIR
396-405	1125.61	1126.59	LGDLQPLSQR
406-425	2515.21	2516.16	VSTDWQWPWNWDLGLTAWVR
426-438	1516.63	1517.62	ETIHGPFEDDDDK
439-448	1185.56	1186.52	AGWSHPQFEK
449-470	1831.79	1832.76	GGSGGGSGGGSWSHPQFEK

Tabla 6.2: En la tabla se muestran los péptidos correspondientes a la digestión con tripsina de srEnv-BLVmut con sus respectivos m/z, teóricos y experimentales (en rojo figuran los peptidos glicosilados encontrados y en negro los no glicosilados encontrados) obtenidos por MALDI-TOF-TOF y su secuencia correspondiente.

En solución

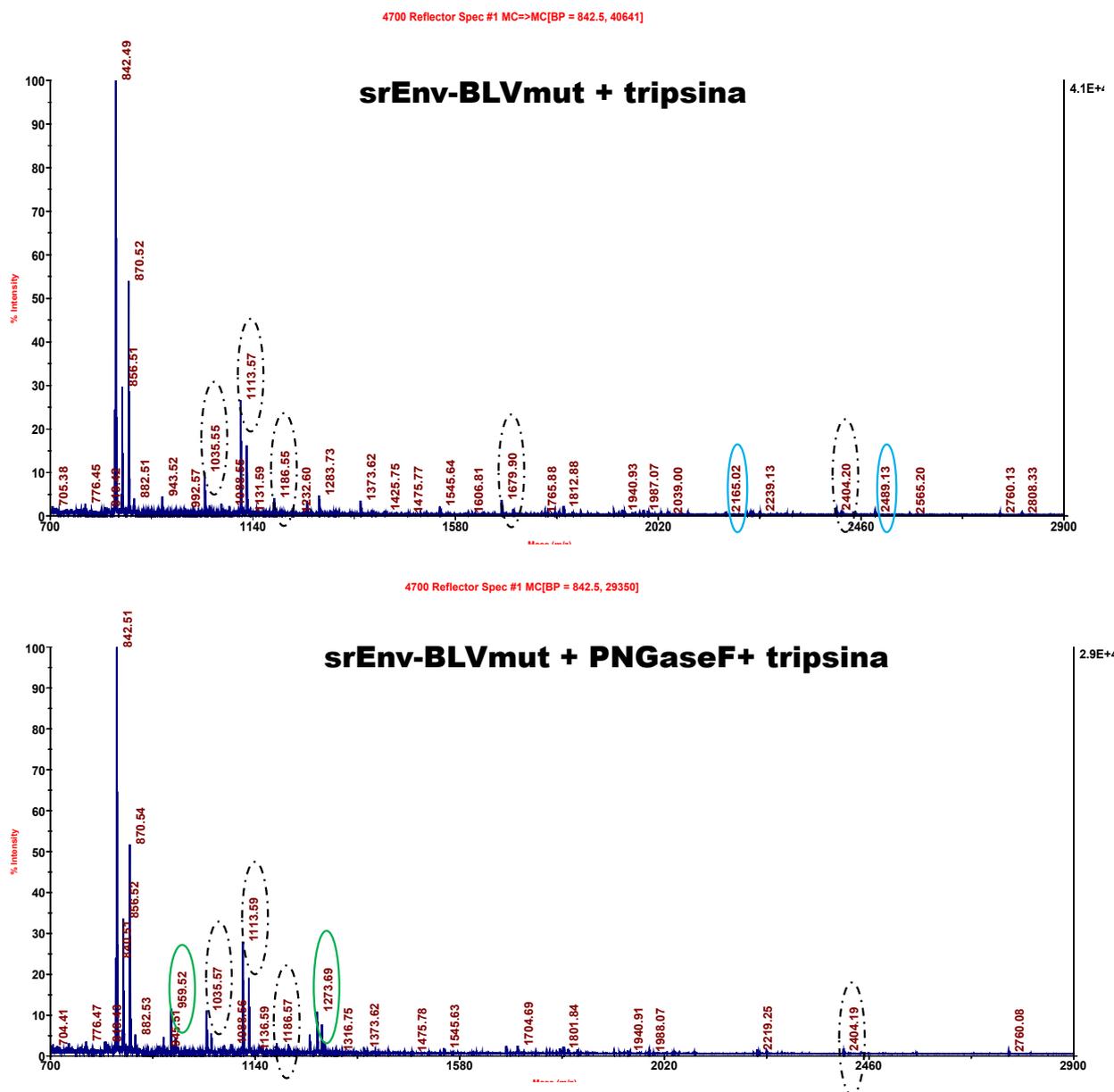


Figura 6.16: Análisis por espectrometría de masa de la proteína srEnv-BLVmut en solución glicosilada (arriba). En óvalo punteado gris se señalan los m/z cuya masa coincide con los valores teóricos de digestión tríptica. Los óvalos llenos celestes indican péptidos glicosilados al desaparecer luego del tratamiento con PNGaseF (abajo). Los óvalos llenos verdes representan los péptidos cuyas m/z pertenecientes a Env aparecen luego de la deglicosilación.

Con respecto al péptido tríptico “glicosilado” con m/z=3590.7 Da se observó que el mismo presentaba otros dos péptidos flanqueándolo con m/z= 3444.7 y 3768.7Da (**figura 6.17**). Estos 3 péptidos potencialmente glicosilados presentaban diferencias entre ellos de 146 y 178 compatible con la pérdida de fucosa (o deoxihexosas) y gluconoylation, respectivamente. Estos péptidos fueron fragmentados y en la fragmentación se observa la secuencia peptídica hacia la izquierda (iones b e y) (**figura 16** MS/MS m/z 3590.7) y hacia la derecha se comienzan a ver péptidos modificados

pertenecientes a glicanos. Estas fragmentaciones permitieron la identificación del péptido: LITAINQTHYNLLNVASVVAQNR y también la confirmación de que este péptido estaba glicosilado. Estos datos posteriormente se confirmaron con la secuencia deglicosilada donde se encontró el péptido de 2553.59Da (**figura 6.15**). La diferencia encontrada entre la m/z del péptido glicosilado y el péptido obtenido por digestión teórica fue de 1039Da. Esta masa correspondería a una estructura que contiene 3 hexosas y 2 N-acetilhexosaminas, una de ellas unida a una deoxihexosa (programa Delta Mass-ABRF). Con esta información y sabiendo que la N-glicosilación en *Drosophila* contiene glicanos simples ricos en manosa definimos que las hexosas serían manosas, las N-acetilhexosaminas serían N-acetilglucosamina (pertenecientes al core de N- glicosilación, GlcNAc) y las deoxihexosas en este caso serían fucosas dado que están presentes en las células de *Drosophila*. La estructura propuesta se muestra en la **figura 6.15** y posteriormente fue confirmada por análisis de N-glicanos (**figuras 6.22-6.25 ver más adelante**).

Otro de los péptidos glicosilados identificados fue el péptido SWALLLNQTAR con una m/z experimental de 2165.02Da. Al igual que en el caso anterior la fragmentación confirmó la secuencia peptídica del mismo. La presencia de carbohidratos fue confirmada luego del tratamiento con PNGase F dado que el péptido deglicosilado presentó un m/z correspondiente a 1273.60Da (**figura 6.18**). Este fue fragmentado (**figura 6.19**) confirmando no sólo la secuencia del péptido sino también determinando que efectivamente la PNGase F cambia la asparagina por ácido aspártico. Esto se visualiza mediante la fragmentación donde se observan los iones y y b y la secuenciación de este péptido.

Péptido glicosilado (m/z=3590.78): LITAINQTHYNLLNVASVVAQNR

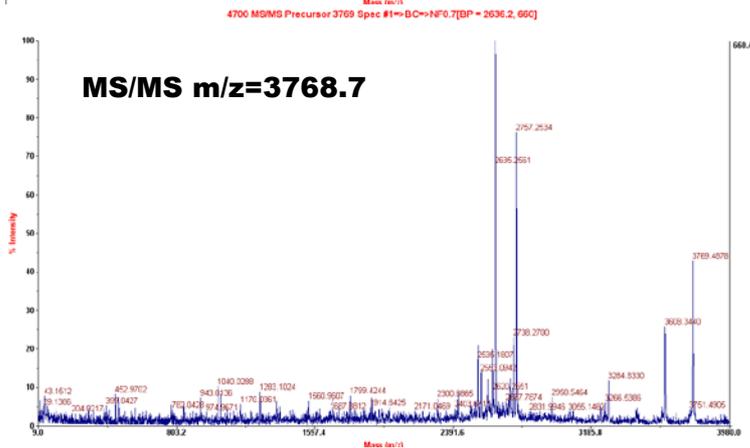
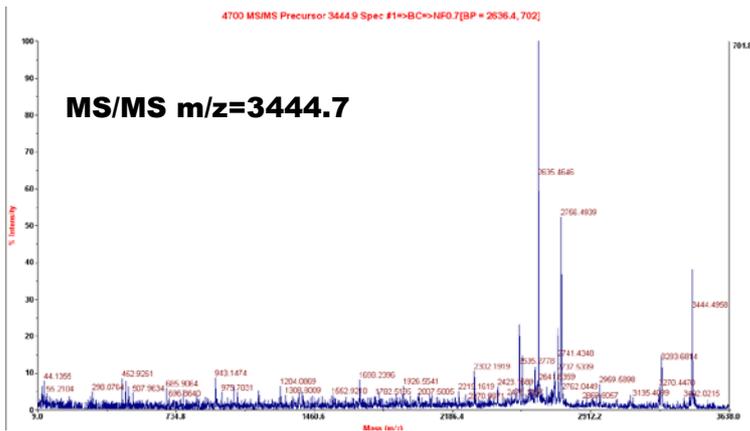
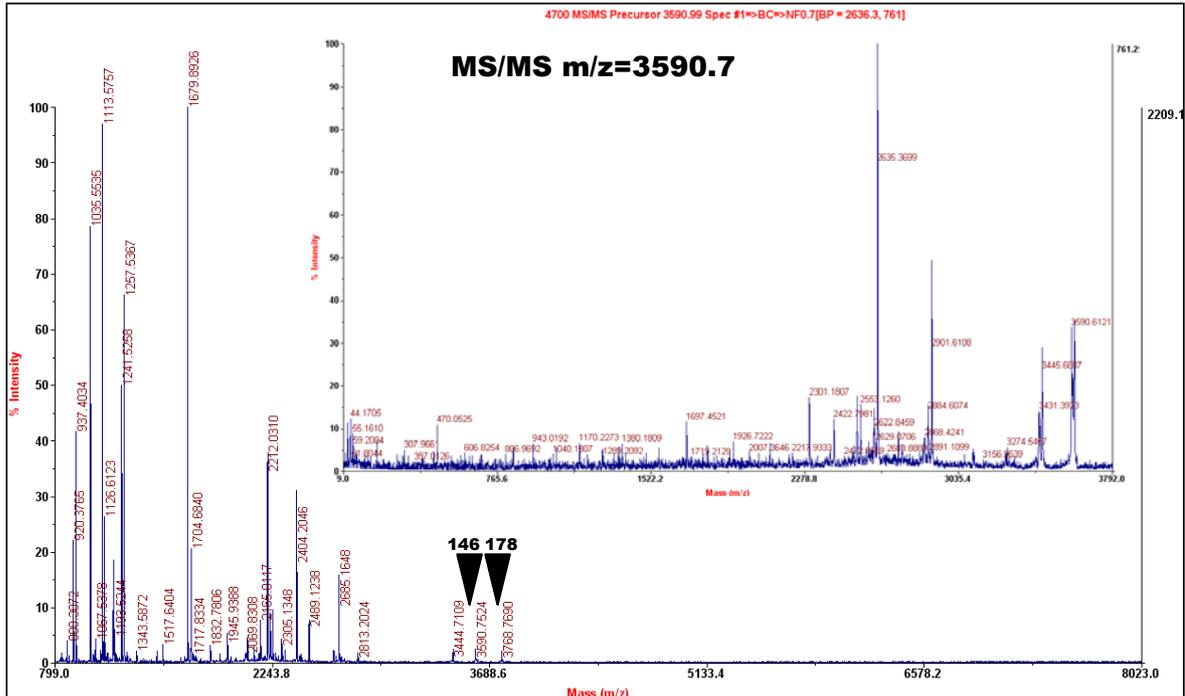


Figura 6.17: Análisis del péptido glicosilado con m/z=3590.78. Arriba: MS de la srEnv-BLVmut glicosilada donde se señalan los péptidos trípticos glicosilados que difieren en 146 y 178Da. También se muestra la fragmentación del péptido con m/z=3590.78. Medio y abajo: MS/MS de los péptidos glicosilados que confirman también la secuencia: LITAINQTHYNLLNVASVVAQNR. La fragmentación de los 3 péptidos confirma la secuencia del péptido glicosilado.

Péptido glicosilado: SWALLLNQTAR

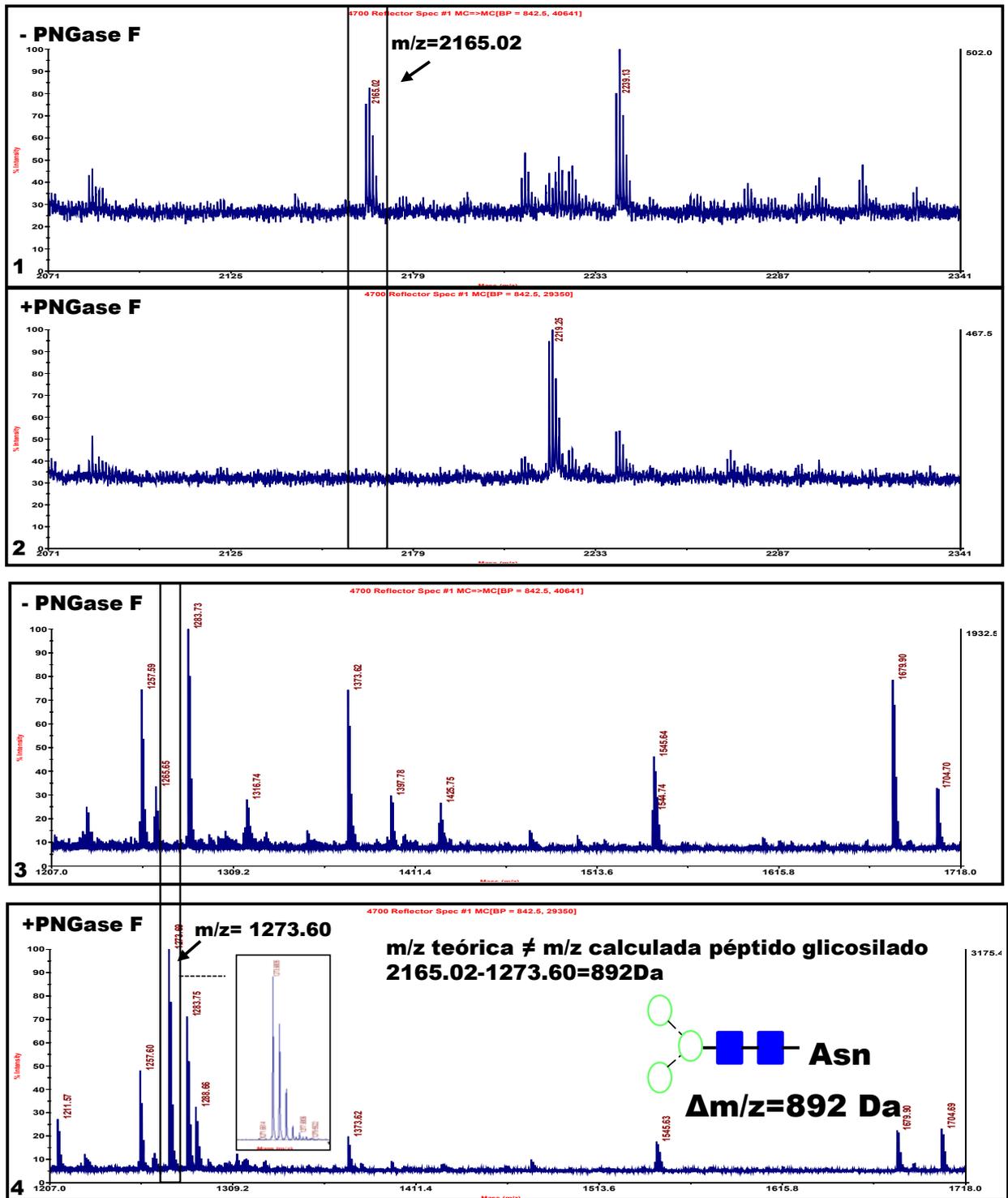


Figura 6.18: Análisis del péptido glicosilado con $m/z = 2165.02$. Análisis por MS de la proteína srEnv-BLVmut glicosilada y deglicosilada (+ PNGaseF) donde se señala la desaparición del péptido glicosilación espectro 1y3 y la aparición del péptido deglicosilado panel 2 y 4 luego del tratamiento. Se propone la estructura del N-glicano por $\Delta m/z$.

MS/MS de precursor m/z= 1273.60

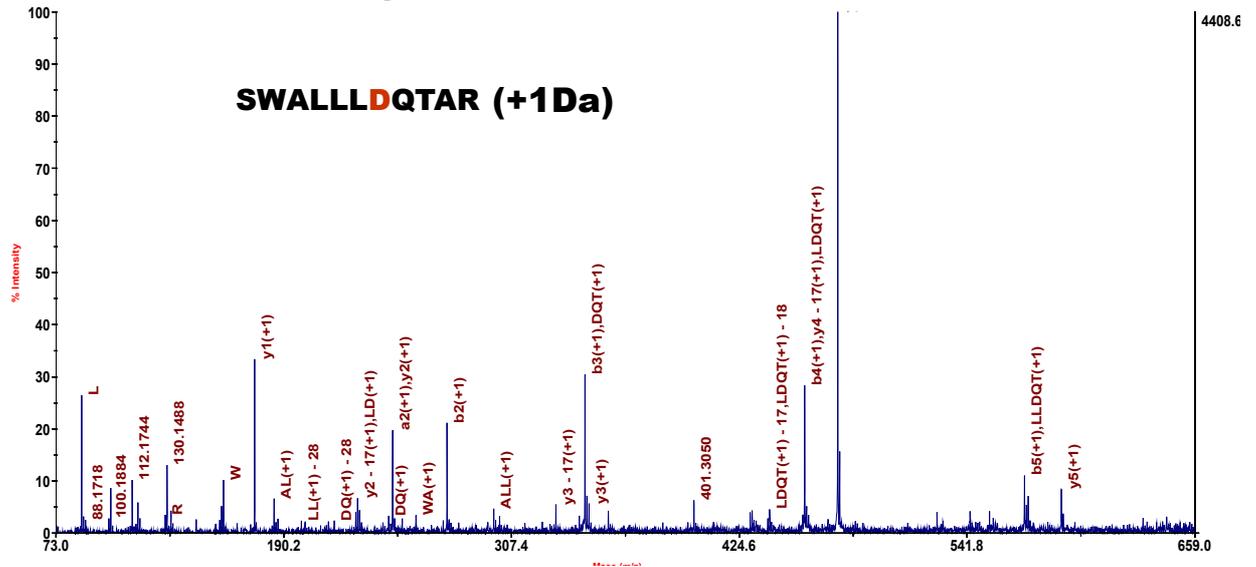


Figura 6.19: Fragmentación (MS/MS) del precursor m/z=1273.60Da correspondiente a la proteína deglicosilada donde se confirma y modificación por la PNGase F (+1Da).

Por su parte se detectaron péptidos glicosilados en varios de los sitios potenciales de N-glicosilación en la proteína deglicosilada permitiendo la asignación de los mismos así como la presencia de ácido aspártico en el sitio donde estaba el N glicano por el incremento en +1Da por cada asparagina modificada (**figuras 6.20-6.21**). En alguno de estos péptidos que fueron identificados por el procesamiento de spots derivados de 2D SDS-PAGE también se encontraron Cys modificadas con un incremento de +57Da debido a la reducción y alquilación de cisteínas durante el procesamiento de los spots para 2D. Este incremento se dio por cada cisteína modificada (péptido FDCPHWDNASQADQGSFYVNHQILFLHLK, m/z teórico del péptido tríptico= 3428.59Da; m/z experimental luego de deglicosilación=3488.61Da, modificación por Cys (IAA) + sitio glicosilado) y en algunos péptidos incluso se encontraron 2 cisteínas modificadas AFPDCAICWEPSPPWAPEILVYNK m/z teórica=2743.28, m/z calculada (+ PNGaseF)= 2861,3423 (Δ m/z 114Da, 2 Cys oxidadas + sitio glicosilación) (**figura 6.21**).

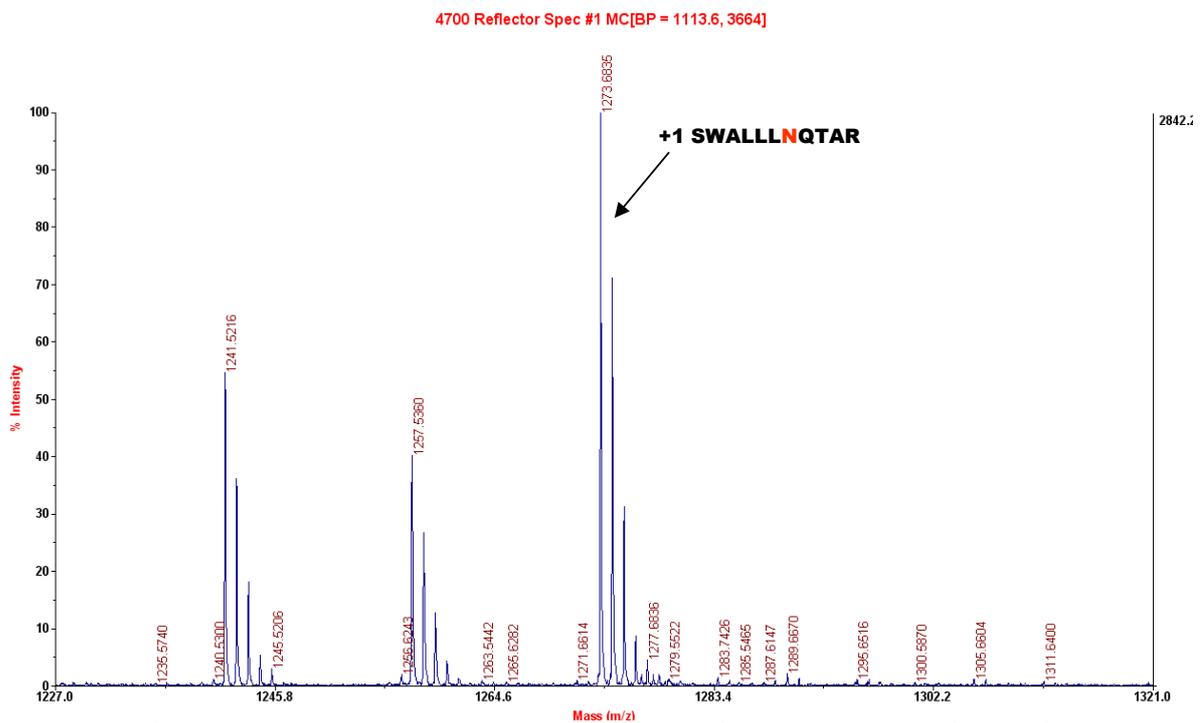
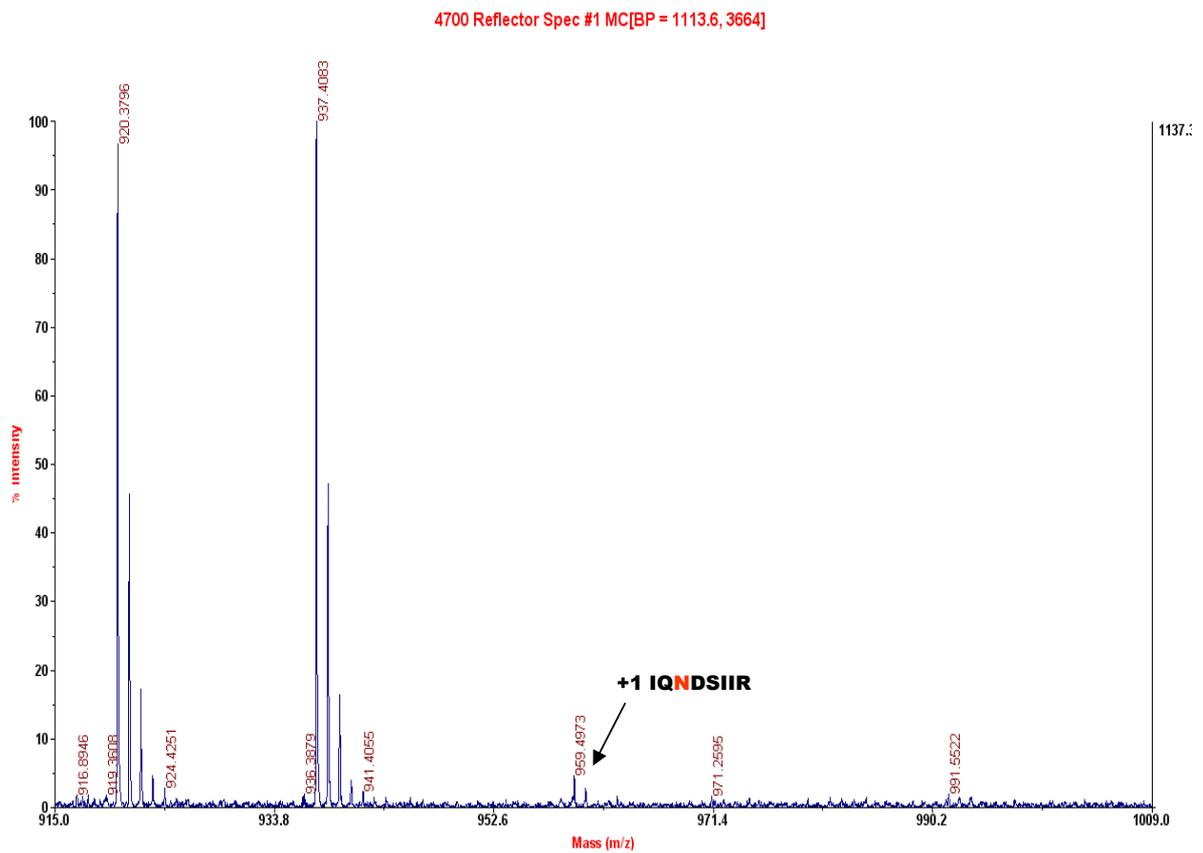


Figura 6.20: Análisis por MS de la srEnv-BLVmut deglicosilada (+PNGaseF) donde se visualizan péptidos trípticos de secuencias potencialmente glicosiladas donde se confirma la modificación N-D con un +1Da

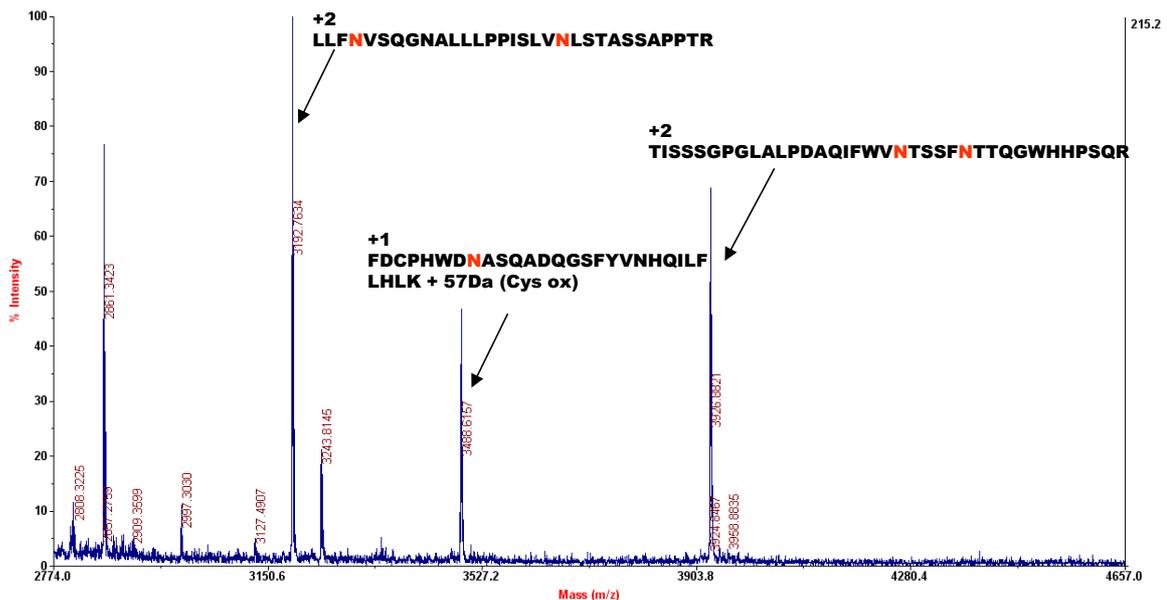
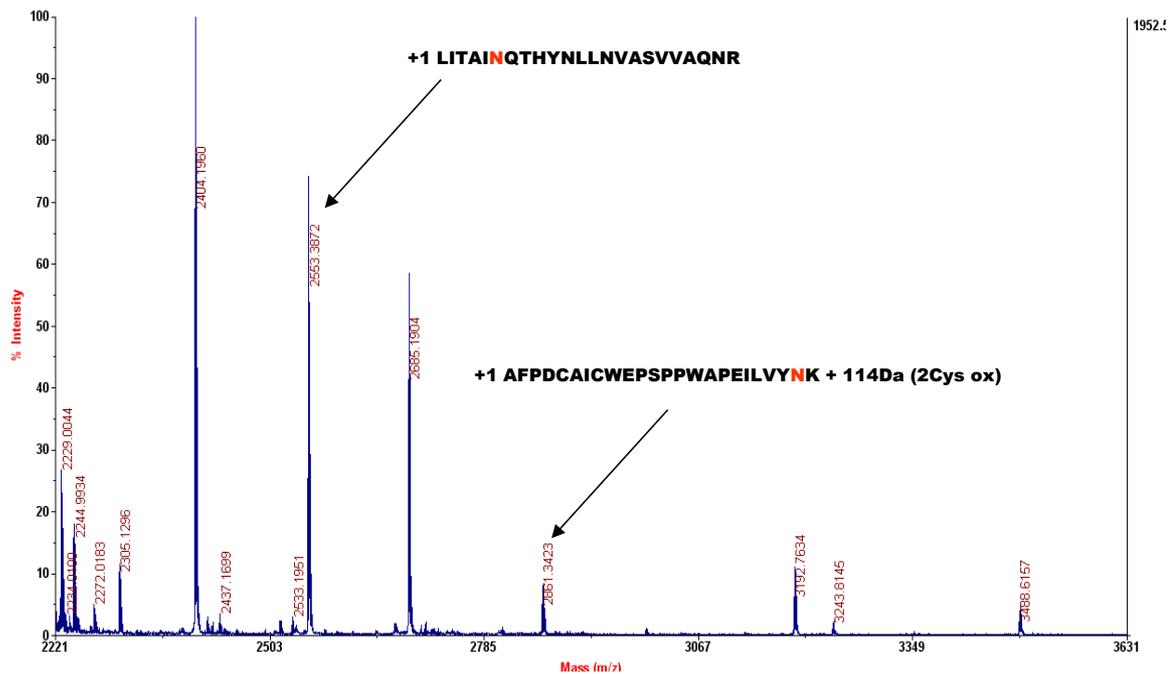


Figura 6.21: Análisis por MS de la srEnv-BLVmut deglicosilada (+PNGaseF) donde se visualizan péptidos trípticos de secuencias potencialmente glicosiladas donde se confirma la modificación N-D con un +1Da, +2Da (con 2 sitios de glicosilación) + modificaciones adicionales (Cys modificadas por ej).

De este modo mediante tratamiento con PNGaseF, encontrando los péptidos trípticos correspondientes con distintos $\Delta m/z$ que indicaban presencia de ácido aspártico como consecuencia del corte de la glicosidasa y en 2 casos encontrando directamente los péptidos glicosilados se lograron establecer los sitios de N-glicosilación de la proteína Env recombinante mutante de BLV (**tabla 6.3**). De

los sitios potenciales de N-glicosilación se confirmaron 9 como sitios concretos de N-glicosilación en esta proteína recombinante. Con respecto a la secuencia compatible con N-glicosilación generada por mutagénesis dirigida para eliminar el sitio de furina (NNS, N292) se comprobó que el mismo no estaba glicosilado. Este es el primer trabajo analítico realizado en la glicoproteína Env de BLV en la asignación concreta de sitios de N-glicosilación. Es importante tener en cuenta sin embargo que este trabajo se realizó con la proteína recombinante por lo cual no podemos afirmar que los mismos sitios de N-glicosilación estarían “ocupados” por N-glicanos de la misma manera en la proteína nativa. Sin embargo la asignación de sitios de N-glicosilación para ambas proteínas sería la misma, los 9 son sitios potenciales en ambas proteínas.

Tabla 6.3: Confirmación de sitios de N-glicosilación por espectrometría de masa en muestras glicosiladas y deglicosiladas

Peptido con sitio potencial de N-glicosilación (digestión triptica)	Masa teórica (Da)	Masa experimental calculada (m/z)	Masa experimental calculada con PNGase F(m/z)	Sitio de N - glicosilación
FSISIDQILEAHNQS PFCAK	2246.09	2247.09	2247.09	NO (N59)
FDCPHWDNASQADQGSFYVNHQ ILFLHLK	3428.59	-----	3488.60	SI (N121)
SWALLLNQTAR	1271.60	2165.02	1273.60	SI (N195)
AFPDCAICWEPSPPWAPPEILVY NK	2743.28	-----	2861.34	SI N222
TISSSGPGLALPDAQIFWVNTS SFNTTQGWHPHSQR	3923.9	-----	3926.88	SI (N243/N248)
LLFNVSQGNALLLPPISLVNLS TASSAPPTR	3189.78	-----	3192.76	SI (N263/N279)
VNNSPVAALTLGLALSGLTGI NVAVSALSHQR	3241.88	3242.78	3242.78	NO (N292)
LITAINQTHYNLLNVA SVVAQN R	2551.39	3590.7769	2553.39	SI (N343)
IQNDSIIR	957.52	-----	959.49	SI (N390)

(PNGase F).

Los N-glicanos presentes en la srEnv-BLVmut se purificaron luego del tratamiento de la proteína con PNGase F. Estos N-glicanos fueron derivatizados empleando 2AB y posteriormente purificados por HPLC asignando valores de unidades de glucosa (GU) según los tiempos de retención en comparación

con el estándar (hidrolizado de dextrano). Los valores de GU fueron incorporados en la base de datos (NiBRT) para definir estructuras glicánicas posibles teniendo en cuenta el sistema donde la proteína se había producido. Una vez asignadas las estructuras en base a valores de GU, los datos fueron confirmados mediante dos aproximaciones complementarias: espectrometría de masa (MALDI-TOF) y digestión con exoglicosidasas.

La purificación de N-glicanos se realizó en primera instancia para la proteína Env recombinante. La **figura 6.22** muestra los resultados del HPLC con los N-glicanos purificados y derivatizados tanto para la proteína srEnv-BLVmut como para el hidrolizado de dextrano empleado como estándar. Para ello el HPLC fue calibrado con un hidrolizado de dextrano (que posee distintas unidades de glucosa) y los volúmenes de retención (tiempo de retención TR) para cada pico del hidrolizado (con 4 glucosas, 5 glucosas, etc) se correlacionó con unidades de glucosa. Por este motivo los valores de HPLC aparecen como unidades de glucosa en el cromatograma (**figura 6.22**). Los volúmenes de retención de los picos obtenidos a partir de la muestra de N-glicanos purificados se correlacionó con las unidades de glucosa presentes en el control y los valores de GU se colocaron en la base de datos.

Asignación de estructuras de N-glicanos rEnv-BLVmut

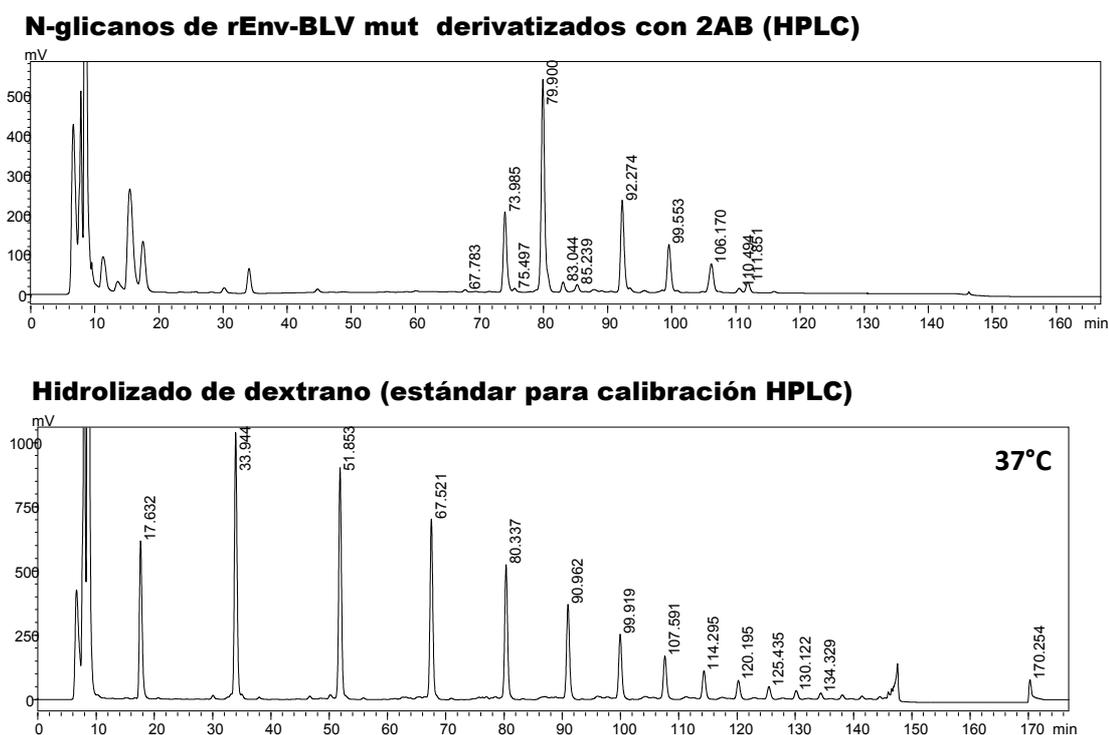


Figura 6.22: Perfil obtenido por NP-HPLC (amida) de los N-glicanos liberados enzimáticamente por PNGaseF de la proteína srEnv-BLVmut (arriba) y el cromatograma correspondiente al hidrolizado de dextrano empleado como control para la asignación de GU.

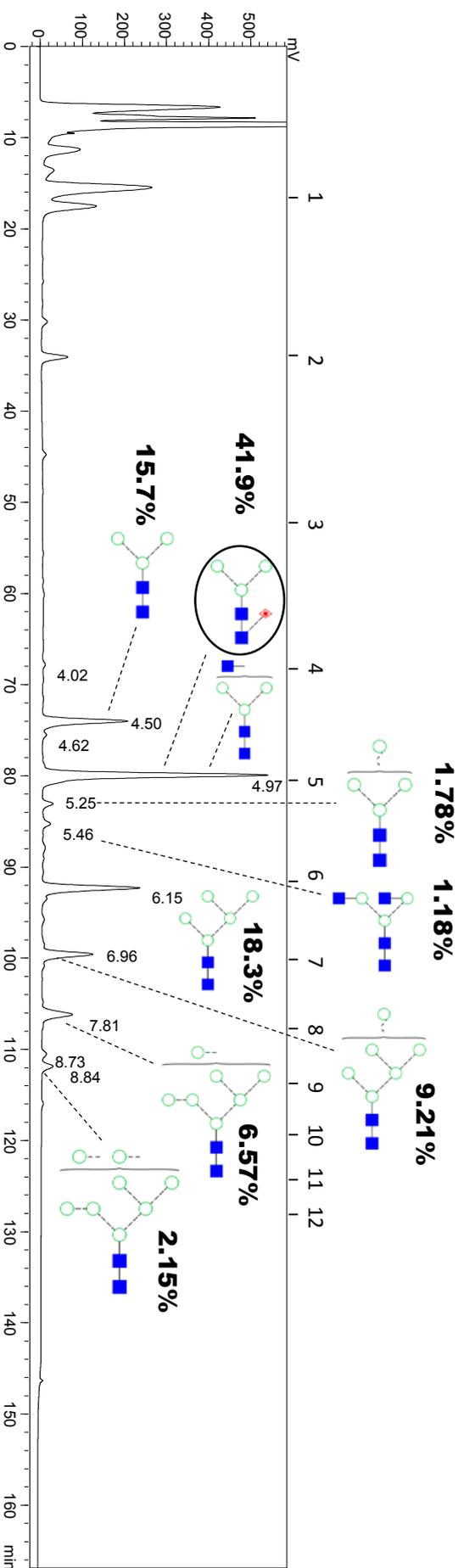
rEnv-BLV mut				
TR	Area	GU exp	GU teor	Estructuras
67.783	180559	4.02		
73.985	7607948	4.50	4.44	
75.497	317609	4.62		
78.8	100123	4.88	4.89	F(6)M3
79.9	20307433	4.97	4.97	A1
83.044	864846	5.25	5.26	M4
85.239	574358	5.46	5.45	A2
92.274	8879363	6.15	6.17	M5
93.471	361342	6.28	6.3	A2[6]G(4)1
95.733	155224	6.53		
99.553	4463791	6.96	6.96	M6 D2
106.17	3182590	7.81	7.82	M7 D3
110.494	415169	8.73	8.72	M8
111.851	1042497	8.84	8.81	M8

Tabla 6.4: Valores de: tiempo de retención (TR) de los picos obtenidos de N-glicanos de srEnv-BLVmut, área debajo de los picos correspondientes, valor experimental de GU, valor teórico de GU y la estructura asignada.

En la tabla 6.4 se muestran los tiempos de retención (TR) para la proteína srEnv-BLVmut, el área bajo la curva, el valor de GU experimental, el valor de GU teórico y la estructura asignada según la base de datos NiBRT. Mediante este abordaje es posible entonces tener una correlación directa entre los tiempos de retención y las unidades de glucosa presentes mostrando entonces cada pico del HPLC asociado con el volumen de retención correspondiente (**figura 6.23**). Una vez establecidas las unidades de glucosa, las mismas fueron ingresadas en motores de búsqueda de estructuras glicánicas (NiBRT) y se seleccionaron aquellas compatibles con los valores de GU obtenidos experimentalmente tomando en consideración el sistema de expresión utilizado. En nuestro caso particular estaríamos en presencia de estructuras con 2-3 manosas o más, con residuos de fucosa siendo en general N-glicanos simples. En este sentido y comparando con los péptidos glicosilados encontrados por espectrometría de masa (**figura 6.15 es 17 y 6.18**) las estructuras que fueron propuestas para ambos péptidos de 1039 y 892Da se encuentran presentes en el análisis de N-glicanos y corresponden a 4.5 y 4 unidades de glucosa, respectivamente (**figura 6.23**). En general para un mismo valor de GU existen 2 o más estructuras propuestas. En la figura 23 para GU= 4.97 se postulan 2 estructuras posibles pero se elige la que contiene fucosa dado que se correlaciona con la estructura del péptido glicosilado con un $\Delta m/z$ de 1039Da (**figura 17es 6.15**). A su vez se observa que el core inicial de N-glicosilación Man3GlcNAc2 aparece entre los glicanos presentes y también coincide con la estructura propuesta para el péptido glicosilado con un $\Delta m/z$ de 892Da (**figura 6.18**). El resto de las estructuras reflejan N-glicanos simples con incorporación de residuos de manosa. Nuestros resultados son consistentes con los resultados obtenidos por Lin y cols ¹⁵⁴ en el cual realizaron análisis de N-glicanos en la proteína HA del virus influenza en distintos sistemas de expresión. En este trabajo la proteína HA producida en células Sf9 presentó N-glicanos con las mismas características que los encontrados en este trabajo de tesis: N-glicanos simples paucimanosídicos o con alto contenido en manosa.

sRENBLV- mut

HPLC- N glicanos derivatizados con ZAB



○ manosa

■ N-acetilglucosamina

◆ fucosa

Figura 6.23: Perfil obtenido por HPLC de N-glicanos (**fig 6.22**) donde los tiempos de retención se adjudicaron a valores de GU luego de ajustarlo con el control de hidrolizado de dextrano. Asimismo se ilustran las estructuras asociadas a los valores de GU experimentales con los % relativos de los N-glicanos obtenidos.

El $\Delta m/z$ de ambos péptidos glicosilados corresponderían a 1039 y 892Da (**figura 6.15 y 6.18**) estas estructuras calculadas teóricas fueron confirmadas por los ensayos de purificación de N-glicanos. Las potenciales estructuras glicánicas para la srEnv-BLVmut producida en *Drosophila* se muestran en la **figura 6.23**. Como se observa estas estructuras coinciden con las estructuras de N-glicanos esperadas para los péptidos glicosilados mejor caracterizados que obtuvimos LITAINQTHYNLLNVASVVAQNR y SWALLLNQTAR (**figuras 6.15, 6.18, 6.23**). Asumiendo una proporcionalidad directa entre la intensidad de fluorescencia de los picos y la masa de los glicanos y asumiendo que todos fueron derivatizados en la misma proporción se calculó el porcentaje de cada uno de los glicanos mostrando aquellos más representativos (el cálculo se realizó empleando el área bajo la curva de cada pico) (**figura 6.22**). Cabe aclarar que esta es una cuantificación relativa. Pudo observarse que los glicanos ricos en fucosa fueron los más representados Man3GlcNAc2Fuc (41,9%), seguidos de Man2Man3GlcNAc2 (18,3%) y en tercer lugar el core Man3GlcNAc2 (15,7%). Finalmente siguen en orden de abundancia las siguientes estructuras: Man3Man3GlcNAc2 (9.21%), Man4Man3GlcNAc2 (6.57%), Man5Man3GlcNAc2 (2.15%), ManMan3GlcNAc2 (1.78%) y GlcNAc2Man3GlcNAc2 (1.18%). Luego de la asignación de N-glicanos posibles estos datos se confirmaron utilizando MALDI (**figura 6.24**) (sin derivatizar) y empleando exoglicosidasas (**figura 6.25**) para quitar ácido siálico, manosa, fucosa, GlcNAc, galactosa confirmando las estructuras obtenidas.

En el caso de la confirmación por espectrometría de masa (MALDI-TOF) la medida se realizó en modo reflector negativo (se debe restar 1Da) y los N-glicanos para realizar esta medida no fueron derivatizados. Los valores de m/z obtenidos permitieron confirmar las estructuras propuestas según los valores de GU obtenidos de los N-glicanos derivatizados y corridos por HPLC. Nuevamente las estructuras contienen residuos de fucosa y son paucimanosídicas (2-3 residuos de manosa) o ricas en manosa. La asignación de estructuras se basó en el programa Glycanmass (<http://web.expasy.org/glycanmass/>), ingresando los valores de m/z experimentales. Las diferencias establecidas entre los distintos m/z permiten observar incrementos de 146Da (fucosa) o 162Da (manosa). El core inicial correspondiente a $m/z=892$ Da (Man3GlcNAc2) no se logró observar por espectrometría de masa (**figura 6.24**).

srEnvBLV-mut

Espectros MALDI (modo reflector negativo)

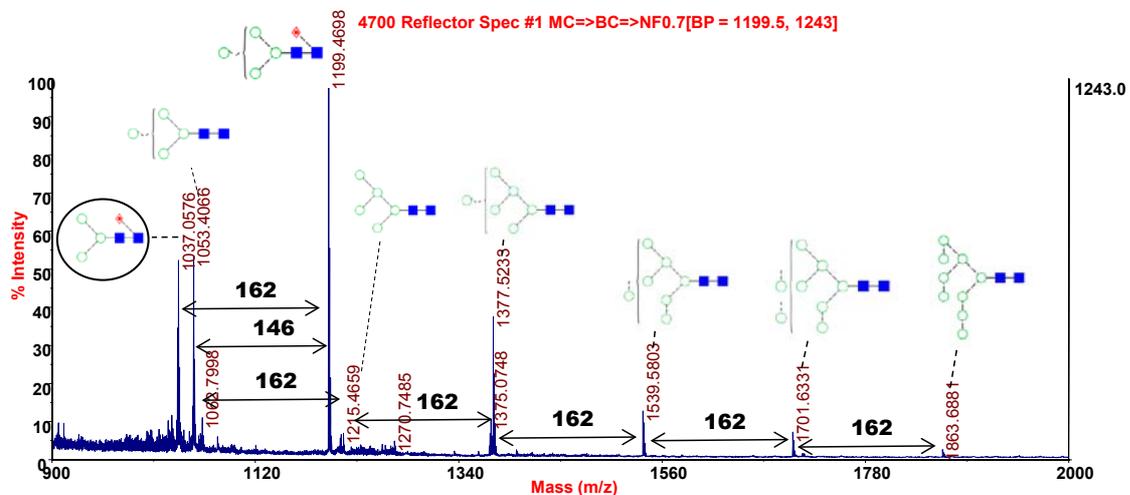


Figura 6.24: Análisis por espectrometría de masa (MALDI-TOF modo negativo) de los N-glicanos aislados liberados con PNGaseF para confirmar las estructuras obtenidas por HPLC (fig 6.23). Estos N-glicanos no fueron derivatizados. Se muestran las estructuras N-glicánicas asociadas a los valores de m/z (Glycanmass) teniendo en consideración que son N-glicanos sin derivatizar. La pérdida de residuos de hexosas (162-manosa por ej) y deoxihexosas (146-fucosa por ej) se ilustran.

La digestión con exoglicosidasas de forma secuencial y conjunta permitió establecer la pérdida de residuos principalmente de fucosa y manosa dando lugar a N-glicanos digeridos con valores de GU correspondientes a las estructuras previamente encontradas en la mezcla inicial así como por MALDI (**figura 6.25**). Se corrobora la ausencia de ácido siálico en esta proteína (no existe modificación en los tiempos de retención de la muestra control vs la muestra digerida con ABS) así como la ausencia de galactosa (digerida con BTG) mientras que los cambios principales se establecieron por corrimiento de los picos de retención con el agregado de BKF (remoción de fucosa) dando lugar al core $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Finalmente la adición de JBM dio lugar a la remoción de todos los residuos de manosa generando como resultado final (resultado de todas las digestiones secuenciales) la estructura básica ManGlcNAc_2 . Esta última estructura no fue observada ni por MALDI ni en el HPLC inicial. Por su parte la digestión con GUH (remoción de GlcNAc terminales) no generó grandes modificaciones siendo por tanto estructuras glicánicas con mayor predominio de manosa terminal.

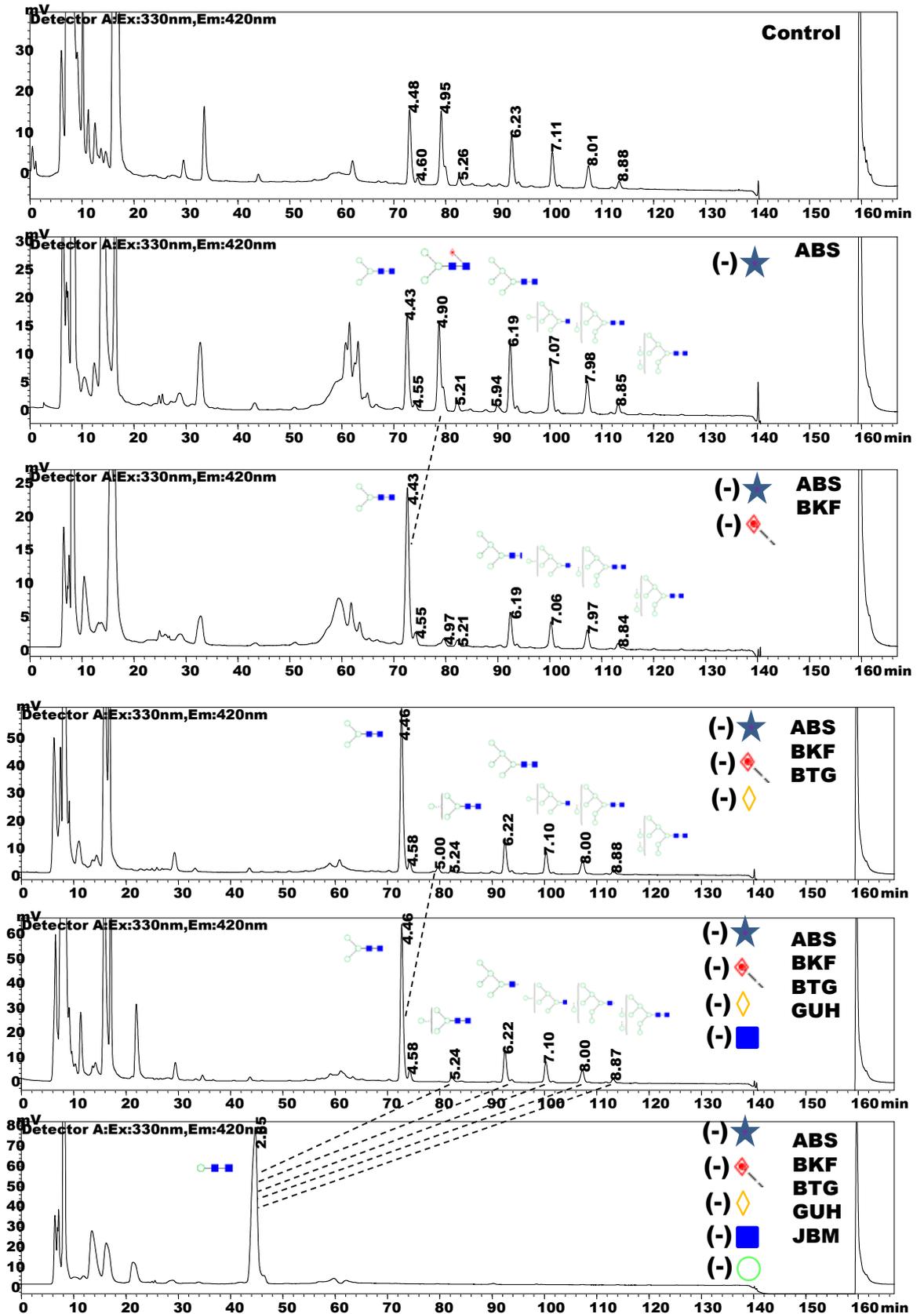


Figura 6.25: Digestión secuencial con exoglicosidasas para confirmar la constitución de los N-glicanos obtenidos en fig 23. Perfiles obtenidos por HPLC de los N-glicanos purificados, derivatizados con 2AB y sometidos a digestión secuencial. Las enzimas figuran a la derecha junto con la pérdida de los residuos carbohidratos correspondientes.

De esta manera fue posible establecer que los N-glicanos presentes en rENVmut-BLV son los siguientes $\text{Man}_{2-3}\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Fuc}$, $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ y sabemos que los péptidos glicosilados LITAINQTHYNLLNVASVVAQNR y SWALLNQTAR contienen específicamente N-glicanos $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ y $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Fuc}$ para cada uno, respectivamente. Este tipo de glicosilación es similar a la obtenida en HIV para gp120 ($\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$) expresada en mamíferos porque se vio que en HIV la expresión de gp120 produce glicanos de oligomanosa inmaduros (IOM) y de hecho uno de los principales anticuerpos neutralizantes de amplio espectro (broadly neutralizing antibodies) está dirigido contra este glicano. Este sería un argumento a favor a la hora de considerar esta proteína para el diseño de vacunas, si bien para influenza se demostró que la mejor respuesta se logra con N-glicanos complejos. Asimismo si bien confirmamos que los N-glicanos en *Drosophila* paucimanosídicos con residuos de fucosa también encontramos glicanos ricos en manosa lo cual reafirma lo reportado por Geisler 2012 en el sentido que la glicosilación en insectos es más compleja que lo aceptado previamente⁹¹.

srEnv-BLVmut

Fraccionamiento en columnas de intercambio aniónico

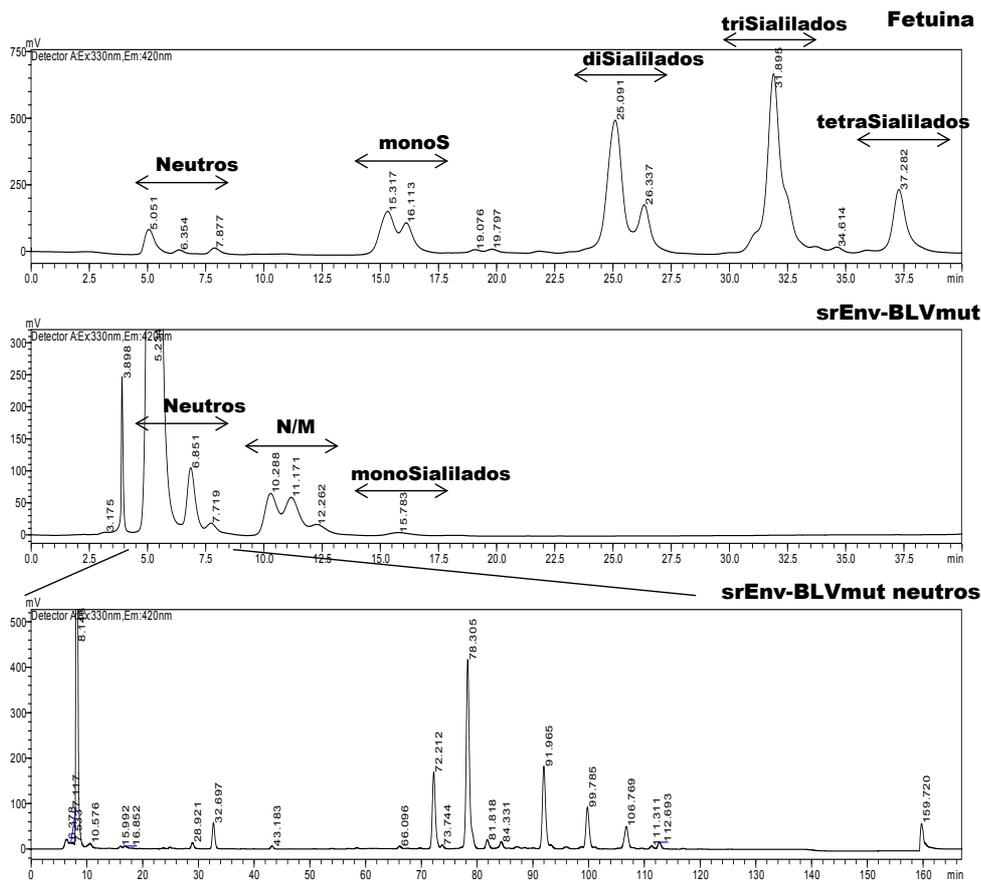


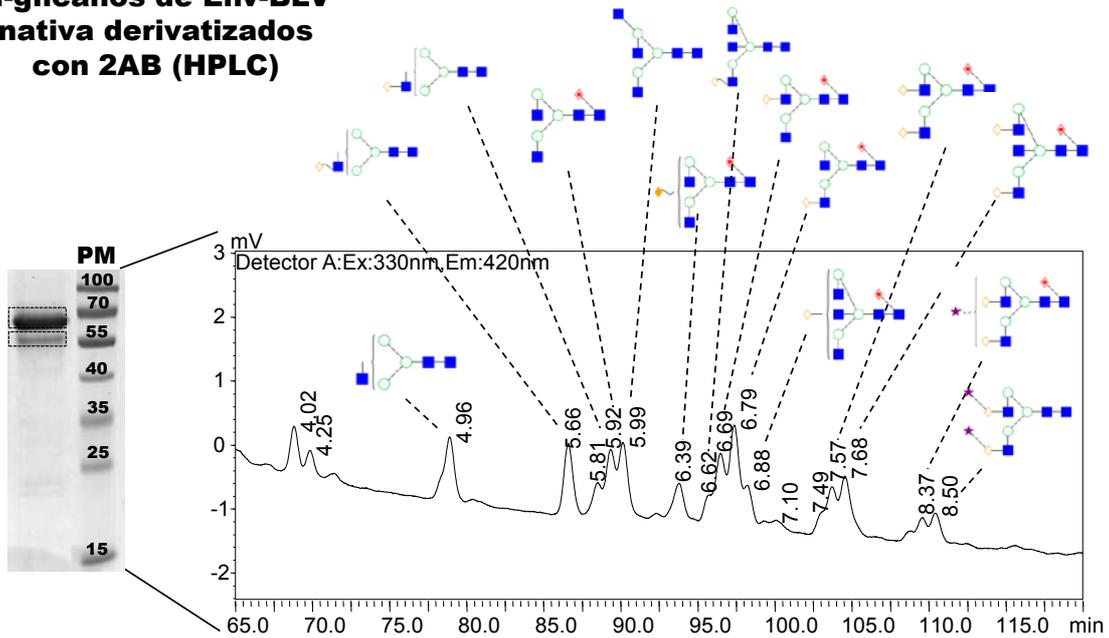
Figura 6.26: Perfil de HPLC obtenido por fraccionamiento en columnas de intercambio aniónico (WAX). Arriba: se muestra el cromatograma correspondiente al control (fetuina, rico en ácido siálico). El perfil obtenido para la srEnv-BLVmut se muestra debajo donde se detalla y se analizan con más detalle los glicanos neutros (abajo).

Finalmente los glicanos se corrieron en columna de intercambio aniónico (**figura 6.26**) empleando fetuina como estándar (proteína muy rica en ácido siálico). De este modo pudimos observar que la contribución de glúcidos cargados en la proteína recombinante es mínima (solamente aparecen escasos glúcidos monocargados). Esto confirma los datos de lectinas donde aquellas que reconocen glicanos cargados como ácido siálico no reconocen la proteína recombinante y a su vez confirma los trabajos previos que establecen que las células S2 de *Drosophila* no poseen actividad sialiltransferasa. La mayoría de los glúcidos presentes en la proteína Env recombinante son glúcidos de tipo neutro con respecto a la carga y estos datos coinciden con las estructuras encontradas. Las células S2 de *Drosophila* no expresan ninguna sialiltransferasa, solamente hay una única enzima capaz de transferir ácido siálico a N-glicanos en *Drosophila* pero se encuentra en células diferenciadas presentes en tejido nervioso¹³⁶. Por este motivo no era de esperar que la srEnv-BLVmut expresada en S2 presentara N-glicanos ricos en ácido siálico a diferencia de lo observado en los N-glicanos obtenidos a partir de las partículas virales purificadas colectadas de células de mamífero las cuales presentan un alto componente de ácido siálico en sus carbohidratos. La presencia de N-glicanos 2,6 sialilados ha sido confirmada recientemente por espectrometría de masa^{12, 137} en *Drosophila* pero no en la línea celular S2. Asimismo recientemente se demostró que los insectos también serían capaces de sintetizar glicanos híbridos y complejos⁹¹.

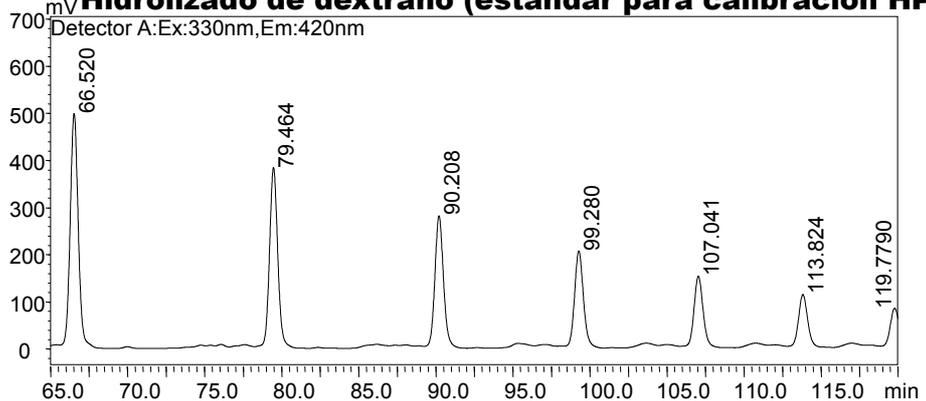
La asignación de N-glicanos también se realizó para la proteína nativa proveniente de partículas virales purificadas de BLV. El mismo principio se aplicó para la proteína nativa y se definieron las estructuras glicánicas posibles (**figura 6.27**). Sin embargo la cantidad de proteína no fue suficiente para realizar la confirmación por exoglicosidasas o espectrometría de masa (por MALDI-TOF). En este caso sería necesario realizar intercambio aniónico dado que para la proteína nativa uno de los componentes más importantes presentes es el ácido siálico lo cual confirma los resultados de lectin-blot. De todos modos fue posible asignar estructuras de N-glicanos estableciendo la presencia de ácido siálico, glucosa y galactosa a diferencia de la proteína recombinante donde predominan los glúcidos ricos en manosa y que presentan fucosa. De la comparación de N-glicanos presentes entre la proteína Env recombinante y la proteína Env nativa se observó que los glicopéptidos obtenidos de la proteína nativa presentan un alto contenido de ácido siálico lo cual confirma los resultados preliminares realizados con lectinas en partículas virales purificadas (**Figura 6.2**). Si bien es necesario confirmar los datos este sería el primer abordaje glicoproteómico de la proteína Env-BLV nativa.

Asignación de estructuras de N-glicanos Env-BLV nativa

N-glicanos de Env-BLV nativa derivatizados con 2AB (HPLC)



Hidrolizado de dextrano (estándar para calibración HPLC)



- manosa
- N-acetilglucosamina
- ◆ fucosa
- ◇ galactosa
- ◇ glucosa
- ★ ácido siálico

Figura 6.27: Arriba izq- SDS-PAGE/AgNO₃ donde se señalan las bandas correspondientes a la purificación de partículas virales a partir de las cuales se realizó la purificación de N-glicanos con PNGaseF. Arriba der-HPLC de N-glicanos derivatizados donde se muestran los picos correspondientes a los volúmenes de retención convertidos a unidades de glucosa en base al estándar (abajo). Se ilustran también las posibles estructuras glicánicas.

TR	GU exp	GU teor	Nomenclatura
78,886	4,96	4.96 ± .05	A1
86,596	5,66	5.66 ± .07	A1G1
88,495	5,84	5.81 ± .08	A1G(4)1
89,332	5,92	5.90 ± .04	F(6)A2
90,131	5,99	5.98 ± .00	A3(2,2,6)
93,772	6,39	6.39	F(6)A2GalNAc1
95,708	6,61	6.62 ± .08	A2[3]BG1
96,458	6,69	6.66 ± .06	F(6)A2[6]G(4)1
97,363	6,79	6.80 ± .08	F(6)A2[3]G(4)1
98,216	6,88	6.90 ± .06	F(6)A2BG(4)1
100,065	7,10	7.15 ± .04	A2G(4)2
103,058	7,49	7.50 ± .05	F(6)A2G(4)1S1
103,718	7,57	7.56 ± .04	F(6)A2G(4)2
104,541	7,68	7.68 ± .04	F(6)A2BG(4)2
109,546	8,37	8.34 ± .16	F(6)A2G(4)2S1
110,425	8,50	8.53 ± .27	A2G(4)2S(6,6)2

Tabla 6.5 (idem tabla 6.4): Valores de: tiempo de retención (TR) de los picos obtenidos de N-glicanos de srEnv-BLVmut, valor experimental de GU, valor teórico de GU y la estructura asignada.

La proteína Env recombinante mutante soluble de BLV presenta glúcidos simples, ricos en manosa. A pesar de estar glicosilada y de generar una buena respuesta humoral en ratones (la proteína es inmunogénica) es necesario realizar ensayos para determinar cuántos de estos anticuerpos serían neutralizantes así como evaluar también la respuesta de células T.

Este es un aspecto importante si se piensa utilizar este tipo de abordaje experimental como punto de partida para el diseño de vacunas. En HIV se ha demostrado la limitada inmunogenicidad presente en las proteínas Env debido a la excesiva glicosilación. Por este motivo varias estrategias con fin de vacunación buscan aumentar la inmunogenicidad eliminando los N glicanos de gp120. De todos modos es importante destacar que favorecer la inmunogenicidad implicaría aumentar aquellos anticuerpos de carácter neutralizante (NAbs). Sin embargo en esta línea trabajos realizados en HIV-1 demostraron que la deglicosilación favorece la inmunogenicidad dependiente de anticuerpos que neutralizan gp41 pero también eliminan aquellos que reconocen glicanos como antígenos¹³⁸. A nivel general la gp160 deglicosilada aumentaría la respuesta de anticuerpos pero el problema es establecer cuáles de ellos son efectivamente neutralizantes, a su vez las características de las proteínas Env expresadas deben poseer la estructura de trímero estable de lo contrario la calidad de los anticuerpos disminuye enormemente. De aquí la importancia de tener una proteína Env de BLV con características oligoméricas adecuadas para ser usada como inmunógeno y analizar la respuesta en presencia y ausencia del conjunto completo de N-glicanos. En base a los resultados obtenidos de ELISA en ausencia de glicanos podemos suponer la existencia que algunos determinantes antigénicos presentes en la Env de BLV sean glicanos y por tanto es necesario caracterizarlos para conocer que tipo de proteína debería utilizarse.

6.5) CONCLUSIONES

Se confirmó que una de las modificaciones postraduccionales más sobresalientes presentes en la proteína Env-BLV es la N-glicosilación. La mayoría de los sitios se hallan conservados entre los distintos aislados sugiriendo la implicancia de estos sitios en la integridad estructural y funcional así como en la evasión de la respuesta inmune. Hasta el momento no se ha determinado con certeza cuál es la contribución de cada uno de los sitios individualmente en la función de la proteína y tampoco se han realizado ensayos de respuesta que evalúen la implicancia del conjunto de N-glicanos en el reconocimiento por parte del sistema inmune. Esto ha sido demostrado para HIV-1¹⁶¹.

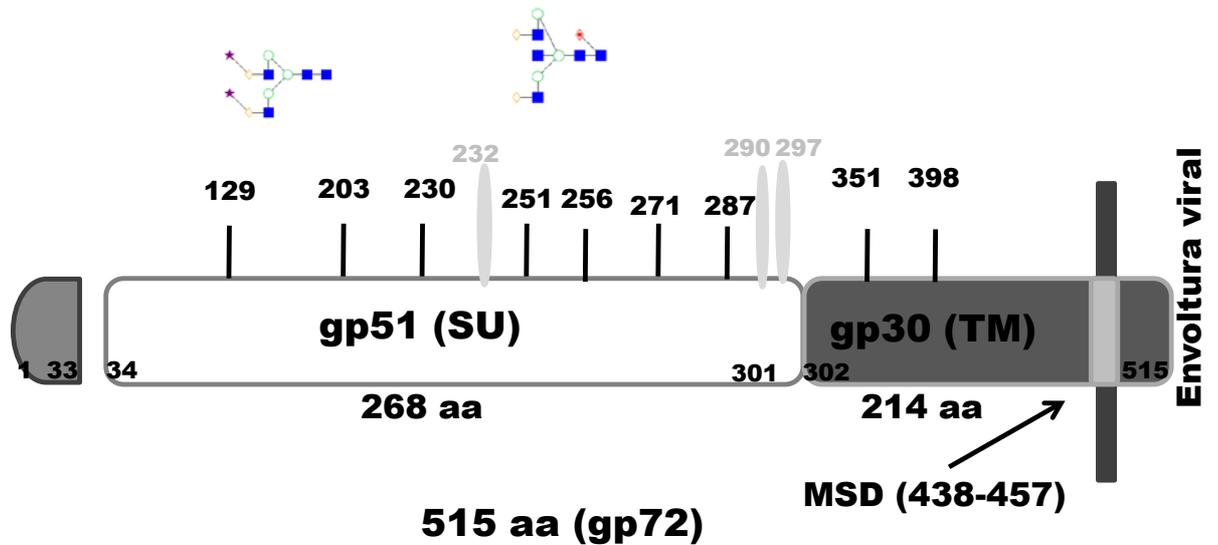
El análisis proteómico de partículas virales permitió establecer un patrón de reactividad de la gp51 mediante 2D SDS-PAGE/WB compatible con N-glicosilación. Este patrón aparecía como un tren de spots (13-15 aproximadamente) con grupos cargados negativamente compatible con la adición de ácido siálico. A partir de estos resultados iniciamos el estudio glicoproteómico de la proteína gp51, en primera instancia, a partir de partículas retrovirales purificadas de BLV y a su vez intentamos realizar la purificación de la gp51 nativa presente en el sobrenadante de las líneas celulares productoras de partículas. La purificación se logró pero la cantidad de proteína obtenida era muy baja para los ensayos glicoproteómicos. Una vez optimizada la expresión y purificación del ectodominio de la proteína Env soluble y en alta concentración decidimos continuar analizando el componente glicoproteómico de esta proteína para poder compararlo con los resultados obtenidos con la proteína nativa. Nuestros resultados fueron consistentes con el hecho de que las proteínas recombinantes expresadas en mamíferos generalmente contienen glicanos simples. Uno de los aspectos a considerar es el hecho de que la glicosilación en insectos difiere mucho de la presente en mamíferos. Sin embargo si bien el tipo de glicanos presente en *Drosophila* es diferente (glicanos menos complejos con estructuras oligomanosídicas y sin presentar sialilación) los sitios de N- u O-glicosilación no varían. Es decir la secuencia que reconoce la maquinaria de glicosilación es la misma aunque la ocupación de los sitios puede ser diferencial. Esto contrariamente a lo esperado presentó 3 ventajas: 1- por un lado fue posible confirmar por primera vez y de forma analítica los 9 sitios potenciales de N-glicosilación (7 en gp51 y 2 en gp30) en la proteína recombinante y extrapolable a la proteína nativa (**figura 6. 28**). 2- el abordaje experimental utilizado involucró espectrometría de masa de la proteína Env recombinante glicosilada y deglicosilada comparando las masas obtenidas con la masa teórica. El hecho de que la glicosilación en *Drosophila* genere glicanos menos complejos (menor tamaño) permitió en muchos casos establecer exactamente cuál era la m/z del péptido glicosilado. 3- finalmente el menor grado de glicosilación presente en la proteína recombinante será de gran ayuda en los ensayos de cristalización que se pretenden confirmar como perspectiva de la caracterización estructural de la proteína recombinante.

Asimismo se realizó por primera vez la caracterización de los N-glicanos presentes en la proteína Env del BLV (tanto recombinante como nativa) mediante deglicosilación, purificación de N-glicanos y posterior análisis de N-glicanos por HPLC y confirmación por espectrometría de masa y exoglicosidasas

(esto último sólo confirmado para la proteína recombinante). La comparación inicial de ambos perfiles revela que el grado y el tipo de glicanos presentes en ambas proteínas es diferente, mientras que la proteína nativa posee glicanos complejos con gran presencia de ácido siálico, la proteína Env recombinante sólo presenta estructuras oligomanosídicas, con residuos de fucosa. Estos resultados también han sido confirmados por ensayos con lectinas. De todos modos esta proteína recombinante ha sido empleada con éxito en ensayos de ELISA con sueros bovinos infectados con BLV y en la inmunización de ratones para evaluación de respuesta inmune humoral y celular.

Se analizaron mediante MS y MS/MS péptidos glicosilados y deglicosilados (con PNGase F) de la proteína srEnv-BLVmut digerida con tripsina. El análisis de los péptidos glicosilados permitió establecer el tipo de N-glicanos presentes. Sólo se empleó la proteína glicosilada y deglicosilada y la asignación de sitios de N-glicosilación se realizó comparando la diferencia en el m/z luego del tratamiento con la PNGase F. Esto fue posible debido a que la proteína recombinante (expresada en *Drosophila*) presenta una menor complejidad en la estructura N-glicánica permitiendo observar muchos péptidos con los glúcidos incorporados. Esta es la primera vez que se determina la estructura N-glicánica en la proteína Env de BLV (recombinante y nativa) y a su vez esta información es escasa en retrovirus. La información acerca de los glúcidos presentes es fundamental tanto para el abordaje estructural como también para el potencial uso como inmunógeno y antígeno. Son 9 los sitios potenciales de N-glicosilación en la srEnv-BLVmut y posiblemente los mismos sitios estén presentes en la proteína nativa aunque la ocupancia de los mismos debería confirmarse de forma experimental (**figura 6.28**).

Env-BLV nativa



srEnv-BLVmut

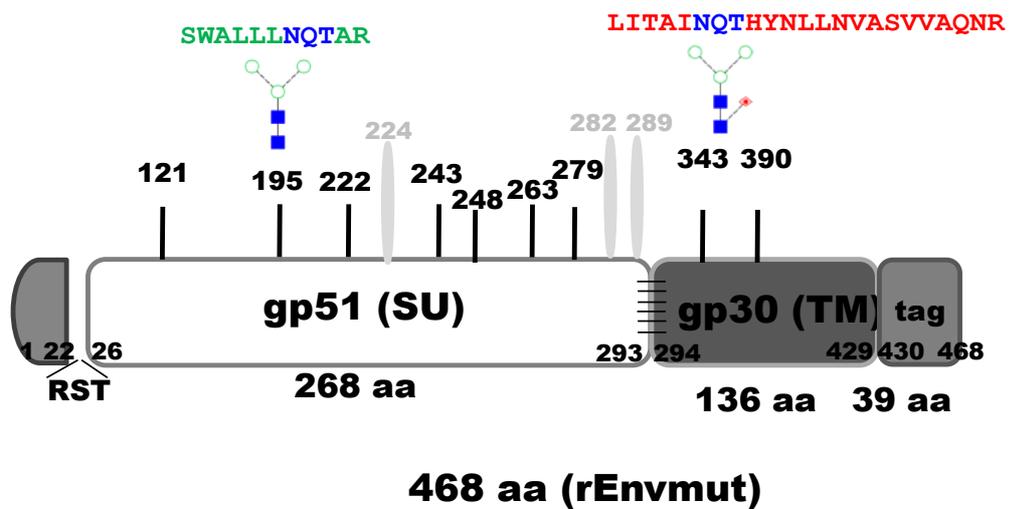


Figura 6.28: Modelo de N-glicosilación de las proteínas Env-BLV nativa (arriba) y recombinante (abajo). En negro se señalan los sitios de N-glicosilación y en gris los sitios potenciales de O-glicosilación. Se ilustran posibles estructuras N-glicánicas para la Env-BLV nativa pero no pueden asignarse. Para la proteína recombinante sin embargo es posible asignar N-glicanos al menos a dos residuos N en las posiciones N195 y N343 y se muestra la secuencia completa de ambos péptidos glicosilados. Se señalan también el péptido señal (en gris), gp51 (en blanco), gp30 nativa y ectodominio (en gris oscuro) y el strep tag. Las líneas negras horizontales en la proteína recombinante entre gp51 y gp30 representan la mutación en el sitio de furina dado que las subunidades permanecen unidas por este motivo.

6.6) PERSPECTIVAS

- En primer lugar es importante realizar el ensayo con lectinas utilizando la proteína deglicosilada con el fin de evaluar si se pierden o no los carbohidratos correspondientes.
- El análisis de N-glicanos debe completarse y para ello es necesario realizar una deglicosilación con otras glicosidasas, ej PNGase A dado que permite liberar la totalidad de N-glicanos presentes en la proteína a diferencia de la PNGaseF (que no corta en residuos de fucosa α 1,3 unidos al GlcNAc terminal). Complementariamente podría realizarse digestión enzimática utilizando endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (Endo H) dado que permite evaluar la ocupancia de glicanos ricos en manosa y a la vez permite definir los sitios de N-glicosilación dado que corta entre los dos residuos de GlcNAc del core dejando la asparagina “decorada” con un GlcNAc (con un $\Delta m/z=203$ Da comparado con la masa de la N).
- A su vez debemos expandir el panel de lectinas para finalizar la comparación de la reactividad diferencial entre la Env recombinante y la Env nativa. Lo ideal sería purificar Env nativa a partir de partículas virales provenientes de BL3.1.
- Finalmente se debería analizar el componente O-glicánico de las proteínas Env recombinantes y otras posibles modificaciones que aún no hemos podido elucidar, por ej si la proteína posee sulfatación.
- Es importante destacar que es de suma importancia confirmar los datos de N-glicanos presentes en la proteína Env nativa (para comenzar con las de FLK-BLV por MALDI y exoglicosidasas), en lo posible purificada a partir de BL3.1 o linfocitos B con el fin de establecer con certeza la composición de los glicanos, ver las diferencias que presenta con los de la proteína recombinante. Dado que esta asignación para la Env-BLV nativa fue preliminar y es necesario saber si su composición es de este tipo con alto contenido en ácido siálico (similar a la HA de influenza) o con alto contenido en residuos de manosa como la gp120 de HIV. Los resultados de la composición de N-glicanos obtenido para la proteína srEnv-BLVmut sugiere que los N-glicanos contienen patrones de glicosilación paucimanosídicos (2-3 Man) incluyendo unión de fucosa y estructuras oligomanosídicas. Estos resultados concuerdan con lo reportado para proteínas expresadas en S2 ej eritropoyetina humana (kim 2005 biotech and bioengin)

7) Conclusiones por Objetivo Específico

1. Análisis del proteoma de la partícula viral

Uno de nuestros objetivos era analizar el proteoma de la partícula viral de BLV a través de la identificación y caracterización detallada del conjunto de proteínas presentes en los viriones. La presunción era que dentro del conjunto de proteínas habría moléculas codificadas por el genoma viral con las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales incorporadas por la célula infectada, y también diferentes proteínas codificadas por el genoma de la célula infectada.

Este primer objetivo específico era de carácter descriptivo y fue concebido de forma tal que permitiera en base a los resultados obtenidos generar nuevas hipótesis sobre la biología de la interacción virus-célula. Nuestro interés estuvo centrado en primer lugar en poder identificar todas las proteínas estructurales de BLV, a su vez establecer el tipo de modificación postraduccionales presente en las proteínas que lo tuvieran y posteriormente establecer si alguna de las proteínas reguladoras, en particular Tax (transactivador transcripcional que además posee gran potencial oncogénico), era incorporada a la partícula viral. Esta idea está basada en lo observado para HIV-1 donde se determinó que las partículas virales incorporan no sólo proteínas estructurales sino también proteínas reguladoras como Tat, Nef, Vif, etc⁵¹. Si bien esto no llegó a demostrarse dada la escasa cantidad de partículas virales purificadas este trabajo nos permitió optimizar el protocolo con el fin a futuro de aumentar la densidad de células en cultivos de FLK-BLV y a la vez emplear la línea celular de linfocitos B bovinos, BL3.1. Asimismo el trabajo preliminar con partículas virales permitió comenzar a delinear el estudio de modificaciones postraduccionales en las proteínas mayoritarias de BLV, en particular para la glicoproteína Env dado que la obtención de las partículas virales permitió realizar el estudio preliminar de glicanos presentes en esta proteína como se discute en el capítulo 6.

Finalmente y de forma preliminar se realizó una contribución al conocimiento existente acerca de la transmisión del BLV y su interrelación con la célula hospedera dado que iniciamos el estudio de la formación de ensamblajes virales extracelulares similares a biofilms bacterianos en BLV, estructuras que han sido reportadas en HTLV-1¹⁹⁸. Esta nueva forma de transmisión es un componente más que justifica la escasa presencia de partículas virales en estos virus sumado al hecho de la prolongada latencia que se establece durante la infección por BLV, por consiguiente la baja producción de partículas virales libres y la sinapsis virológica también descrita para HTLV-1^{20, 112}. En este caso el empleo de heparinasa para la obtención de partículas virales de BLV a partir de la línea celular BL3.1 sería fundamental para aumentar el rendimiento en la cantidad de partículas virales recuperadas.

2. Caracterizar a nivel bioquímico, biofísico y estructural la glicoproteína de superficie Env-BLV y analizar sus propiedades antigénicas e inmunogénicas.

El principal desafío de este objetivo específico era lograr la expresión y purificación de la proteína Env obteniendo proteína en cantidad suficiente y con un grado de pureza adecuado. Sin este hito logrado resultaba inviable realizar la caracterización planteada dadas las dificultades presentes en purificar esta proteína de células infectadas como se demostró en esta tesis. Cabe destacar que son escasas las glicoproteínas de fusión retrovirales expresadas con buen rendimiento descritas hasta el momento debido a la enorme dificultad que plantea la producción de este tipo de proteínas (típicamente inestables, oligoméricas, y altamente glicosiladas).

La expresión se logró con éxito para todas las construcciones ensayadas sin embargo los mejores resultados se obtuvieron con la construcción pT350 Env33-437mut debido a que la incorporación de la mutación en el sitio de furina estabilizó a la proteína srEnv-BLVmut en una conformación pre fusión-like permitiendo su correcta purificación. Si bien las 4 construcciones dieron lugar a la expresión de la proteína se continuó trabajando únicamente con aquellas construcciones wt y mut que abarcaran todo el ectodominio (aa 33-437). Por su parte la proteína wt srEnv-BLVwt si bien logró expresarse y purificarse con éxito, la estructura oligomérica obtenida a partir de la misma era inestable y formaba oligómeros de alto peso molecular que no correspondían a la forma trimérica de la proteína. Ello se debe a que esta proteína puede sufrir activación espontánea luego de su síntesis y expresión generando proteínas Env en estadio pre y post fusión siendo mayoritario este último. Al ser una activación inespecífica esto puede generar la presencia de puentes de disulfuro artefactuales (inter monómeros por ejemplo) que den origen a estas especies de alto peso molecular. De todos modos a partir de la proteína wt logró purificarse el monómero (aunque no fuera la especie mayoritaria) y se realizaron ensayos de cristalización aunque sin éxito de la misma. Debido a las características descritas anteriormente se decidió continuar trabajando con la proteína mutante para realizar la caracterización bioquímica (determinación del peso molecular), ensayos de estabilidad, estudios glicoproteómicos, y análisis de propiedades antigénicas e inmunogénicas dado que se trataba de una proteína más estable. Se determinó que el ectodominio de la proteína Env posee un peso molecular de 63kDa (para la proteína monomérica) y su estructura oligomérica presenta al menos 3 estados: monómero, trímero y un oligómero de mayor peso molecular. Estos estados estarían en equilibrio con un desplazamiento aparentemente direccionado hacia las especies de mayor peso molecular aunque esto queda por determinarse con exactitud. A su vez es importante el papel que cumple la cisteína reactiva (la cual promueve la isomerización del puente disulfuro durante la activación de la proteína) siendo importante el control sobre este proceso con el fin de estabilizar a la proteína dado que creemos que fomenta la aparición de puentes disulfuro artefactuales que dificultan el análisis y la estabilidad de la proteína para estudios estructurales si bien en la proteína srEnv-BLVmut su contribución no es de consideración. La purificación de las especies correspondientes a monómero y trímero de la proteína srEnv-BLVmut permitió realizar ensayos de cristalografía preliminar evidenciando la presencia de cristales amorfos y precipitación-desnaturalización de la proteína, de todos modos creemos que el PEG es el mejor precipitante para la misma y los cristales se podrían generar en torno a esta condición. Dado que es

necesario contar con la proteína lo más pura y estable posible es necesario contar con especies moleculares que no presenten heterogeneidad artefactual (ej los puentes disulfuro como consecuencia de la cisteína reactiva) salvo la intrínseca como el equilibrio entre las especies y la glicosilación. Con respecto a este último punto el hecho de trabajar con un sistema heterólogo que presenta una maquinaria de biosíntesis de glúcidos menos compleja disminuye la heterogeneidad de la proteína a este nivel siendo favorable para la obtención de cristales. Comprobamos que la proteína permanece estable al concentrarla y que a medida disminuye el pH ello favorece la formación de especies moleculares de menor peso molecular, por ej el trímero y monómero. Es importante tener esto en cuenta para ensayos posteriores de cristalogénesis. Asimismo creemos que la contribución de la fuerza iónica a la conformación de la proteína es de gran importancia, creemos que ello se debe a la participación que tienen los iones cloruro por ej en el correcto funcionamiento de la proteína. Se requiere una mayor cantidad de ensayos para determinar este punto.

Se confirmaron las propiedades inmunogénicas de la proteína srEnv-BLVmut mediante la inmunización de ratones balb-c si bien los estudios de respuesta inmune quedan fuera de los objetivos de la tesis la obtención de suero hiperinmune nos permitió contar con un reactivo de laboratorio que permite la identificación de gp30 contando con un nuevo insumo para la detección de Env.

Finalmente se comprobaron las características antigénicas de la proteína srEnv-BLVmut permitiendo su empleo como reactivo diagnóstico resultados que ya han sido confirmados con alta sensibilidad y especificidad generando un insumo de gran valor en un país donde la incidencia de la leucosis bovina enzootica es tan elevada.

3. Caracterizar el componente glucídico de la proteína Env-BLV en su forma nativa y recombinante y determinar los sitios de N glicosilación.

Este objetivo específico fue concebido con el fin de establecer y confirmar los sitios de glicosilación en la proteína Env-BLV. Los resultados para la purificación de la proteína nativa indicaban que la cantidad de proteína purificada era muy baja, demasiado para este tipo de estudio. Sin embargo el contar con la proteína recombinante generada en *Drosophila* presentaba al menos inicialmente una situación contradictoria de cara al abordaje glicoproteómico. Por un lado se trataba de una proteína recombinante cuyo sistema de expresión no era el mismo que el de la célula hospedera con una maquinaria presente en células de insecto que daban lugar a glicanos simples. Ello constituía una desventaja a la hora de la caracterización de glicanos pero por otro lado el poseer glicanos simples permitía definir con mayor precisión cuales eran los verdaderos sitios de N-glicosilación, al menos para la proteína recombinante. Asimismo conocer en la proteína recombinante los sitios ocupados por glicanos y el tipo de constitución que presentan los mismos es un aporte fundamental en la elucidación de la estructura en este tipo de glicoproteínas virales. Este es el primer trabajo analítico realizado en una glicoproteína de fusión viral perteneciente a deltaretrovirus. Con respecto a la proteína nativa creemos que los sitios de N glicosilación determinados en la proteína recombinante se mantendrán para la

proteína nativa aunque la ocupancia de los sitios puede variar ampliamente. Afortunadamente logramos realizar al menos a nivel preliminar una primera caracterización del componente glicanico en la proteína Env nativa obtenida a partir de particulas virales confirmando la presencia de ácido siálico en la misma.

La O-glicosilación también estaría presente en la proteína Env de BLV, si bien no esta confirmada sin embargo creemos que esta contribución es mas importante en la proteina recombinante.

Asimismo determinamos la importancia de los glicanos en el reconocimiento de los sueros bovinos apoyando nuestra hipotesis inicial de que es altamente probable que esta proteína presente determinantes antigénicos constituidos únicamente por glicanos.

8) Conclusiones Finales

Este trabajo de tesis se enmarca en dos de los ejes centrales de nuestro laboratorio: el desarrollo de vacunas e inmunoterapéuticos contra BLV y el estudio de la interacción BLV-hospedero, con particular foco en la proteína de fusión Env. Env es un candidato ideal para el desarrollo de vacunas antirretrovirales debido a su papel esencial en la infección de la célula hospedero.

Si bien la proteína Env de retrovirus son inmunogénicas también poseen la capacidad de modular la respuesta inmune mediante inmunosupresión e inducción de anticuerpos irrelevantes (no neutralizantes).

Los resultados obtenidos como resultado de la tesis resultaron de gran interés a varios niveles. Por un lado el análisis proteómico permitió establecer un protocolo de obtención de partículas virales que puede ser utilizado a mayor escala o empleando otra línea celular persistentemente infectada con BLV. A su vez permitió comenzar el estudio de modificaciones postraduccionales en la proteína Env y avanzar en el conocimiento acerca de la transmisión de este virus mediante biofilms como alternativa a la producción de partículas virales libres.

Por su parte el excelente rendimiento en la expresión y purificación de la proteína recombinante, en particular la mutante para el sitio de furina, permitió avanzar en la caracterización bioquímica y biofísica de cara a la elucidación de la estructura. Si bien en este trabajo no logramos la elucidación de la estructura de lograrla sería la primera proteína de oncorretrovirus en ser elucidada. Cabe destacar que dada la gran similitud estructural y funcional de las proteínas Env retrovirales los resultados obtenidos en el modelo BLV serán de gran interés y extrapolables para retrovirus en general, en particular con deltarretrovirus con impacto en salud humana como HTLV (si bien se conoce la estructura de Env de HIV).

Como se menciona anteriormente la producción de este tipo de glicoproteínas de fusión virales representa un desafío en sí mismo debido a las características de estas proteínas como la elevada glicosilación, su estructura oligomérica y su inestabilidad intrínseca. Parte de estas dificultades fueron superadas y asimismo los resultados de la tesis permiten proyectar a futuro modificar o generar mutantes que eliminen la inestabilidad y formen oligómeros de forma correcta.

Con respecto a este punto si bien es necesario modificar la construcción de cara a optimizar la cristalización esta proteína no tendría mayor modificación (en términos de mutaciones para volverla cristizable por ej) ya que consideramos que es posible que los nuevos mutantes generados (ver perspectivas cap 5) que “fijen” el puente disulfuro intramonómero permitan la correcta oligomerización y estabilización de la proteína que permita la generación de cristales. En este caso el puente disulfuro no sería artefactual como en HIV (dado que en este virus gp120 y gp41 permanecen unidos por interacción

no covalente) dado que en alfa, gama y deltaretrovirus las subunidades SU y TM permanecen unidas por puentes disulfuro.

A su vez los buenos resultados obtenidos a partir del ELISA con sueros bovinos seropositivos para BLV empleando como antígeno la proteína Env-BLV recombinante⁴ permitió comenzar a implementar el uso de esta proteína en el desarrollo de un kit diagnóstico.

Desde el punto de vista inmunológico, se logro generar una proteína recombinante inmunogenica aunque se requieren estudios de generación de anticuerpos neutralizantes y respuesta de células T. De todos modos si bien uno de los componentes inmunosupresores/inmunomodulares como es el componente glicanico presenta diferencias entre las proteínas recombinantes y nativas.

Por otro lado, la comprensión de los mecanismos que subyacen la actividad de los glicanos de Env, abren la oportunidad hacia la generación de potenciales herramientas con capacidad de modular a la baja la respuesta inmune, lo cual tiene interés del punto de vista del desarrollo de inmunoterapias.

Este conocimiento permitirá generar un producto de alto valor inmunogénico y esperamos que la información generada permita modular o eliminar aquellos sitios glucídicos que favorezcan una respuesta humoral ineficaz o fomentar el mantenimiento de aquellos contra los cuales se generen anticuerpos neutralizantes. Esto daría lugar a la posibilidad de inducir un mejor reconocimiento por parte del sistema inmune. Por otra parte, cabe destacar además que el conocimiento generado a partir de este trabajo de tesis está en línea con un objetivo a largo plazo de nuestro grupo que es la generación de virus BLV recombinantes (modificadas racionalmente) con mayor potencial inmunogénico en ensayos de campo pudiendo extrapolarse a retrovirus de impacto en salud humana.

9) Referencias

1. Acaite J, Tamosiunas V, Lukauskas K, Milius J, Pieskus J (2007) The eradication experience of enzootic bovine leukosis from Lithuania. *Prev Vet Med* 82: 83-89
2. Adam E, Kerkhofs P, Mammerickx M, Kettmann R, Burny A, Droogmans L, Willems L (1994) Involvement of the cyclic AMP-responsive element binding protein in bovine leukemia virus expression in vivo. *J Virol* 68: 5845-5853
3. Adam E, Kerkhofs P, Mammerickx M, Burny A, Kettmann R, Willems L (1996) The CREB, ATF-1, and ATF-2 transcription factors from bovine leukemia virus-infected B lymphocytes activate viral expression. *J Virol* 70: 1990-1999
4. Addiego A (2014)
5. Aida Y, Murakami H, Takahashi M, Takeshima SN (2013) Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol* 4: 328
6. Albertini A, Bressanelli S, Lepault J, Gaudin Y Structure and working of viral fusion machinery. *Curr Top Membr* 68: 49-80
7. Alexandersen S, Carpenter S, Christensen J, Storgaard T, Viuff B, Wannemuehler Y, Belousov J, Roth JA (1993) Identification of alternatively spliced mRNAs encoding potential new regulatory proteins in cattle infected with bovine leukemia virus. *J Virol* 67: 39-52
8. Alfonso R, Almansa JE, Barrera JC (1998) [Serological prevalence and evaluation of the risk factors of bovine enzootic leukosis in the Bogota savannah and the Ubate and Chiquinquirá Valleys, Colombia]. *Rev Sci Tech* 17: 723-732
9. Almo SC, Love JD Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production. *Curr Opin Struct Biol* 26C: 39-43
10. Amon S, Zamfir AD, Rizzi A (2008) Glycosylation analysis of glycoproteins and proteoglycans using capillary electrophoresis-mass spectrometry strategies. *Electrophoresis* 29: 2485-2507
11. Anumula KR (2006) Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates. *Anal Biochem* 350: 1-23
12. Aoki K, Perlman M, Lim JM, Cantu R, Wells L, Tiemeyer M (2007) Dynamic developmental elaboration of N-linked glycan complexity in the *Drosophila melanogaster* embryo. *J Biol Chem* 282: 9127-9142
13. Aoki K, Porterfield M, Lee SS, Dong B, Nguyen K, McGlamry KH, Tiemeyer M (2008) The diversity of O-linked glycans expressed during *Drosophila melanogaster* development reflects stage- and tissue-specific requirements for cell signaling. *J Biol Chem* 283: 30385-30400
14. Aydin H, Cook JD, Lee JE Crystal structures of beta- and gammaretrovirus fusion proteins reveal a role for electrostatic stapling in viral entry. *J Virol* 88: 143-153
15. Backovic M, Johansson DX, Klupp BG, Mettenleiter TC, Persson MA, Rey FA (2010) Efficient method for production of high yields of Fab fragments in *Drosophila* S2 cells. *Protein Eng Des Sel* 23: 169-174
16. Ban J, Czene S, Altaner C, Callebaut I, Krchnak V, Merza M, Burny A, Kettmann R, Portetelle D (1992) Mapping of sequential epitopes recognized by monoclonal antibodies on the bovine leukaemia virus external glycoproteins expressed in *Escherichia coli* by means of antipeptide antibodies. *J Gen Virol* 73 (Pt 9): 2457-2461
17. Ban J, Truong AT, Horion B, Altaner C, Burny A, Portetelle D, Kettmann R (1994) Isolation of the missing 5'-end of the encoding region of the bovine leukemia virus cell receptor gene. *Arch Virol* 138: 379-383
18. Barbas CF, 3rd, Bjorling E, Chiodi F, Dunlop N, Cababa D, Jones TM, Zebedee SL, Persson MA, Nara PL, Norrby E, et al. (1992) Recombinant human Fab fragments neutralize human type 1 immunodeficiency virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 9339-9343
19. Barbas CF, 3rd, Collet TA, Amberg W, Roben P, Binley JM, Hoekstra D, Cababa D, Jones TM, Williamson RA, Pilkington GR, et al. (1993) Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. *J Mol Biol* 230: 812-823
20. Barnard AL, Igakura T, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR (2005) Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood* 106: 988-995
21. Barnard RJ, Young JA (2003) Alpharetrovirus envelope-receptor interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* 281: 107-136
22. Barrabes S, Sarrats A, Fort E, De Llorens R, Rudd PM, Peracaula R Effect of sialic acid content on glycoprotein pI analyzed by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 31: 2903-2912
23. Beaufils P, Choquet D, Mamoun RZ, Malissen B (1993) The (YXXL/I)2 signalling motif found in the cytoplasmic segments of the bovine leukaemia virus envelope protein and Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A can elicit early and late lymphocyte activation events. *EMBO J* 12: 5105-5112
24. Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, Goulding PN, Charles SM, Parekh RB (1995) Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal Biochem* 230: 229-238
25. Bonsignori M, Montefiori DC, Wu X, Chen X, Hwang KK, Tsao CY, Kozink DM, Parks RJ, Tomaras GD, Crump JA, Kapiga SH, Sam NE, Kwong PD, Kepler TB, Liao HX, Mascola JR, Haynes BF (2012) Two distinct broadly neutralizing antibody specificities of different clonal lineages in a single HIV-1-infected donor: implications for vaccine design. *J Virol* 86: 4688-4692

26. Bouzar AB, de Brogniez A, Florins A, François C, Boxus M, Willems L (2011) Role of glycosylation in bovine leukemia virus infection. *Retrovirology* 8: A29
27. Breloy I, Schwientek T, Lehr S, Hanisch FG (2008) Glucuronic acid can extend O-linked core 1 glycans, but it contributes only weakly to the negative surface charge of *Drosophila melanogaster* Schneider-2 cells. *FEBS Lett* 582: 1593-1598
28. Brenner J, Van-Haam M, Savir D, Trainin Z (1989) The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a dairy cow. *Vet Immunol Immunopathol* 22: 299-305
29. Brenner J, Rosenthal I, Bernstein S, Trainin Z (1990) The fat content of milk from dairy cattle infected with bovine leukosis virus. *Vet Res Commun* 14: 167-171
30. Briggs JA, Krausslich HG The molecular architecture of HIV. *J Mol Biol* 410: 491-500
31. Briggs JA, Simon MN, Gross I, Krausslich HG, Fuller SD, Vogt VM, Johnson MC (2004) The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol* 11: 672-675
32. Bruck C, Mathot S, Portetelle D, Berte C, Franssen JD, Herion P, Burny A (1982) Monoclonal antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51. *Virology* 122: 342-352
33. Buchacher A, Predl R, Strutzenberger K, Steinfeldner W, Trkola A, Purtscher M, Gruber G, Tauer C, Steindl F, Jungbauer A, et al. (1994) Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 359-369
34. Buehring GC, Shen HM, Jensen HM, Choi KY, Sun D, Nuovo G Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. *Emerg Infect Dis* 20: 772-782
35. Buehring GC, Philpott SM, Choi KY (2003) Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19: 1105-1113
36. Buge SL, Murty L, Arora K, Kalyanaraman VS, Markham PD, Richardson ES, Aldrich K, Patterson LJ, Miller CJ, Cheng SM, Robert-Guroff M (1999) Factors associated with slow disease progression in macaques immunized with an adenovirus-simian immunodeficiency virus (SIV) envelope priming-gp120 boosting regimen and challenged vaginally with SIVmac251. *J Virol* 73: 7430-7440
37. Burmeister T, Schwartz S, Hummel M, Hoelzer D, Thiel E (2007) No genetic evidence for involvement of Deltaretroviruses in adult patients with precursor and mature T-cell neoplasms. *Retrovirology* 4: 11
38. Burny A, Bex F, Bruck C, Cleuter Y, Dekegel D, Ghysdael J, Kettmann R, Leclercq M, Mammerickx M, Portetelle D (1979) Biochemical and epidemiological studies on bovine leukemia virus (BLV). *Haematol Blood Transfus* 23: 445-452
39. Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, van den Broeke A, Willems L, Thomas R (1988) Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Vet Microbiol* 17: 197-218
40. Calarese DA, Scanlan CN, Zwick MB, Deechongkit S, Mimura Y, Kunert R, Zhu P, Wormald MR, Stanfield RL, Roux KH, Kelly JW, Rudd PM, Dwek RA, Katinger H, Burton DR, Wilson IA (2003) Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* 300: 2065-2071
41. Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Afonso P, Froment A, Gessain A, Mahieux R (2006) Human T-cell lymphotropic virus type 3: complete nucleotide sequence and characterization of the human tax3 protein. *J Virol* 80: 9876-9888
42. Callebaut I, Voneche V, Mager A, Fumiere O, Krchnak V, Merza M, Zavada J, Mammerickx M, Burny A, Portetelle D (1993) Mapping of B-neutralizing and T-helper cell epitopes on the bovine leukemia virus external glycoprotein gp51. *J Virol* 67: 5321-5327
43. Callebaut I, Mornon JP, Burny A, Portetelle D (1994) The bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51 as a general model for the design of a subunit vaccine against retroviral infection: mapping of functional sites through immunological and structural data. *Leukemia* 8 Suppl 1: S218-221
44. Campbell MP, Royle L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM (2008) GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. *Bioinformatics* 24: 1214-1216
45. Cantor GH, Pritchard SM, Dequiedt F, Willems L, Kettmann R, Davis WC (2001) CD5 is dissociated from the B-cell receptor in B cells from bovine leukemia virus-infected, persistently lymphocytotic cattle: consequences to B-cell receptor-mediated apoptosis. *J Virol* 75: 1689-1696
46. Chatel-Chaix L, Boulay K, Mouland AJ, Desgroseillers L (2008) The host protein Stauf1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology* 5: 41
47. Chaudhary S, Pak JE, Gruswitz F, Sharma V, Stroud RM Overexpressing human membrane proteins in stably transfected and clonal human embryonic kidney 293S cells. *Nat Protoc* 7: 453-466
48. Checkley MA, Luttge BG, Freed EO HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol* 410: 582-608
49. Checkley MA, Luttge BG, Mercredi PY, Kyere SK, Donlan J, Murakami T, Summers MF, Cocklin S, Freed EO Reevaluation of the requirement for TIP47 in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein incorporation. *J Virol* 87: 3561-3570
50. Chen EH, Grote E, Mohler W, Vignery A (2007) Cell-cell fusion. *FEBS Lett* 581: 2181-2193
51. Chertova E, Chertov O, Coren LV, Roser JD, Trubey CM, Bess JW, Jr., Sowder RC, 2nd, Barsov E, Hood BL, Fisher RJ, Nagashima K, Conrads TP, Veenstra TD, Lifson JD, Ott DE (2006) Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J Virol* 80: 9039-9052
52. Ciminale V, Pavlakakis GN, Derse D, Cunningham CP, Felber BK (1992) Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel mRNAs and proteins produced by HTLV type I. *J Virol* 66: 1737-1745

-
53. Colgrave ML, Snelling HJ, Shiell BJ, Feng YR, Chan YP, Bossart KN, Xu K, Nikolov DB, Broder CC, Michalski WP (2011) Site occupancy and glycan compositional analysis of two soluble recombinant forms of the attachment glycoprotein of Hendra virus. *Glycobiology* 22: 572-584
 54. Cudney R, Patel S, Weisgraber K, Newhouse Y, McPherson A (1994) Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50: 414-423
 55. D'Angelino JL, Garcia M, Birgel EH (1998) Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil. *Trop Anim Health Prod* 30: 13-15
 56. de Brogniez A, Bouzar AB, Jacques J-R, Gillet N, Pritsch O, Tomé L, Reichert M, Willems L (2013) Hyper-replicative bovine leukemia virus by mutation of an envelope N-linked glycosylation site. *Retrovirology* 11: P141
 57. De Giuseppe A, Feliziani F, Rutili D, De Mia GM (2004) Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 147-151
 58. de Vries RP, de Vries E, Bosch BJ, de Groot RJ, Rottier PJ, de Haan CA (2010) The influenza A virus hemagglutinin glycosylation state affects receptor-binding specificity. *Virology* 403: 17-25
 59. Derse D, Casey JW (1986) Two elements in the bovine leukemia virus long terminal repeat that regulate gene expression. *Science* 231: 1437-1440
 60. Derse D (1987) Bovine leukemia virus transcription is controlled by a virus-encoded trans-acting factor and by cis-acting response elements. *J Virol* 61: 2462-2471
 61. Derse D (1988) trans-acting regulation of bovine leukemia virus mRNA processing. *J Virol* 62: 1115-1119
 62. Deshpande KL, Fried VA, Ando M, Webster RG (1987) Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 36-40
 63. Diskin R, Scheid JF, Marcovecchio PM, West AP, Jr., Klein F, Gao H, Gnanapragasam PN, Abadir A, Seaman MS, Nussenzweig MC, Bjorkman PJ (2011) Increasing the potency and breadth of an HIV antibody by using structure-based rational design. *Science* 334: 1289-1293
 64. Dochi T, Nakano T, Inoue M, Takamune N, Shoji S, Sano K, Misumi S Phosphorylation of human immunodeficiency virus type 1 capsid protein at serine 16, required for peptidyl-prolyl isomerase-dependent uncoating, is mediated by virion-incorporated extracellular signal-regulated kinase 2. *J Gen Virol* 95: 1156-1166
 65. Domon B, Costello C (1988) A Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in FAB-MS/MS Spectra of Glycoconjugates *Glycoconj J* 5: 397-409
 66. Dooper JE, Schneider BL, Reed JC, Lingappa JR (2007) Host ABCE1 is at plasma membrane HIV assembly sites and its dissociation from Gag is linked to subsequent events of virus production. *Traffic* 8: 195-211
 67. Doores KJ, Fulton Z, Hong V, Patel MK, Scanlan CN, Wormald MR, Finn MG, Burton DR, Wilson IA, Davis BG (2010) A nonself sugar mimic of the HIV glycan shield shows enhanced antigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 17107-17112
 68. Doores KJ, Fulton Z, Huber M, Wilson IA, Burton DR (2010) Antibody 2G12 recognizes di-mannose equivalently in domain- and nondomain-exchanged forms but only binds the HIV-1 glycan shield if domain exchanged. *J Virol* 84: 10690-10699
 69. Douris V, Swevers L, Labropoulou V, Andronopoulou E, Georgoussi Z, Iatrou K (2006) Stably transformed insect cell lines: tools for expression of secreted and membrane-anchored proteins and high-throughput screening platforms for drug and insecticide discovery. *Adv Virus Res* 68: 113-156
 70. Eckert DM, Kim PS (2001) Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* 70: 777-810
 71. Emanuelson U SK, Pettersson H. (1992) Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev Vet Med* 12: 121-131
 72. Fass D, Kim PS (1995) Dissection of a retrovirus envelope protein reveals structural similarity to influenza hemagglutinin. *Curr Biol* 5: 1377-1383
 73. Felber BK, Hadzopoulou-Cladaras M, Cladaras C, Copeland T, Pavlakis GN (1989) rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 1495-1499
 74. Ferrer JF, Piper CE (1978) An evaluation of the role of milk in the natural transmission of BLV. *Ann Rech Vet* 9: 803-807
 75. Ferrer JF, Piper CE (1981) Role of colostrum and milk in the natural transmission of the bovine leukemia virus. *Cancer Res* 41: 4906-4909
 76. Florins A, Gillet N, Asquith B, Boxus M, Burteau C, Twizere JC, Urbain P, Vandermeers F, Debacq C, Sanchez-Alcaraz MT, Schwartz-Cornil I, Kerkhofs P, Jean G, Thewis A, Hay J, Mortreux F, Wattel E, Reichert M, Burny A, Kettmann R, Bangham C, Willems L (2007) Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Front Biosci* 12: 1520-1531
 77. Florins A, Gillet N, Boxus M, Kerkhofs P, Kettmann R, Willems L (2007) Even attenuated bovine leukemia virus proviruses can be pathogenic in sheep. *J Virol* 81: 10195-10200
 78. Forschner E, Bunger I, Krause HP (1988) [Surveillance investigations of brucellosis-, leukosis- and BHV-free cattle herds. ELISA-based bulk milk studies compared to single animal sample studies with traditional test systems. Safety and cost]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 95: 214-218
 79. Forti K, Rizzo G, Cagiola M, Ferrante G, Marini C, Feliziani F, Pezzotti G, De Giuseppe A (2014) Identification of a novel overlapping sequential E epitope (E') on the bovine leukaemia virus SU glycoprotein and analysis of immunological data. *Vet Microbiol* 172: 157-167
 80. Franchini G, Fukumoto R, Fullen JR (2003) T-cell control by human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1. *Int J Hematol* 78: 280-296
 81. Franke EK, Yuan HE, Luban J (1994) Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372: 359-362
-

82. Freed EO (1997) Retroviruses. In: Encyclopedia of Cancer, pp: 167-172. .
83. Frost SD, Wrin T, Smith DM, Kosakovsky Pond SL, Liu Y, Paxinos E, Chappey C, Galovich J, Beauchaine J, Petropoulos CJ, Little SJ, Richman DD (2005) Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18514-18519
84. Gallaher WR, Ball JM, Garry RF, Martin-Amedee AM, Montelaro RC (1995) A general model for the surface glycoproteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 191-202
85. Gallo SA, Finnegan CM, Viard M, Raviv Y, Dimitrov A, Rawat SS, Puri A, Durell S, Blumenthal R (2003) The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* 1614: 36-50
86. Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI (2008) The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol* 18: 203-217
87. Gao X, Shen RX, Xiang WH, Zhou JH (2008) [Dimerization of retroviral RNA genomes]. *Bing Du Xue Bao* 24: 487-491
88. Gao Y, Mehta K (2007) N-linked glycosylation of CD38 is required for its structure stabilization but not for membrane localization. *Mol Cell Biochem* 295: 1-7
89. Gatot JS, Callebaut I, Mornon JP, Portetelle D, Burny A, Kerkhofs P, Kettmann R, Willems L (1998) Conservative mutations in the immunosuppressive region of the bovine leukemia virus transmembrane protein affect fusion but not infectivity in vivo. *J Biol Chem* 273: 12870-12880
90. Gatot JS, Callebaut I, Van Lint C, Demonte D, Kerkhofs P, Portetelle D, Burny A, Willems L, Kettmann R (2002) Bovine leukemia virus SU protein interacts with zinc, and mutations within two interacting regions differently affect viral fusion and infectivity in vivo. *J Virol* 76: 7956-7967
91. Geisler C, Jarvis DL (2012) Substrate specificities and intracellular distributions of three N-glycan processing enzymes functioning at a key branch point in the insect N-glycosylation pathway. *J Biol Chem* 287: 7084-7097
92. Geisler C, Kotu V, Sharrow M, Rendic D, Poltl G, Tiemeyer M, Wilson IB, Jarvis DL (2012) The *Drosophila* neurally altered carbohydrate mutant has a defective Golgi GDP-fucose transporter. *J Biol Chem* 287: 29599-29609
93. Ghysdael J, Kettmann R, Burny A (1979) Translation of bovine leukemia virus virion RNAs in heterologous protein-synthesizing systems. *J Virol* 29: 1087-1098
94. Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar AB, Defoiche J, Burny A, Reichert M, Kettmann R, Willems L (2007) Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* 4: 18
95. Gillet NA, Gutierrez G, Rodriguez SM, de Brogniez A, Renotte N, Alvarez I, Trono K, Willems L (2013) Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection. *PLoS Pathog* 9: e1003687
96. Gilliland GL, Tung M, Blakeslee DM, Ladner JE (1994) Biological Macromolecule Crystallization Database, Version 3.0: new features, data and the NASA archive for protein crystal growth data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50: 408-413
97. Gilmartin AA, Lamp B, Rumenapf T, Persson MA, Rey FA, Krey T (2011) High-level secretion of recombinant monomeric murine and human single-chain Fv antibodies from *Drosophila* S2 cells. *Protein Eng Des Sel* 25: 59-66
98. Giroud C, Chazal N, Briant L Cellular kinases incorporated into HIV-1 particles: passive or active passengers? *Retrovirology* 8: 71
99. Go EP, Hewawasam G, Liao HX, Chen H, Ping LH, Anderson JA, Hua DC, Haynes BF, Desaire H Characterization of glycosylation profiles of HIV-1 transmitted/founder envelopes by mass spectrometry. *J Virol* 85: 8270-8284
100. Go EP, Chang Q, Liao HX, Sutherland LL, Alam SM, Haynes BF, Desaire H (2009) Glycosylation site-specific analysis of clade C HIV-1 envelope proteins. *J Proteome Res* 8: 4231-4242
101. Grange MP, Blot V, Delamarre L, Bouchaert I, Rocca A, Dautry-Varsat A, Dokhelar MC (2000) Identification of two intracellular mechanisms leading to reduced expression of oncoretrovirus envelope glycoproteins at the cell surface. *J Virol* 74: 11734-11743
102. Grigsby IF, Zhang W, Johnson JL, Fogarty KH, Chen Y, Rawson JM, Crosby AJ, Mueller JD, Mansky LM (2010) Biophysical analysis of HTLV-1 particles reveals novel insights into particle morphology and Gag stoichiometry. *Retrovirology* 7: 75
103. Grove J, Marsh M The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J Cell Biol* 195: 1071-1082
104. Gutierrez G, Rodriguez SM, de Brogniez A, Gillet N, Golime R, Burny A, Jaworski JP, Alvarez I, Vagnoni L, Trono K, Willems L (2014) Vaccination against delta-retroviruses: the bovine leukemia virus paradigm. *Viruses* 6: 2416-2427
105. Hamilton VT, Stone DM, Pritchard SM, Cantor GH (2002) Bovine leukemia virus gp30 transmembrane (TM) protein is not tyrosine phosphorylated: examining potential interactions with host tyrosine-mediated signaling. *Virus Res* 90: 155-169
106. Harrison RL, Jarvis DL (2006) Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins. *Adv Virus Res* 68: 159-191
107. Harrison SC (2008) Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15: 690-698
108. Hemonnot B, Molle D, Bardy M, Gay B, Laune D, Devaux C, Briant L (2006) Phosphorylation of the HTLV-1 matrix L-domain-containing protein by virus-associated ERK-2 kinase. *Virology* 349: 430-439
109. Hill RM, Brennan SO, Birch NP (2001) Expression, purification, and functional characterization of the serine protease inhibitor neuroserpin expressed in *Drosophila* S2 cells. *Protein Expr Purif* 22: 406-413
110. Hislop AD, Good MF, Mateo L, Gardner J, Gatei MH, Daniel RC, Meyers BV, Lavin MF, Suhrbier A (1998) Vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes protect against retroviral challenge. *Nat Med* 4: 1193-1196
111. Hopkins SG, DiGiacomo RF (1997) Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13: 107-128
112. Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Bangham CR (2003) Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 299: 1713-1716

-
113. Igonet S, Rey FA (2012) SnapShot: Viral and eukaryotic protein fusogens. *Cell* 151: 1634-1634 e1631
 114. Ikebuchi R, Konnai S, Okagawa T, Nishimori A, Nakahara A, Murata S, Ohashi K Differences in cellular function and viral protein expression between IgMhigh and IgMlow B-cells in bovine leukemia virus-infected cattle. *J Gen Virol* 95: 1832-1842
 115. Inabe K, Nishizawa M, Tajima S, Ikuta K, Aida Y (1999) The YXXL sequences of a transmembrane protein of bovine leukemia virus are required for viral entry and incorporation of viral envelope protein into virions. *J Virol* 73: 1293-1301
 116. Jancarik J, Kim S-H (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J Appl Cryst* 24: 409-411
 117. Johansen H, van der Straten A, Sweet R, Otto E, Maroni G, Rosenberg M (1989) Regulated expression at high copy number allows production of a growth-inhibitory oncogene product in *Drosophila Schneider* cells. *Genes Dev* 3: 882-889
 118. Johansson DX, Krey T, Andersson O (2012) Production of recombinant antibodies in *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Methods Mol Biol* 907: 359-370
 119. Johnston ER, Radke K (2000) The SU and TM envelope protein subunits of bovine leukemia virus are linked by disulfide bonds, both in cells and in virions. *J Virol* 74: 2930-2935
 120. Johnston ER, Albritton LM, Radke K (2002) Envelope proteins containing single amino acid substitutions support a structural model of the receptor-binding domain of bovine leukemia virus surface protein. *J Virol* 76: 10861-10872
 121. Juliarena MA, Poli M, Sala L, Ceriani C, Gutierrez S, Dolcini G, Rodriguez EM, Marino B, Rodriguez-Dubra C, Esteban EN (2008) Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Anim Genet* 39: 432-438
 122. Julien JP, Cupo A, Sok D, Stanfield RL, Lyumkis D, Deller MC, Klasse PJ, Burton DR, Sanders RW, Moore JP, Ward AB, Wilson IA (2013) Crystal structure of a soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 342: 1477-1483
 123. Julien JP, Lee JH, Cupo A, Murin CD, Derking R, Hoffenberg S, Caulfield MJ, King CR, Marozsan AJ, Klasse PJ, Sanders RW, Moore JP, Wilson IA, Ward AB (2013) Asymmetric recognition of the HIV-1 trimer by broadly neutralizing antibody PG9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 4351-4356
 124. Julien JP, Sok D, Khayat R, Lee JH, Doores KJ, Walker LM, Ramos A, Diwanji DC, Pejchal R, Cupo A, Katpally U, Depetris RS, Stanfield RL, McBride R, Marozsan AJ, Paulson JC, Sanders RW, Moore JP, Burton DR, Pognard P, Ward AB, Wilson IA (2013) Broadly neutralizing antibody PGT121 allosterically modulates CD4 binding via recognition of the HIV-1 gp120 V3 base and multiple surrounding glycans. *PLoS Pathog* 9: e1003342
 125. Kalkkinen N, Jornvall H, Soderlund H, Kaariainen L (1980) Analysis of Semliki-Forest-virus structural proteins to illustrate polyprotein processing of alpha viruses. *Eur J Biochem* 108: 31-37
 126. Kappes MA, Miller CL, Faaberg KS Highly divergent strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus incorporate multiple isoforms of nonstructural protein 2 into virions. *J Virol* 87: 13456-13465
 127. Katoh I, Yoshinaka Y, Ikawa Y (1989) Bovine leukemia virus trans-activator p38tax activates heterologous promoters with a common sequence known as a cAMP-responsive element or the binding site of a cellular transcription factor ATF. *EMBO J* 8: 497-503
 128. Katoh I, Yasunaga T, Yoshinaka Y (1993) Bovine leukemia virus RNA sequences involved in dimerization and specific gag protein binding: close relation to the packaging sites of avian, murine, and human retroviruses. *J Virol* 67: 1830-1839
 129. Khayat R, Lee JH, Julien JP, Cupo A, Klasse PJ, Sanders RW, Moore JP, Wilson IA, Ward AB (2013) Structural characterization of cleaved, soluble HIV-1 envelope glycoprotein trimers. *J Virol* 87: 9865-9872
 130. Kincaid RP, Burke JM, Sullivan CS RNA virus microRNA that mimics a B-cell oncomiR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3077-3082
 131. Kirkpatrick RB, Matico RE, McNulty DE, Strickler JE, Rosenberg M (1995) An abundantly secreted glycoprotein from *Drosophila melanogaster* is related to mammalian secretory proteins produced in rheumatoid tissues and by activated macrophages. *Gene* 153: 147-154
 132. Klasse PJ, Depetris RS, Pejchal R, Julien JP, Khayat R, Lee JH, Marozsan AJ, Cupo A, Cocco N, Korzun J, Yasmeen A, Ward AB, Wilson IA, Sanders RW, Moore JP (2013) Influences on trimerization and aggregation of soluble, cleaved HIV-1 SOSIP envelope glycoprotein. *J Virol* 87: 9873-9885
 133. Klenk HD, Wagner R, Heuer D, Wolff T (2002) Importance of hemagglutinin glycosylation for the biological functions of influenza virus. *Virus Res* 82: 73-75
 134. Kobe B, Center RJ, Kemp BE, Pombourios P (1999) Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4319-4324
 135. Kohara J, Konnai S, Onuma M (2006) Experimental transmission of Bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. *Jpn J Vet Res* 54: 25-30
 136. Koles K, Irvine KD, Panin VM (2004) Functional characterization of *Drosophila* sialyltransferase. *J Biol Chem* 279: 4346-4357
 137. Koles K, Lim JM, Aoki K, Porterfield M, Tiemeyer M, Wells L, Panin V (2007) Identification of N-glycosylated proteins from the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Glycobiology* 17: 1388-1403
 138. Kong L, Lee JH, Doores KJ, Murin CD, Julien JP, McBride R, Liu Y, Marozsan A, Cupo A, Klasse PJ, Hoffenberg S, Caulfield M, King CR, Hua Y, Le KM, Khayat R, Deller MC, Clayton T, Tien H, Feizi T, Sanders RW, Paulson JC, Moore JP, Stanfield RL, Burton DR, Ward AB, Wilson IA (2013) Supersite of immune vulnerability on the glycosylated face of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Nat Struct Mol Biol* 20: 796-803
 139. Korber B, Okayama A, Donnelly R, Tachibana N, Essex M (1991) Polymerase chain reaction analysis of defective human T-cell leukemia virus type I proviral genomes in leukemic cells of patients with adult T-cell leukemia. *J Virol* 65: 5471-5476
-

-
140. Kwon YD, Finzi A, Wu X, Dogo-Isonagie C, Lee LK, Moore LR, Schmidt SD, Stuckey J, Yang Y, Zhou T, Zhu J, Vivic DA, Debnath AK, Shapiro L, Bewley CA, Mascola JR, Sodroski JG, Kwong PD Unliganded HIV-1 gp120 core structures assume the CD4-bound conformation with regulation by quaternary interactions and variable loops. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 5663-5668
 141. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393: 648-659
 142. Lagarias DM, Radke K (1989) Transcriptional activation of bovine leukemia virus in blood cells from experimentally infected, asymptomatic sheep with latent infections. *J Virol* 63: 2099-2107
 143. Lamb D, Schuttelkopf AW, van Aalten DM, Brighty DW (2008) Highly specific inhibition of leukaemia virus membrane fusion by interaction of peptide antagonists with a conserved region of the coiled coil of envelope. *Retrovirology* 5: 70
 144. Lamb D, Schuttelkopf AW, van Aalten DM, Brighty DW (2011) Charge-surrounded pockets and electrostatic interactions with small ions modulate the activity of retroviral fusion proteins. *PLoS Pathog* 7: e1001268
 145. Land A, Braakman I (2001) Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Biochimie* 83: 783-790
 146. Lavanya M, Kinet S, Montel-Hagen A, Mongellaz C, Battini JL, Sitbon M, Taylor N (2008) Cell surface expression of the bovine leukemia virus-binding receptor on B and T lymphocytes is induced by receptor engagement. *J Immunol* 181: 891-898
 147. Lavine CL, Lao S, Montefiori DC, Haynes BF, Sodroski JG, Yang X (2011) High-mannose glycan-dependent epitopes are frequently targeted in broad neutralizing antibody responses during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 86: 2153-2164
 148. Leamson RN, Halpern MS (1976) Subunit structure of the glycoprotein complex of avian tumor virus. *J Virol* 18: 956-968
 149. Lee SK, Potempa M, Swanstrom R The choreography of HIV-1 proteolytic processing and virion assembly. *J Biol Chem* 287: 40867-40874
 150. Li K, Zhang S, Kronqvist M, Wallin M, Ekstrom M, Derse D, Garoff H (2008) Intersubunit disulfide isomerization controls membrane fusion of human T-cell leukemia virus Env. *J Virol* 82: 7135-7143
 151. Li L, Li HS, Pauza CD, Bukrinsky M, Zhao RY (2005) Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Res* 15: 923-934
 152. Li Y, Cleveland B, Klots I, Travis B, Richardson BA, Anderson D, Montefiori D, Polacino P, Hu SL (2008) Removal of a single N-linked glycan in human immunodeficiency virus type 1 gp120 results in an enhanced ability to induce neutralizing antibody responses. *J Virol* 82: 638-651
 153. Lin G, Simmons G, Pohlmann S, Baribaud F, Ni H, Leslie GJ, Haggarty BS, Bates P, Weissman D, Hoxie JA, Doms RW (2003) Differential N-linked glycosylation of human immunodeficiency virus and Ebola virus envelope glycoproteins modulates interactions with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 77: 1337-1346
 154. Lin SC, Jan JT, Dionne B, Butler M, Huang MH, Wu CY, Wong CH, Wu SC (2013) Different immunity elicited by recombinant H5N1 hemagglutinin proteins containing pauci-mannose, high-mannose, or complex type N-glycans. *PLoS One* 8: e66719
 155. Lingappa JR, Reed JC, Tanaka M, Chutiraka K, Robinson BA How HIV-1 Gag assembles in cells: Putting together pieces of the puzzle. *Virus Res*
 156. Lis H, Sharon N (1993) Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem* 218: 1-27
 157. Liu J, Bartesaghi A, Borgnia MJ, Sapiro G, Subramaniam S (2008) Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* 455: 109-113
 158. Llames L, Goyache J, Domenech A, Arjona A, Suarez G, Gomez-Lucia E (2001) Evaluation of virus excretion by cells persistently infected with the bovine leukaemia virus (BLV) using monoclonal antibodies. *J Clin Virol* 22: 31-39
 159. Llames L, Goyache J, Domenech A, Montana AV, Suarez G, Gomez-Lucia E (2001) Cellular distribution of bovine leukemia virus proteins gp51SU, Pr72(env), and Pr66(gag-pro) in persistently infected cells. *Virus Res* 79: 47-57
 160. Lyumkis D, Julien JP, de Val N, Cupo A, Potter CS, Klasse PJ, Burton DR, Sanders RW, Moore JP, Carragher B, Wilson IA, Ward AB (2013) Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 342: 1484-1490
 161. Ma BJ, Alam SM, Go EP, Lu X, Desaire H, Tomaras GD, Bowman C, Sutherland LL, Searce RM, Santra S, Letvin NL, Kepler TB, Liao HX, Haynes BF (2011) Envelope deglycosylation enhances antigenicity of HIV-1 gp41 epitopes for both broad neutralizing antibodies and their unmutated ancestor antibodies. *PLoS Pathog* 7: e1002200
 162. Maerz AL, Center RJ, Kemp BE, Kobe B, Pombourios P (2000) Functional implications of the human T-lymphotropic virus type 1 transmembrane glycoprotein helical hairpin structure. *J Virol* 74: 6614-6621
 163. Mammereckx M, Portetelle D, de Clercq K, Burny A (1987) Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leuk Res* 11: 353-358
 164. Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL (2003) The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* 115: 449-459
 165. Marin C, de Lopez NM, Alvarez L, Lozano O, Espana W, Castanos H, Leon A (1978) Epidemiology of bovine leukemia in Venezuela. *Ann Rech Vet* 9: 743-746
 166. Mateo L, Gardner J, Suhrbier A (2001) Delayed emergence of bovine leukemia virus after vaccination with a protective cytotoxic T cell-based vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17: 1447-1453
 167. Matsuoka M, Jeang KT (2007) Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer* 7: 270-280
 168. Mauko L (2011) Glycosylation analysis of therapeutic monoclonal antibodies. University of Tasmania
 169. Maxwell KL, Frappier L (2007) Viral proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 398-411
-

170. McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Lieberman M, Kosek JC, Reyes GR, Weissman IL (1988) Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 53: 55-67
171. McLellan JS, Pancera M, Carrico C, Gorman J, Julien JP, Khayat R, Loudar R, Pejchal R, Sastry M, Dai K, O'Dell S, Patel N, Shahzad-ul-Hussan S, Yang Y, Zhang B, Zhou T, Zhu J, Boyington JC, Chuang GY, Diwanji D, Georgiev I, Kwon YD, Lee D, Louder MK, Moquin S, Schmidt SD, Yang ZY, Bonsignori M, Crump JA, Kapiga SH, Sam NE, Haynes BF, Burton DR, Koff WC, Walker LM, Phogat S, Wyatt R, Orwenyo J, Wang LX, Arthos J, Bewley CA, Mascola JR, Nabel GJ, Schief WR, Ward AB, Wilson IA, Kwong PD Structure of HIV-1 gp120 V1/V2 domain with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature* 480: 336-343
172. Mechref Y Use of CID/ETD mass spectrometry to analyze glycopeptides. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 12: Unit 12* 11 11-11
173. Meiroum R, Moss S, Brenner J (1997) Bovine leukemia virus-gp51 antigen expression is associated with CD5 and IgM markers on infected lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 59: 113-119
174. Merezak C, Reichert M, Van Lint C, Kerkhofs P, Portetelle D, Willems L, Kettmann R (2002) Inhibition of histone deacetylases induces bovine leukemia virus expression in vitro and in vivo. *J Virol* 76: 5034-5042
175. Mervis RJ, Ahmad N, Lillehoj EP, Raum MG, Salazar FH, Chan HW, Venkatesan S (1988) The gag gene products of human immunodeficiency virus type 1: alignment within the gag open reading frame, identification of posttranslational modifications, and evidence for alternative gag precursors. *J Virol* 62: 3993-4002
176. Merza M, Sober J, Sundquist B, Toots I, Morein B (1991) Characterization of purified gp 51 from bovine leukemia virus integrated into iscom. Physicochemical properties and serum antibody response to the integrated gp51. *Arch Virol* 120: 219-231
177. Merza M, Sundquist B, Sober J, Morein B (1991) Immunoaffinity purification of two major proteins of bovine leukemia virus (gp51 and p24) and their use for discrimination between vaccinated and infected animals. *J Virol Methods* 33: 345-353
178. Meunier JC, Fournillier A, Choukhi A, Cahour A, Cocquerel L, Dubuisson J, Wychowski C (1999) Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *J Gen Virol* 80 (Pt 4): 887-896
179. Miller JM, Miller LD, Olson C, Gillette KG (1969) Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst* 43: 1297-1305
180. Mirsaliotis A, Nurkiyanova K, Lamb D, Kuo CW, Brighty DW (2007) An antibody that blocks human T-cell leukemia virus type 1 six-helix-bundle formation in vitro identified by a novel assay for inhibitors of envelope function. *J Gen Virol* 88: 660-669
181. Mirsaliotis A, Lamb D, Brighty DW (2008) Nonhelical leash and alpha-helical structures determine the potency of a peptide antagonist of human T-cell leukemia virus entry. *J Virol* 82: 4965-4973
182. Moller-Larsen A, Christensen T (1998) Isolation of a retrovirus from multiple sclerosis patients in self-generated Iodixanol gradients. *J Virol Methods* 73: 151-161
183. Moratorio G (2012) ASPECTOS GENÓMICOS Y EVOLUTIVOS DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA. Unidad de Biofísica de Proteínas, Institut Pasteur de Montevideo. Universidad de la República, Montevideo
184. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV (2012) Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 448-462
185. Muller B, Tessmer U, Schubert U, Krausslich HG (2000) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than gag and is phosphorylated in infected cells. *J Virol* 74: 9727-9731
186. Murakami K, Kobayashi S, Konishi M, Kameyama K, Yamamoto T, Tsutsui T The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. *Vet Microbiol* 148: 84-88
187. Myers G, Lenroot R (1992) HIV glycosylation: what does it portend? *AIDS Res Hum Retroviruses* 8: 1459-1460
188. NAHIS-AHA Enzootic Bovine Leukosis. Available online: <http://www.animalhealthaustralia.com.au/nahis/pmwiki/pmwiki.php?n=Factsheet.90-1> (accessed on 27 April 2011).
189. NAHMS-USDA Bovine Leukosis Virus on U.S. Dairy Operations, 2007. Available online: http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_BLV.pdf (accessed on 27 April 2011).
190. Nairn AV, York WS, Harris K, Hall EM, Pierce JM, Moremen KW (2008) Regulation of glycan structures in animal tissues: transcript profiling of glycan-related genes. *J Biol Chem* 283: 17298-17313
191. Nilsen SL, Castellino FJ (1999) Expression of human plasminogen in *Drosophila* Schneider S2 cells. *Protein Expr Purif* 16: 136-143
192. Nisole S, Stoye JP, Saib A (2005) TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 3: 799-808
193. North SJ, Koles K, Hembd C, Morris HR, Dell A, Panin VM, Haslam SM (2006) Glycomic studies of *Drosophila melanogaster* embryos. *Glycoconj J* 23: 345-354
194. Novakovic S, Sawai ET, Radke K (2004) Dileucine and YXXL motifs in the cytoplasmic tail of the bovine leukemia virus transmembrane envelope protein affect protein expression on the cell surface. *J Virol* 78: 8301-8311
195. Nuotio L, Rusanen H, Sihvonen L, Neuvonen E (2003) Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev Vet Med* 59: 43-49
196. Ohgimoto S, Shioda T, Mori K, Nakayama EE, Hu H, Nagai Y (1998) Location-specific, unequal contribution of the N glycans in simian immunodeficiency virus gp120 to viral infectivity and removal of multiple glycans without disturbing infectivity. *J Virol* 72: 8365-8370
197. Ott DE (2008) Cellular proteins detected in HIV-1. *Rev Med Virol* 18: 159-175

198. Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A, Gout O, Alcover A, Thoulouze MI (2009) Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med* 16: 83-89
199. Pancera M, Majeed S, Ban YE, Chen L, Huang CC, Kong L, Kwon YD, Stuckey J, Zhou T, Robinson JE, Schief WR, Sodroski J, Wyatt R, Kwong PD (2010) Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 1166-1171
200. Pancera M, Shahzad-UI-Hussan S, Doria-Rose NA, McLellan JS, Bailer RT, Dai K, Loesgen S, Louder MK, Staube RP, Yang Y, Zhang B, Parks R, Eudailey J, Lloyd KE, Blinn J, Alam SM, Haynes BF, Amin MN, Wang LX, Burton DR, Koff WC, Nabel GJ, Mascola JR, Bewley CA, Kwong PD (2013) Structural basis for diverse N-glycan recognition by HIV-1-neutralizing V1-V2-directed antibody PG16. *Nat Struct Mol Biol* 20: 804-813
201. Pandori MW, Fitch NJ, Craig HM, Richman DD, Spina CA, Guatelli JC (1996) Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J Virol* 70: 4283-4290
202. Park HE, Gruenke JA, White JM (2003) Leash in the groove mechanism of membrane fusion. *Nat Struct Biol* 10: 1048-1053
203. Patel TP, Parekh RB (1994) Release of oligosaccharides from glycoproteins by hydrazinolysis. *Methods Enzymol* 230: 57-66
204. Patterson SD, Aebersold RH (2003) Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet* 33 Suppl: 311-323
205. Pejchal R, Doores KJ, Walker LM, Khayat R, Huang PS, Wang SK, Stanfield RL, Julien JP, Ramos A, Crispin M, Depetris R, Katpally U, Marozsan A, Cupo A, Malveste S, Liu Y, McBride R, Ito Y, Sanders RW, Ogohara C, Paulson JC, Feizi T, Scanlan CN, Wong CH, Moore JP, Olson WC, Ward AB, Poignard P, Schief WR, Burton DR, Wilson IA A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield. *Science* 334: 1097-1103
206. Perez-Vargas J, Krey T, Valansi C, Avinoam O, Haouz A, Jamin M, Raveh-Barak H, Podbilewicz B, Rey FA (2014) Structural basis of eukaryotic cell-cell fusion. *Cell* 157: 407-419
207. Perzova RN, Loughran TP, Dube S, Ferrer J, Esteban E, Poiesz BJ (2000) Lack of BLV and PTLV DNA sequences in the majority of patients with large granular lymphocyte leukaemia. *Br J Haematol* 109: 64-70
208. Pinon JD, Kelly SM, Price NC, Flanagan JU, Brighty DW (2003) An antiviral peptide targets a coiled-coil domain of the human T-cell leukemia virus envelope glycoprotein. *J Virol* 77: 3281-3290
209. Pinter A, Kopelman R, Li Z, Kayman SC, Sanders DA (1997) Localization of the labile disulfide bond between SU and TM of the murine leukemia virus envelope protein complex to a highly conserved CWLC motif in SU that resembles the active-site sequence of thiol-disulfide exchange enzymes. *J Virol* 71: 8073-8077
210. Pocacqua V, Provasi E, Paltrinieri S, Gelain E, Comunian C, Ceciliani F (2005) Glycan moiety modifications of feline alpha1-acid glycoprotein in retrovirus (FIV, FeLV) affected cats. *Vet Immunol Immunopathol* 107: 17-26
211. Poiesz BJ Etiology of acute leukemia, molecular genetics and viral oncology. In: *Neoplastic Diseases of the Blood*, 3rd edn (ed. by C.P.H. Wiernik, G.P. Canellos, J.P. Dutcher & R.A. Kyle), pp.159±175. Churchill Livingstone, New York. 1995
212. Powers MA, Radke K (1992) Activation of bovine leukemia virus transcription in lymphocytes from infected sheep: rapid transition through early to late gene expression. *J Virol* 66: 4769-4777
213. Prime S, Dearnley J, Ventom AM, Parekh RB, Edge CJ (1996) Oligosaccharide sequencing based on exo- and endoglycosidase digestion and liquid chromatographic analysis of the products. *J Chromatogr A* 720: 263-274
214. Radke K, Sigala TJ, Grossman D (1992) Transcription of bovine leukemia virus in peripheral blood cells obtained during early infection in vivo. *Microb Pathog* 12: 319-331
215. Rama G (2013) Desarrollo y análisis comparativo de una nueva herramienta para el diagnóstico de la Leucosis Enzoótica Bovina; Impacto del descenso de AC anti-VLB circulantes en el periparto para el diagnóstico serológico. Departamento de Producción Animal , Laboratorio de Técnicas Nucleares (Facultad de Veterinaria)/Unidad de Biofísica de Proteínas (Institut Pasteur de Montevideo). Universidad de la República, Montevideo
216. Rama GM, G.; Greif, G.; Obal, G.; Bianchi, S.; Tomé, L.; Carrion, F.; Meikle, A.; Pritsch O (2011) Development of a real time PCR assay using SYBR Green chemistry for bovine leukemia virus detection. *Retrovirology* 2011, 8, A17.
217. Ramet M, Manfrulli P, Pearson A, Mathey-Prevot B, Ezekowitz RA (2002) Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* 416: 644-648
218. Raska M, Takahashi K, Czernekova L, Zachova K, Hall S, Moldoveanu Z, Elliott MC, Wilson L, Brown R, Jancova D, Barnes S, Vrbkova J, Tomana M, Smith PD, Mestecky J, Renfrow MB, Novak J (2010) Glycosylation patterns of HIV-1 gp120 depend on the type of expressing cells and affect antibody recognition. *J Biol Chem* 285: 20860-20869
219. Reichert M, Winnicka A, Willems L, Kettmann R, Cantor GH (2001) Role of the proline-rich motif of bovine leukemia virus transmembrane protein gp30 in viral load and pathogenicity in sheep. *J Virol* 75: 8082-8089
220. Ren X, Xue C, Kong Q, Zhang C, Bi Y, Cao Y Proteomic analysis of purified Newcastle disease virus particles. *Proteome Sci* 10: 32
221. Rosewick N, Momont M, Durkin K, Takeda H, Caiment F, Cleuter Y, Vernin C, Mortreux F, Wattel E, Burny A, Georges M, Van den Broeke A Deep sequencing reveals abundant noncanonical retroviral microRNAs in B-cell leukemia/lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 2306-2311
222. Rothman JE, Fine RE (1980) Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 780-784
223. Rue SM, Roos JW, Tarwater PM, Clements JE, Barber SA (2005) Phosphorylation and proteolytic cleavage of gag proteins in budded simian immunodeficiency virus. *J Virol* 79: 2484-2492
224. Russo S, Montermini L, Berkovitz-Siman-Tov R, Ponti W, Poli G (1998) Expression of bovine leukemia virus ENV glycoprotein in insect cells by recombinant baculovirus. *FEBS Lett* 436: 11-16

-
225. Sagara Y, Inoue Y, Shiraki H, Jinno A, Hoshino H, Maeda Y (1996) Identification and mapping of functional domains on human T-cell lymphotropic virus type 1 envelope proteins by using synthetic peptides. *J Virol* 70: 1564-1569
226. Sagata N, Ikawa Y (1984) BLV and HTLV-I: their unique genomic structures and evolutionary relationship. *Princess Takamatsu Symp* 15: 229-240
227. Sagata N, Yasunaga T, Tsuzuku-Kawamura J, Ohishi K, Ogawa Y, Ikawa Y (1985) Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 677-681
228. Sanders RW, Vesanen M, Schuelke N, Master A, Schiffner L, Kalyanaraman R, Paluch M, Berkhout B, Maddon PJ, Olson WC, Lu M, Moore JP (2002) Stabilization of the soluble, cleaved, trimeric form of the envelope glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 76: 8875-8889
229. Sanders RW, Derking R, Cupo A, Julien JP, Yasmeen A, de Val N, Kim HJ, Blattner C, de la Pena AT, Korzun J, Golabek M, de Los Reyes K, Ketas TJ, van Gils MJ, King CR, Wilson IA, Ward AB, Klasse PJ, Moore JP (2013) A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env Trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. *PLoS Pathog* 9: e1003618
230. Saphire AC, Galloway PA, Bark SJ (2006) Proteomic analysis of human immunodeficiency virus using liquid chromatography/tandem mass spectrometry effectively distinguishes specific incorporated host proteins. *J Proteome Res* 5: 530-538
231. Sargeant JM, Martin SW, Mann ED. (1997) Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds. *Prev Vet Med* 31: 211-221
232. Schetz JA, Shankar EP (2004) Protein expression in the *Drosophila* Schneider 2 cell system. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 4: Unit 4 16
233. Schiller B, Hykollari A, Yan S, Paschinger K, Wilson IB Complicated N-linked glycans in simple organisms. *Biol Chem* 393: 661-673
234. Schneider I (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 27: 353-365
235. Schultz AM, Copeland TD, Oroszlan S (1984) The envelope proteins of bovine leukemia virus: purification and sequence analysis. *Virology* 135: 417-427
236. Schwientek T, Mandel U, Roth U, Muller S, Hanisch FG (2007) A serial lectin approach to the mucin-type O-glycoproteome of *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Proteomics* 7: 3264-3277
237. Scott HM, Sorensen O, Wu JT, Chow EY, Manninen K, VanLeeuwen JA (2006) Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, *Neospora caninum*, Bovine leukemia virus, and Bovine viral diarrhea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. *Can Vet J* 47: 981-991
238. Segura MM, Garnier A, Kamen A (2006) Purification and characterization of retrovirus vector particles by rate zonal ultracentrifugation. *J Virol Methods* 133: 82-91
239. Segura MM, Kamen A, Garnier A (2008) Purification of retrovirus particles using heparin affinity chromatography. *Methods Mol Biol* 434: 1-11
240. Selby M, Erickson A, Dong C, Cooper S, Parham P, Houghton M, Walker CM (1999) Hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 originates in the endoplasmic reticulum and requires cytoplasmic processing for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* 162: 669-676
241. Skehel JJ, Wiley DC (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69: 531-569
242. Slater-Handshy T, Droll DA, Fan X, Di Bisceglie AM, Chambers TJ (2004) HCV E2 glycoprotein: mutagenesis of N-linked glycosylation sites and its effects on E2 expression and processing. *Virology* 319: 36-48
243. Stanley P, Schachter H, Taniguchi N (2009) N-Glycans. *Essentials of Glycobiology*
244. Sugrue RJ (2007) Viruses and glycosylation: an overview. *Methods Mol Biol* 379: 1-13
245. Suzuki S, Konnai S, Okagawa T, Ikebuchi R, Shirai T, Sunden Y, Mingala CN, Murata S, Ohashi K Expression analysis of *Foxp3* in T cells from bovine leukemia virus infected cattle. *Microbiol Immunol* 57: 600-604
246. Tajima S, Ikawa Y, Aida Y (1998) Complete bovine leukemia virus (BLV) provirus is conserved in BLV-infected cattle throughout the course of B-cell lymphosarcoma development. *J Virol* 72: 7569-7576
247. Thoulouze MI, Alcover A (2011) Can viruses form biofilms? *Trends Microbiol* 19: 257-262
248. Tran DT, Ten Hagen KG (2013) Mucin-type O-glycosylation during development. *J Biol Chem* 288: 6921-6929
249. Tran EE, Borgnia MJ, Kuybeda O, Schauder DM, Bartesaghi A, Frank GA, Sapiro G, Milne JL, Subramaniam S Structural mechanism of trimeric HIV-1 envelope glycoprotein activation. *PLoS Pathog* 8: e1002797
250. Trono KG, Perez-Filgueira DM, Duffy S, Borca MV, Carrillo C (2001) Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet Microbiol* 83: 235-248
251. Van der Maaten MJ, Miller JM, Boothe AD (1974) Resplicating type-C particle in monolayer cell cultures of tissues from cattle with lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst* 52: 491-497
252. VanLeeuwen JA, Tiwari A, Plaizier JC, Whiting TL (2006) Seroprevalences of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in Manitoba. *Can Vet J* 47: 783-786
253. Varchetta S, Lusso P, Hudspeth K, Mikulak J, Mele D, Paolucci S, Cimbro R, Malnati M, Riva A, Maserati R, Mondelli MU, Mavilio D (2013) Sialic acid-binding Ig-like lectin-7 interacts with HIV-1 gp120 and facilitates infection of CD4pos T cells and macrophages. *Retrovirology* 10: 154
254. Varki A (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3: 97-130
-

-
255. Veronese FD, Copeland TD, Oroszlan S, Gallo RC, Sarnadharan MG (1988) Biochemical and immunological analysis of human immunodeficiency virus gag gene products p17 and p24. *J Virol* 62: 795-801
256. Vigerust DJ, Shepherd VL (2007) Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions. *Trends Microbiol* 15: 211-218
257. Vogt VM, Simon MN (1999) Mass determination of rous sarcoma virus virions by scanning transmission electron microscopy. *J Virol* 73: 7050-7055
258. Voneche V, Callebaut I, Kettmann R, Brasseur R, Burny A, Portetelle D (1992) The 19-27 amino acid segment of gp51 adopts an amphiphilic structure and plays a key role in the fusion events induced by bovine leukemia virus. *J Biol Chem* 267: 15193-15197
259. Voynov V, Chennamsetty N, Kayser V, Helk B, Forrer K, Zhang H, Fritsch C, Heine H, Trout BL (2009) Dynamic fluctuations of protein-carbohydrate interactions promote protein aggregation. *PLoS One* 4: e8425
260. Wagner R, Wolff T, Herwig A, Pleschka S, Klenk HD (2000) Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J Virol* 74: 6316-6323
261. Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui PY, Wagner D, Phung P, Goss JL, Wrin T, Simek MD, Fling S, Mitcham JL, Lehrman JK, Priddy FH, Olsen OA, Frey SM, Hammond PW, Kaminsky S, Zamb T, Moyle M, Koff WC, Poignard P, Burton DR (2009) Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* 326: 285-289
262. Walker LM, Huber M, Doores KJ, Falkowska E, Pejchal R, Julien JP, Wang SK, Ramos A, Chan-Hui PY, Moyle M, Mitcham JL, Hammond PW, Olsen OA, Phung P, Fling S, Wong CH, Phogat S, Wrin T, Simek MD, Koff WC, Wilson IA, Burton DR, Poignard P (2011) Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* 477: 466-470
263. Walker LM, Sok D, Nishimura Y, Donau O, Sadjadpour R, Gautam R, Shingai M, Pejchal R, Ramos A, Simek MD, Geng Y, Wilson IA, Poignard P, Martin MA, Burton DR (2011) Rapid development of glycan-specific, broad, and potent anti-HIV-1 gp120 neutralizing antibodies in an R5 SIV/HIV chimeric virus infected macaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 20125-20129
264. Wallin M, Ekstrom M, Garoff H (2004) Isomerization of the intersubunit disulphide-bond in Env controls retrovirus fusion. *EMBO J* 23: 54-65
265. Wallin M, Ekstrom M, Garoff H (2005) The fusion-controlling disulfide bond isomerase in retrovirus Env is triggered by protein destabilization. *J Virol* 79: 1678-1685
266. Wang H, Norris KM, Mansky LM (2002) Analysis of bovine leukemia virus gag membrane targeting and late domain function. *J Virol* 76: 8485-8493
267. Wang H (2004) STUDIES OF DELTARETROVIRUS ASSEMBLY AND RELEASE. The Ohio State University, Ohio
268. Weerapana E, Imperiali B (2006) Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* 16: 91R-101R
269. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM (2003) Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422: 307-312
270. Weissenhorn W, Carfi A, Lee KH, Skehel JJ, Wiley DC (1998) Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Mol Cell* 2: 605-616
271. Weissenhorn W, Hinz A, Gaudin Y (2007) Virus membrane fusion. *FEBS Lett* 581: 2150-2155
272. Welch BD, Liu Y, Kors CA, Leser GP, Jardetzky TS, Lamb RA (2012) Structure of the cleavage-activated prefusion form of the parainfluenza virus 5 fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 16672-16677
273. Welker R, Kottler H, Kalbitzer HR, Krausslich HG (1996) Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology* 219: 228-236
274. Wiley DC, Wilson IA, Skehel JJ (1981) Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* 289: 373-378
275. Willems L, Gegonne A, Chen G, Burny A, Kettmann R, Ghysdael J (1987) The bovine leukemia virus p34 is a transactivator protein. *EMBO J* 6: 3385-3389
276. Willems L, Heremans H, Chen G, Portetelle D, Billiau A, Burny A, Kettmann R (1990) Cooperation between bovine leukaemia virus transactivator protein and Ha-ras oncogene product in cellular transformation. *EMBO J* 9: 1577-1581
277. Willems L, Grimonpont C, Heremans H, Rebeyrotte N, Chen G, Portetelle D, Burny A, Kettmann R (1992) Mutations in the bovine leukemia virus Tax protein can abrogate the long terminal repeat-directed transactivating activity without concomitant loss of transforming potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3957-3961
278. Willems L, Kettmann R, Chen G, Portetelle D, Burny A, Derse D (1992) A cyclic AMP-responsive DNA-binding protein (CREB2) is a cellular transactivator of the bovine leukemia virus long terminal repeat. *J Virol* 66: 766-772
279. Willems L, Gatot JS, Mammerickx M, Portetelle D, Burny A, Kerkhofs P, Kettmann R (1995) The YXXL signalling motifs of the bovine leukemia virus transmembrane protein are required for in vivo infection and maintenance of high viral loads. *J Virol* 69: 4137-4141
280. Willems L, Burny A, Collete D, Dangoisse O, Dequiedt F, Gatot JS, Kerkhofs P, Lefebvre L, Merezak C, Peremans T, Portetelle D, Twizere JC, Kettmann R (2000) Genetic determinants of bovine leukemia virus pathogenesis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 1787-1795
281. Wilson IA, Ladner RC, Skehel JJ, Wiley DC (1983) The structure and role of the carbohydrate moieties of influenza virus haemagglutinin. *Biochem Soc Trans* 11: 145-147
282. Xu R, Ekiert DC, Krause JC, Hai R, Crowe JE, Jr., Wilson IA Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Science* 328: 357-360
-

-
283. Yamada T, Shigemura H, Ishiguro N, Inoshima Y Cell Infectivity in relation to bovine leukemia virus gp51 and p24 in bovine milk exosomes. *PLoS One* 8: e77359
284. Ye Y, Si ZH, Moore JP, Sodroski J (2000) Association of structural changes in the V2 and V3 loops of the gp120 envelope glycoprotein with acquisition of neutralization resistance in a simian-human immunodeficiency virus passaged in vivo. *J Virol* 74: 11955-11962
285. Yin HS, Wen X, Paterson RG, Lamb RA, Jardetzky TS (2006) Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature* 439: 38-44
286. Ying W, Hao Y, Zhang Y, Peng W, Qin E, Cai Y, Wei K, Wang J, Chang G, Sun W, Dai S, Li X, Zhu Y, Li J, Wu S, Guo L, Dai J, Wan P, Chen T, Du C, Li D, Wan J, Kuai X, Li W, Shi R, Wei H, Cao C, Yu M, Liu H, Dong F, Wang D, Zhang X, Qian X, Zhu Q, He F (2004) Proteomic analysis on structural proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus. *Proteomics* 4: 492-504
287. Zaffaroni RP, J.; Nuñez, A.; de Freitas, J.; Suanes, A.; Cernicchiaro, N.; Gil, A. (2007) Evolución temporal de la seroprevalencia de la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) en la cuenca lechera sur del Uruguay. . V Jornadas técnicas veterinarias, Montevideo, Uruguay p 150-151
288. Zambon MC (1999) Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J Antimicrob Chemother* 44 Suppl B: 3-9
289. Zarkik S, Decroly E, Wattiez R, Seidah NG, Burny A, Ruyschaert JM (1997) Comparative processing of bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp72 by subtilisin/kexin-like mammalian convertases. *FEBS Lett* 406: 205-210
290. Zennou V, Perez-Caballero D, Gottlinger H, Bieniasz PD (2004) APOBEC3G incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol* 78: 12058-12061
291. Zhou T, Xu L, Dey B, Hessel AJ, Van Ryk D, Xiang SH, Yang X, Zhang MY, Zwick MB, Arthos J, Burton DR, Dimitrov DS, Sodroski J, Wyatt R, Nabel GJ, Kwong PD (2007) Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature* 445: 732-737
292. Zhou T, Georgiev I, Wu X, Yang ZY, Dai K, Finzi A, Kwon YD, Scheid JF, Shi W, Xu L, Yang Y, Zhu J, Nussenzweig MC, Sodroski J, Shapiro L, Nabel GJ, Mascola JR, Kwong PD (2010) Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* 329: 811-817

i) Anexo tesis A- Estrategia experimental

Capítulo 4

P24 sitios potenciales de fosforilación



NetPhos 2.0 Server - prediction results

Technical University of Denmark

```

216 Sequence
LPIIASEGNNRHRRAWALRELQDIKKEIENKAPGSQVWIQTLRLAILQADPTPADLEQLCQYIASPVDQTAHMTSLTAAIA      80
AAEAANTLQGFNPQNGTLTQQSAQPNAGDLRSQYQNLWLQAWKNLPTRPSVQPWSTIVQGPAESYVEFVNRLQISLADNL      160
PDGVPKEPTIDSLSYANANRECQQILQGRGLVAAPVGQKLQACAHWAPKVKQPAVL      240
.....T.....T.....S...T.....      80
.....SY.....S.....      160
.....Y.....      240
  
```

Phosphorylation sites predicted: Ser: 3 Thr: 3 Tyr: 2

Serine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
		v		
Sequence	5	LPIIASEGNNR	0.004	.
Sequence	34	KAPGSQVWI	0.077	.
Sequence	64	QYIASPVDQ	0.740	*S*
Sequence	74	AHMTSLTAA	0.365	.
Sequence	102	LTQQSAQPN	0.058	.
Sequence	112	GDLRSQYQN	0.188	.
Sequence	130	PTRPSVQPW	0.240	.
Sequence	135	VQPWSTIVQ	0.193	.
Sequence	144	GPAESYVEF	0.824	*S*
Sequence	155	RLQISLADN	0.596	*S*
Sequence	172	PIIDSLSYA	0.005	.
Sequence	174	IDSLSYANA	0.316	.
		^		

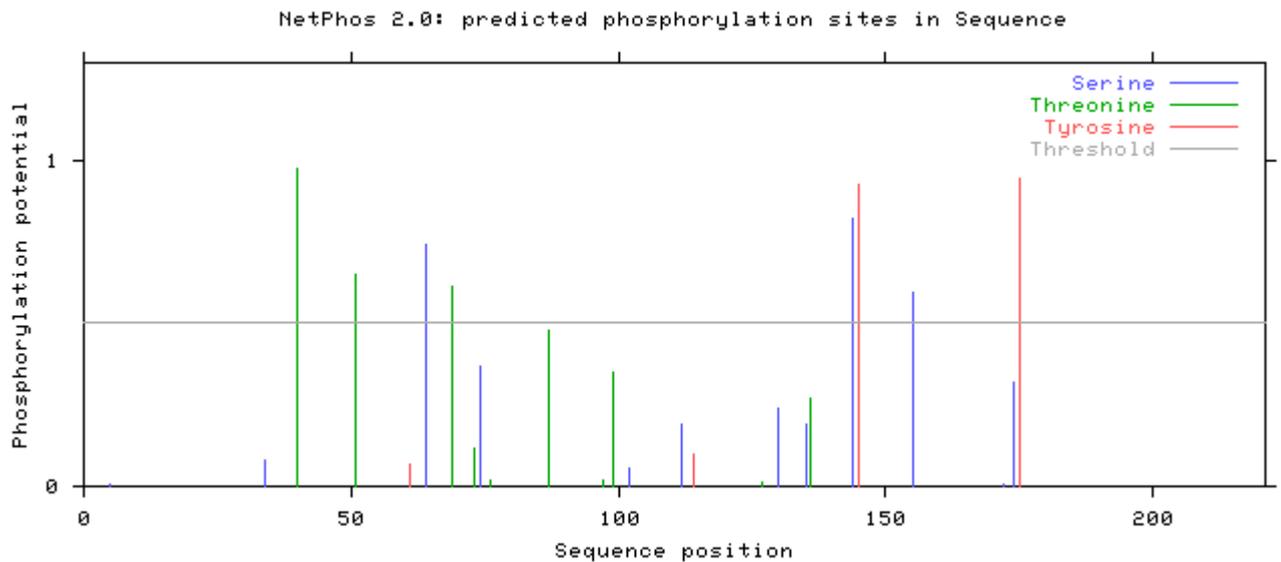
Threonine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
		v		
Sequence	40	VWIQTLRLA	0.978	*T*
Sequence	51	QADPTPADL	0.652	*T*
Sequence	69	PVDQTAHMT	0.611	*T*
Sequence	73	TAHMTSLTA	0.116	.
Sequence	76	MTSLTAAIA	0.021	.
Sequence	87	EAANTLQGF	0.479	.
Sequence	97	PQNGTLTQQ	0.019	.
Sequence	99	NGTLTQQSA	0.351	.
Sequence	127	KNLPTRPSV	0.014	.
Sequence	136	QPWSTIVQG	0.269	.
		^		

Tyrosine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
		v		

Sequence	61	QLCQYIASP	0.070	.
Sequence	114	LRSQYQNLW	0.097	.
Sequence	145	PAESYVEFV	0.928	*Y*
Sequence	175	DSL [^] SYANAN	0.944	*Y*



Sitios potenciales de N-glicosilación para la proteína Env nativa



NetNGlyc 1.0 Server - prediction results

Technical University of Denmark

Asn-Xaa-Ser/Thr sequons in the sequence output below are highlighted in blue.

Asparagines predicted to be N-glycosylated are highlighted in red.

Name:	Sequence	Length:	515
	MPKKRRRRRPPQPIIRWVSLTLLTLLALCRPIQTWRCSLSLGNQQWMTAYNQEAKFSISIDQILEAHNQS PFCAKSPRYTL		80
	DSVNGYPKIYWPPPQRRRFGARAMVTYDCEPRCPYVGADRFDCEPHWDNASQADQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTW		160
	EIWGYDPLITFSLHKIPDPQPDPFQNLNSDWVPSVRSWALLLNQTARAFPDCAICWEPSPPWAPPEILVY ^{NKT} ISSSGPGL		240
	ALPDAQIFWV ^{NTSSFN} TTQGWHPSPQRLLFNVSQGNALLLPPISLV ^{NL} STASSAPPTRVRRSPVAALTLGLALS ^{VGLTGI}		320
	NVAVSALSHQRLTSLIHVLEQDQRLITAINQ ^{THYNLL} NVASVVAQNRRGLDWLYIRLGFQSLCPTINEPCCFLRIQ ^{NDS}		400
	IIRLGDLPQLSQRVSTDWQWPNNWDLGLTAWVRETIHSVLSLFLALFLFLAPCLIKCLTSRLLKLLRQAPHFPEISLT		480
	PKPDSDYQALLPSAPEIYSHLSPVKPDYINLRPCP		515
		80
N.....		160
N.....N.....		240
N.....N.....N.....		320
N.....		400
		480

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	67 NQSP	0.2046	(9/9)	---
Sequence	129 NASQ	0.6638	(9/9)	++
Sequence	203 NQTA	0.7038	(9/9)	++
Sequence	230 NKTI	0.6232	(7/9)	+
Sequence	251 NTSS	0.6280	(9/9)	++
Sequence	256 NTTQ	0.4616	(5/9)	-
Sequence	271 NVSQ	0.6814	(9/9)	++
Sequence	287 NLST	0.5278	(8/9)	+
Sequence	351 NQTH	0.4718	(5/9)	-
Sequence	398 NDSI	0.5366	(5/9)	+

Sitios potenciales de N-glicosilación para la proteína Env recombinante (srEnv-BLVwt y srEnv-BLVmut)

srEnv-BLVwt

Name: Sequence Length: 429

```

SDLNMKLCILLAVVAVFVGLSLGRSTWRCSLSLGNQQWMTAYNQEAKFSISIDQILEAHNQSFFCAKSPRYTLDSVNGYPK      80
IYWPPQGRRRFGARAMVTYDCEPRCPYVGADRFDPCPHWDNASQADQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIWGYDPL      160
ITFSLHKIPDPPQDFPQLNSDWVPSVRSWALLLNQTARAFDCAICWEPSPPWAPPEILVYNKTISSSGPGLALPDAQIF      240
WVNTSSFNTTQGWHHPSQRLLFNVSQGNALLLPPISLVNLS TASSAPPTRVRRSPVAALTLGLALSVGLTGINVAVSALS      320
HQRLTSLIHVLEQDQORLITAINQTHYNLLNVASVVAQNRRGLDWLYIRLGFQSLCPTINEPCCFLRIQNSIIRLGLDQ      400
PLSQRVSTDWQWPWNWDLGLTAWVRETIH

```

..... 80
.....N..... 160
.....N.....N..... 240
..N.....N.....N..... 320
.....N..... 400
..... 480

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	59 NQSP	0.2052	(9/9)	---
Sequence	121 NASQ	0.6609	(9/9)	++
Sequence	195 NQTA	0.6964	(9/9)	++
Sequence	222 NKTI	0.6132	(6/9)	+
Sequence	243 NTSS	0.6167	(8/9)	+
Sequence	248 NTTQ	0.4496	(5/9)	-
Sequence	263 NVSQ	0.6704	(9/9)	++
Sequence	279 NLST	0.5121	(7/9)	+
Sequence	343 NQTH	0.4541	(5/9)	-
Sequence	390 NDSI	0.5148	(4/9)	+

srEnv-BLVmut

Name: Sequence Length: 429

```

SDLNMKLCILLAVVAVFVGLSLGRSTWRCSLSLGNQQWMTAYNQEAKFSISIDQILEAHNQSFFCAKSPRYTLDSVNGYPK      80
IYWPPQGRRRFGARAMVTYDCEPRCPYVGADRFDPCPHWDNASQADQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIWGYDPL      160
ITFSLHKIPDPPQDFPQLNSDWVPSVRSWALLLNQTARAFDCAICWEPSPPWAPPEILVYNKTISSSGPGLALPDAQIF      240
WVNTSSFNTTQGWHHPSQRLLFNVSQGNALLLPPISLVNLS TASSAPPTRVNNSPVAALTLGLALSVGLTGINVAVSALS      320
HQRLTSLIHVLEQDQORLITAINQTHYNLLNVASVVAQNRRGLDWLYIRLGFQSLCPTINEPCCFLRIQNSIIRLGLDQ      400
PLSQRVSTDWQWPWNWDLGLTAWVRETIH

```

..... 80
.....N..... 160
.....N.....N..... 240
..N.....N.....N..... 320
.....N..... 400

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	59 NQSP	0.2052	(9/9)	---
Sequence	121 NASQ	0.6609	(9/9)	++
Sequence	195 NQTA	0.6964	(9/9)	++
Sequence	222 NKTI	0.6131	(6/9)	+
Sequence	243 NTSS	0.6166	(8/9)	+
Sequence	248 NTTQ	0.4496	(5/9)	-
Sequence	263 NVSQ	0.6706	(9/9)	++
Sequence	279 NLST	0.5120	(7/9)	+
Sequence	292 NNSP	0.1449	(9/9)	---
Sequence	343 NQTH	0.4541	(5/9)	-
Sequence	390 NDSI	0.5149	(4/9)	+

Sitios potenciales de O-glicosilación para la proteína Env nativa



NetOGlyc 3.1 Server - prediction results

Technical University of Denmark

Name: Sequence Length: 515
 MPKKRRSRRRPQPIIRWVSLTLLTLLALCRPIQTWRCSLSLGNQQWMTAYNQEAKFSISIDQILEAHNQSPFCAKSPR
 YTLDSVNGYPKIIYWPFPQGRRRFGARAMVTYDCEPRCPYVGADRFDPCPHWDNASQADQGSFYVNHQILFLHLKQCHG
 IFTLTWEIWGYDPLITFSLHKIPDPPQPDFPQLNSDWVPSVRSWALLLNQTARAFPDCAICWEPSPPPWAPPEILVYNK
 TISSSGPGLALPDAQIFWVNTSSFNTTQGWHPHSQRLLFNVSQGNALLPPIISLVNLSTASSAPPTRVRRSPVAALT
 LGLALS VGLTGINVAVSALSHQRLTSLIHVLEQDQORLITAINQTHYNLLNVAQNRRLDGLDWLYIRLGFQSLCP
 TINEPCCFLRIQNDSIIRLGDLPQLSQRVSTDWQWPWNWDLGLTAWVRETIHVSLSLFLALFLLFLAPCLIKCLTS
 RLLKLLRQAPHFPEISLTPKPDSDYQALLPSAPEIYSHLSPVKPDYINLRPCP

Name	S/T	Pos	G-score	I-score	Y/N	Comment
Sequence	S	7	0.317	0.041	.	-
Sequence	S	19	0.128	0.075	.	-
Sequence	T	21	0.190	0.071	.	-
Sequence	T	23	0.175	0.053	.	-
Sequence	T	33	0.170	0.089	.	-
Sequence	S	37	0.087	0.032	.	-
Sequence	S	39	0.089	0.063	.	-
Sequence	T	47	0.159	0.061	.	-
Sequence	S	56	0.116	0.080	.	-
Sequence	S	58	0.123	0.039	.	-
Sequence	S	69	0.161	0.031	.	-
Sequence	S	75	0.165	0.030	.	-
Sequence	T	79	0.379	0.074	.	-
Sequence	S	82	0.240	0.025	.	-
Sequence	T	107	0.320	0.079	.	-
Sequence	S	131	0.114	0.089	.	-

Sequence	S	137	0.072	0.029	.	-
Sequence	T	157	0.112	0.054	.	-
Sequence	T	159	0.114	0.073	.	-
Sequence	T	170	0.345	0.091	.	-
Sequence	S	172	0.233	0.027	.	-
Sequence	S	189	0.241	0.053	.	-
Sequence	S	194	0.220	0.042	.	-
Sequence	S	197	0.173	0.053	.	-
Sequence	T	205	0.284	0.032	.	-
Sequence	S	219	0.269	0.029	.	-
Sequence	T	232	0.475	0.021	.	-
Sequence	S	234	0.278	0.058	.	-
Sequence	S	235	0.264	0.373	.	-
Sequence	S	236	0.217	0.092	.	-
Sequence	T	252	0.292	0.035	.	-
Sequence	S	253	0.189	0.023	.	-
Sequence	S	254	0.156	0.032	.	-
Sequence	T	257	0.218	0.044	.	-
Sequence	T	258	0.244	0.041	.	-
Sequence	S	265	0.141	0.035	.	-
Sequence	S	273	0.123	0.043	.	-
Sequence	S	284	0.266	0.050	.	-
Sequence	S	289	0.341	0.037	.	-
Sequence	T	290	0.485	0.038	.	-
Sequence	S	292	0.387	0.073	.	-
Sequence	S	293	0.402	0.347	.	-
Sequence	T	297	0.502	0.166	T	-
Sequence	S	302	0.330	0.032	.	-
Sequence	T	308	0.388	0.115	.	-
Sequence	S	314	0.176	0.081	.	-
Sequence	T	318	0.237	0.082	.	-
Sequence	S	325	0.130	0.205	.	-
Sequence	S	328	0.117	0.047	.	-
Sequence	T	333	0.195	0.054	.	-
Sequence	S	334	0.121	0.033	.	-
Sequence	T	348	0.154	0.055	.	-
Sequence	T	353	0.135	0.020	.	-
Sequence	S	362	0.082	0.034	.	-
Sequence	S	382	0.062	0.034	.	-
Sequence	T	386	0.113	0.353	.	-
Sequence	S	400	0.129	0.019	.	-
Sequence	S	411	0.115	0.068	.	-
Sequence	S	415	0.146	0.050	.	-
Sequence	T	416	0.190	0.045	.	-
Sequence	T	429	0.186	0.064	.	-
Sequence	T	435	0.112	0.022	.	-
Sequence	S	438	0.058	0.041	.	-
Sequence	S	441	0.063	0.053	.	-
Sequence	T	461	0.122	0.078	.	-
Sequence	S	462	0.076	0.053	.	-
Sequence	S	478	0.227	0.134	.	-
Sequence	T	480	0.396	0.673	T	-
Sequence	S	485	0.355	0.018	.	-
Sequence	S	493	0.333	0.128	.	-
Sequence	S	499	0.205	0.054	.	-
Sequence	S	502	0.246	0.036	.	-

Sitios potenciales de O-glicosilación para la proteína Env recombinante (srEnv-BLVwt y srEnv-BLVmut)

Name: Sequence Length: 429
 SDLNMLKLCILLAVVAFVGLSLGRSTWRCSLSLGNQQWMTAYNQEAKFSISIDQILEAHNQSPFCAKSPRYTLDSVNG
 YPKIYWPPPQGRRRFGARAMVTYDCEPRCPYVGADRFDCPHWDNASQADQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEI
 WGYDPLITFSLHKIPDPPQPDFPQLNSDWVPSVRSWALLLNQTARAFPDCAICWEPSPPWAPEILVYNKTISSSGPG

LALPDAQIFWVNTSSFNTTQGWHHPSQRLLFNVSQGNALLLPPISLVNLSTASSAPPTRVNNSPVAALTGLALS
 LTGINVAVSALSHQRLTSLIHVLEQDQQLITAINQTHYNLLNVASVVAQNRRGLDWLYIRLGFQSLCPTINEPCCF
 LRIQNDSIIRLGLDQPLSQRVSTDWQWPWNWDLGLTAWVRETIH

.....

T.....

Name	S/T	Pos	G-score	I-score	Y/N	Comment
Sequence	S	1	0.240	0.036	.	-
Sequence	S	20	0.079	0.042	.	-
Sequence	S	24	0.116	0.018	.	-
Sequence	T	25	0.182	0.046	.	-
Sequence	S	29	0.118	0.032	.	-
Sequence	S	31	0.115	0.063	.	-
Sequence	T	39	0.189	0.061	.	-
Sequence	S	48	0.127	0.080	.	-
Sequence	S	50	0.134	0.039	.	-
Sequence	S	61	0.175	0.031	.	-
Sequence	S	67	0.179	0.030	.	-
Sequence	T	71	0.401	0.074	.	-
Sequence	S	74	0.257	0.025	.	-
Sequence	T	99	0.341	0.079	.	-
Sequence	S	123	0.123	0.089	.	-
Sequence	S	129	0.077	0.029	.	-
Sequence	T	149	0.119	0.054	.	-
Sequence	T	151	0.121	0.073	.	-
Sequence	T	162	0.362	0.091	.	-
Sequence	S	164	0.247	0.027	.	-
Sequence	S	181	0.257	0.053	.	-
Sequence	S	186	0.237	0.042	.	-
Sequence	S	189	0.188	0.053	.	-
Sequence	T	197	0.303	0.032	.	-
Sequence	S	211	0.286	0.029	.	-
Sequence	T	224	0.494	0.021	.	-
Sequence	S	226	0.296	0.058	.	-
Sequence	S	227	0.280	0.374	.	-
Sequence	S	228	0.233	0.092	.	-
Sequence	T	244	0.309	0.035	.	-
Sequence	S	245	0.202	0.023	.	-
Sequence	S	246	0.168	0.032	.	-
Sequence	T	249	0.232	0.044	.	-
Sequence	T	250	0.259	0.041	.	-
Sequence	S	257	0.152	0.035	.	-
Sequence	S	265	0.133	0.043	.	-
Sequence	S	276	0.285	0.050	.	-
Sequence	S	281	0.347	0.037	.	-
Sequence	T	282	0.493	0.038	.	-
Sequence	S	284	0.392	0.073	.	-
Sequence	S	285	0.406	0.347	.	-
Sequence	T	289	0.507	0.390	T	-
Sequence	S	294	0.334	0.028	.	-
Sequence	T	300	0.392	0.115	.	-
Sequence	S	306	0.176	0.081	.	-
Sequence	T	310	0.252	0.082	.	-
Sequence	S	317	0.140	0.205	.	-
Sequence	S	320	0.126	0.047	.	-
Sequence	T	325	0.209	0.054	.	-
Sequence	S	326	0.130	0.033	.	-
Sequence	T	340	0.165	0.055	.	-
Sequence	T	345	0.144	0.020	.	-
Sequence	S	354	0.087	0.034	.	-

Sequence	S	374	0.066	0.034	.	-
Sequence	T	378	0.120	0.353	.	-
Sequence	S	392	0.139	0.019	.	-
Sequence	S	403	0.124	0.068	.	-
Sequence	S	407	0.157	0.050	.	-
Sequence	T	408	0.203	0.045	.	-
Sequence	T	421	0.304	0.064	.	-
Sequence	T	427	0.389	0.026	.	-

Capítulo 5

Apéndice 1- Secuencia aminoacídica del precursor completo de Env de la cepa FLK-BLV junto con las 4 construcciones expresadas en células S2

Secuencia aminoacídica completa del precursor Env (cepa FLK-BLV)

```

1  MPKKRRSRRRPQPIIRWVSLTLLALCRPIQTWRCSLSLGNQQWMTAYNQEAKFSISID 60
61  QILEAHNQSPFCAKSPRYTLDSVNGYPKIYWPPPQGRRRFGARAMVTYDCEPRCPYVGAD 120
121 RFDCPHWDNASQADQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIWGYDPLITFSLHKIPDPP 180
181 QPDFPQLNSDWVPSVRSWALLLNQTARAFPDCAICWEPSPPWAPEILVYNKTISSSGPGL 240
241 ALPDAQIFWVNTSSFNTTQGWHHPSQRLLFNVSQGNALLPPIISLVNLSTASSAPPTRVR 300
301 RSPVAALTLGLALSVGLTGINVAVSALSHQRLTSLIHVLEQDQORLITAINQTHYNLLNV 360
361 ASVVAQNRRLDGLDWLYIRLGFQSLCPTINEPCCFLRIQNDSIIRLGDLPQPLSQRVSTDWQW 420
21 PWNWDLGLTAWVRETIHVSLSLFLALFLLFLAPCLIKCLTSRLLKLLRQAPHFPEISLT 480
481 PKPDSYQALLPSAPEIYSHLSPVKPDYINLRPCP 515

```

FLK-BLV Env precursor 33-437wt

```

-----33 TWRC SLSLGNQQWMTAYNQEAKFSISID 60
61  QILEAHNQSPFCAKSPRYTLDSVNGYPKIYWPPPQGRRRFGARAMVTYDCEPRCPYVGAD 120
121 RFDCPHWDNASQADQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIWGYDPLITFSLHKIPDPP 180
181 QPDFPQLNSDWVPSVRSWALLLNQTARAFPDCAICWEPSPPWAPEILVYNKTISSSGPGL 240
241 ALPDAQIFWVNTSSFNTTQGWHHPSQRLLFNVSQGNALLPPIISLVNLSTASSAPPTRVR 300
301 RSPVAALTLGLALSVGLTGINVAVSALSHQRLTSLIHVLEQDQORLITAINQTHYNLLNV 360
361 ASVVAQNRRLDGLDWLYIRLGFQSLCPTINEPCCFLRIQNDSIIRLGDLPQPLSQRVSTDWQW 420
421 PWNWDLGLTAWVRETIH 437

```

FLK-BLV Env precursor 33-418wt

```

-----33 TWRC SLSLGNQQWMTAYNQEAKFSISID 60
61  QILEAHNQSPFCAKSPRYTLDSVNGYPKIYWPPPQGRRRFGARAMVTYDCEPRCPYVGAD 120
121 RFDCPHWDNASQADQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIWGYDPLITFSLHKIPDPP 180
181 QPDFPQLNSDWVPSVRSWALLLNQTARAFPDCAICWEPSPPWAPEILVYNKTISSSGPGL 240
241 ALPDAQIFWVNTSSFNTTQGWHHPSQRLLFNVSQGNALLPPIISLVNLSTASSAPPTRVR 300
301 RSPVAALTLGLALSVGLTGINVAVSALSHQRLTSLIHVLEQDQORLITAINQTHYNLLNV 360
361 ASVVAQNRRLDGLDWLYIRLGFQSLCPTINEPCCFLRIQNDSIIRLGDLPQPLSQRVSTDW 418

```

FLK-BLV Env precursor 33-437mut

```

-----33 TWRC SLSLGNQQWMTAYNQEAKFSISID 60
61  QILEAHNQSPFCAKSPRYTLDSVNGYPKIYWPPPQGRRRFGARAMVTYDCEPRCPYVGAD 120
121 RFDCPHWDNASQADQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIWGYDPLITFSLHKIPDPP 180
181 QPDFPQLNSDWVPSVRSWALLLNQTARAFPDCAICWEPSPPWAPEILVYNKTISSSGPGL 240
241 ALPDAQIFWVNTSSFNTTQGWHHPSQRLLFNVSQGNALLPPIISLVNLSTASSAPPTRVN 300
301 NSPVAALTLGLALSVGLTGINVAVSALSHQRLTSLIHVLEQDQORLITAINQTHYNLLNV 360
361 ASVVAQNRRLDGLDWLYIRLGFQSLCPTINEPCCFLRIQNDSIIRLGDLPQPLSQRVSTDWQW 420
421 PWNWDLGLTAWVRETIH 437

```

FLK-BLV Env precursor 33-418mut

-----33 TWRCSLSLGNQOWMTAYNQEAKFSISID 60
61 QILEAHNQSPFCAKSPRYTLDSVNGYPKIYWPPQGRRRFGARAMVTYDCEPRCPYVGAD 120
121 RFDCPHWDNASQADQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEIWGYDPLITFSLHKIPDPP 180
181 QPDFPQLNSDWVPSVRSWALLLNQTARAFPDCAICWEPSPPWAPEILVYNKTISSSGPGL 240
241 ALPDAQIFWVNTSSFNTTQGWHHPSQRLLEFNVSQGNALLPPI SLVNLSTASSAPPTRVN 300
301 NSPVAALTLGLALSVGLTGINVAVSALSHQRLTSLIHVLEQDQORLITAINQTHYNLLNV 360
361 ASVVAQNRRGLDWLYIRLGFQSLCPTINEPCCFLRIQNSIIRLGLDQPLSQRVSTDW 418

Leyenda de colores- verde: pépido señal; negro&negrita:gp51; negro: ectodominio de gp30; rojo: sitio de procesamiento proteolítico; violeta: nucleótidos modificados por mutagénesis sitio dirigida.

Apéndice 2- Secuencia del gen env salvaje completa (cepa FLK-BLV) se resalta en verde el péptido señal y en amarillo la región TM + CTD

ATGCCTAAAAACGACGGTCCCGAAGACGCCACAACCGATCATCAGATGGGTAAGTCTCACTCTCACTC
TCCTCGCTCTCTGTGCGCCCATCCAGACTTGGAGATGCTCCCTGTCCCTAGGAAACCAACAATGGATGAC
AGCATATAACCAAGAGGCCAAAATTTTCCATCTCCATTGACCAAATACTAGAGGCTCATAATCAGTCACCT
TTCTGTGCCAAGTCTCCCAGATACACCTTGGACTCTGTAAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGCCCCC
CACAAGGGCGCGCCGGTTTGGAGCCAGGGCCATGGTCACATATGATTGCGAGCCCCGATGCCCTTATGT
GGGGCAGATCGCTTCGACTGCCCCACTGGGACAATGCCTCCAGGCCGATCAAGGATCCTTTTATGTC
AATCATCAGATTTTATTCCTGCATCTTAAACAATGTCAATGGAATTTTCACTCTAACCTGGGAGATATGGG
GATATGATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAGATCCCTGATCCCCCTCAACCCGACTTTCCCCAGTT
GAACAGTGAAGTGGGTTCCCTCTGTGAGATCATGGGCCCTGCTTTTAAACCAAACAGCACGGGCCTTCCA
GACTGTGCTATATGTTGGGAACCTTCCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAATATTAGTATATAACAAAACCATCT
CCAGCTCTGGACCCGGCCTCGCCCTCCCGGACGCCAAAATCTTCTGGGTCAACACGTCCTCGTTTAAAC
CACCCAAGGATGGCACCACCCTTCCCAGAGGTTGTTGTCAATGTTTCTCAAGGCAACGCCTTGTATT
CCTCCTATCTCCCTGGTTAATCTCTCTACGGCTTCCCTCCGCCCTCCTACCCGGGTGAGACGTAGTCCCG
TCGAGCCCTGACCTTAGGCCTAGCCCTGTCAGTGGGGCTCACTGGAATTAATGTGGCCGTGTCTGCCCT
TAGCCATCAGAGACTCACCTCCCTGATCCACGTTCTGGAGCAAGATCAGCAACGCTTGATCACAGCAATT
AACCAGACCCACTATAATTTGCTTAATGTGGCCTCTGTGGTTGCCAGAACCAGCGGGGGCTTGATTGGT
TGTACATCCGGCTGGGTTTTCAAAGCCTATGTCCACAATTAATGAGCCTTGCTGTTTCTGCGCATTCA
AAATGACTCCATTATCCGCTCGGTGATCTCCAGCCTCTCTCGCAAAGAGTCTCTACAGACTGGCAGTGG
CCCTGGAATTTGGATCTGGGGCTCACTGCCTGGGTGCGAGAAACCATTTCAT TCTGTTCTAAGCCTGTTCC
TATTAGCCCTTTTTTGTCTTCCCTGGCCCCCTGCCTGATAAAATGCTTGACCTCTCGCCTTTTAAAGCT
CCTCCGGCAGGCTCCCCACTTCCCTGAAATCTCCTTAACCCCTAAACCCGATTCTGATTATCAGGCCCTG
CTACCATCTGCACCAGAGATCTACTCTCACCTCTCCCCGTCAAACCCGATTACATCAACCTCCGACCT
GCCCTTGA

Apéndice 3- Secuencia del gen env salvaje (cepa FLK-BLV) luego de la optimización de codones realizada por la empresa Genscript (desde el aa 33 al 437)

ACGTGGCGCTGCTCGCTGTCGCTGGGAAATCAGCAGTGGATGACCGCCTACAACCAGGAGGCCAAGTTCA
GTATTAGTATTGACCAGATCCTGGAGGCCACAACCAGAGTCCGTTCTGCGCCAAGAGCCCACGCTACAC
CCTGGATTCCGGTGAATGGCTACCCCAAGATTTATTGGCCACCACAGGGACGCCGCCGCTTCGGAGCC
CGCGCCATGGTGACGTACGACTGCGAGCCACGCTGCCCATATGTGGGAGCCGATCGCTTTGACTGCCAC

3C- Mutagénesis sitio dirigida por RF clonng de las construcciones pT350/Env FLK-BLV 33-437wt y pT350/Env FLK-BLV 33-418wt para quitar el sitio de procesamiento proteolítico.

Se utilizó un único primer forward para introducir 2 mutaciones puntuales en ambas construcciones wt:

pT350 envopt mutNN FOR

5´-tcggccccaccaacgcgcgtg**aataat**tcccccggtggccgcacctgacactgggcctgg-3´

Este primer fue empleado con pT350 envopt REV (33-437) o con pT350 envopt REV (33-418) para las construcciones pT350/Env FLK-BLV 33-437wt o pT350/Env FLK-BLV 33-418wt, respectivamente.

Apéndice 5- SECUENCIAS

pT350 Env FLK-BLV 33-437wt

Alignment: C:\Documents and Settings\ltome\Escritorio\gp51\expresion Drosophila\secuencias\lore

	5	15	25	35	45	55
3-env15.12	-----	-----	-----	----- ATG	AAGTTATGCA	TATTACTGGC
5-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350env o	catctcagtg	caactaaagg	ggggatccga	tctcaatatg	aagttatgca	tattactggc

	65	75	85	95	105	115
3-env15.12	CGTCGTGGCC	TTTGTGGCC	TCTCGCTCGG	GAGATCTACG	TGGCGCTGCT	CGCTGTCGCT
5-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350env o	cgctcgtggcc	tttggtggcc	tctcgcctcg	gagatctacg	tggcgcctgct	cgctgctcgt

	125	135	145	155	165	175
3-env15.12	GGGAAATCAG	CAGTGGATGA	CCGCCTACAA	CCAGGAGGCC	AAGTTCAGTA	TTAGTATTGA
5-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350env o	gggaaatcag	cagtggatga	ccgcctacaa	ccaggaggcc	aagttcagta	ttagtattga

	185	195	205	215	225	235
3-env15.12	CCAGATCCTG	GAGGCCACAC	ACCAGAGTCC	GTTCTGCGCC	AAGAGCCCAC	GCTACACCTT
5-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350env o	ccagatcctg	gaggcccaca	accagagtcc	gttctgcgcc	aagagcccac	gctacacctt

	245	255	265	275	285	295
3-env15.12	GGATTTCGGTG	AATGGCTACC	CCAAGATTTA	TTGGCCACCA	CCACAGGGAC	GCCGCCGCTT
5-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350env o	ggatttcggtg	aatggctacc	ccaagattta	ttggccacca	ccacagggac	gccgccgctt

	305	315	325	335	345	355
3-env15.12	CGGAGCCCGC	GCCATGGTGA	CGTACGACTG	CGAGCCACGC	TGCCCATATG	TGGGAGCCGA
5-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350env o	cggagcccgc	gccatggtga	cgtacgactg	cgagccacgc	tgcccatatg	tgggagccga

	365	375	385	395	405	415
3-env15.12	TCGCTTTGAC	TGCCCACACT	GGGATAACGC	CTCCAGGCC	GACCAGGGAT	CGTTCTACGT
5-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350env o	tcgctttgac	tgcccacact	gggataacgc	ctccagggcc	gaccagggat	cgttctacgt

	425	435	445	455	465	475
3-env15.12	GAATCATCAG	ATCCTGTTTC	TGCACCTGAA	GCAGTGCCAT	GGCATCTTCA	CACTGACCTG
5-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350env o	gaatcatcag	atcctgtttc	tgcacctgaa	gcagtgccat	ggcatcttca	cactgacctg

	485	495	505	515	525	535
3-env15.12	GGAGATTGG	GGATATGATC	CACTGATCAC	CTTCAGTCTG	CATAAGATTC	CCGATCCCC
5-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350env o	ggagatttgg	ggatatgatc	cactgatcac	cttcagtctg	cataagattc	ccgatcccc

	545	555	565	575	585	595
3-env15.12	GCAGCCGGAC	TTTCCACAGC	TGAACAGCGA	TTGGGTGCCA	AGTGTGCGCA	GCTGGGCTCT
5-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350env o	gcagccggac	tttccacagc	tgaacagcga	ttgggtgcc	agtgtgcgca	gctgggctct

	605	615	625	635	645	655
3-env15.12	GCTGCTGAAT	CAGACCGCCC	GCGCCTTTC	AGACTGCGCC	ATCTGCTGGG	AGCCAAGCCC
5-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350env o	gctgctgaat	cagaccgccc	gcgctttcc	agactgcgcc	atctgctggg	agccaagccc

	665	675	685	695	705	715
3-env15.12	ACCATGGGCT	CCCGAGATCC	TGGTGTACAA	CAAGACGATT	AGCTCCAGCG	GCCCCGGACT
5-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350env o	accatgggct	cccgagatcc	tgggtgtacaa	caagacgatt	agctccagcg	gccccggact

	725	735	745	755	765	775
3-env15.12	GGCCCTGCCA	GACGCCCAGA	TTTTCTGGGT	GAACACAAGT	AGCTTTAATA	CCACGCAGGG
5-env15.12	-----CCA	GACGCCCAGA	TTTTCTGGGT	GAACACAAGT	AGCTTTAATA	CCACGCAGGG
pT350env o	ggccctgcc	gacgcccaga	tttctgggt	gaacacaagt	agctttaata	ccacgcaggg

	785	795	805	815	825	835
3-env15.12	CTGGCACCAT	CCAAGTCAGC	GCCTG.....
5-env15.12	CTGGCACCAT	CCAAGTCAGC	GCCTGCTGTT	CAACGTGAGC	CAGGGAAATG	CCCTGCTGCT
pT350env o	ctggcaccat	ccaagtcagc	gcctgctgtt	caacgtgagc	cagggaaatg	ccctgctgct

	845	855	865	875	885	895
3-env15.12
5-env15.12	GCCGCCAATC	TCCCTGGTGA	ACCTGTGCGAC	CGCCTCCTCG	GCCCCACCAA	CGCGCGTGCG
pT350env o	gccgccaatc	tccttgggtga	acctgtcgac	cgctcctcg	gccccaccaa	cgcgcgtgcg

	905	915	925	935	945	955
3-env15.12
5-env15.12	CCGCTCCCC	GTGGCCGCC	TGACACTGGG	CCTGGCCCTG	TCGGTGGGCC	TGACCGGAAT
pT350env o	ccgctcccc	gtggccgcc	tgacactggg	cctggccctg	tcggtgggcc	tgaccggaat

	965	975	985	995	1005	1015
3-env15.12
5-env15.12	CAATGTGGCC	GTGTCCGCC	TGTGCGACCA	GCGCCTGACC	AGCCTGATTC	ATGTGCTGGA
pT350env o	caatgtggcc	gtgtccgcc	tgtgcgacca	gcgctgacc	agcctgattc	atgtgctgga

	1025	1035	1045	1055	1065	1075
3-env15.12
5-env15.12	GCAGGATCAG	CAGCGCTGA	TCACGGCCAT	TAACCAGACA	CACTACAACC	TGCTGAATGT
pT350env o	gcaggatcag	cagcgctga	tcacggccat	taaccagaca	cactacaacc	tgctgaatgt

	1085	1095	1105	1115	1125	1135
3-env15.12
5-env15.12	GGCCTCCGTG	GTGGCCCAGA	ATCGCCCGG	ACTGGACTGG	CTGTATATCC	GCCTGGGATT
pT350env o	ggcctccgtg	gtggcccaga	atcgcccg	actggactgg	ctgtatatcc	gcctgggatt

	1145	1155	1165	1175	1185	1195
3-env15.12
5-env15.12	CCAGTCCCTG	TGCCCAACAA	TCAACGAGCC	CTGCTGCTTT	CTGCGCATTC	AGAATGATTC
pT350env o	ccagtcctg	tgcccaaca	tcaacgagcc	ctgctgcttt	ctgcgcattc	agaatgattc

	1205	1215	1225	1235	1245	1255
3-env15.12
5-env15.12	GATCATTCGC	CTGGGCGACC	TGCAGCCACT	GAGTCAGCGC	GTGAGCACGG	ATTGGCAGTG
pT350env o	gatcattcgc	ctgggcgacc	tgcagccact	gagtcagcgc	gtgagcacgg	attggcagtg

	1265	1275	1285	1295	1305	1315
3-env15.12
5-env15.12	GCCGTGGAAC	TGGGACCTGG	GACTGACAGC	CTGGGTGCGC	GAGACCATTC	ATGGGCCCTT
pT350env o	gccgtggaac	tgggacctgg	gactgacagc	ctgggtgcmc	gagaccattc	atgggccctt

	1325	1335	1345	1355	1365	1375
3-env15.12
5-env15.12	CGAAGACGAT	GACGATAAGG	CCGGTTGGAG	TCATCCACAA	TTCGAGAAGG	GCGGCGGCTC
pT350env o	cgaagacgat	gacgataagg	cgggttgag	tcatccacaa	ttcgagaagg	gcggcggctc

	1385	1395	1405	1415	1425	1435
3-env15.12
5-env15.12	CGGAGGTGGA	TCAGGAGGTG	GTTCC TGGTC	ACACCCTCAA	TTCGAGAA
pT350env o	cggaggtgga	tcaggaggtg	gttcttggtc	acaccctcaa	ttcgagaagt	gagtttaaac

	1445	1455	1465	1475	1485	1495
3-env15.12
5-env15.12
pT350env o	ccgctgatca	gcctcgactg	tgccttctaa	ggcctgagct	cgctgatcag	cctcgatcga
		
	1505	1515	1525	1535		
3-env15.12		
5-env15.12		
pT350env o	ggatccagac	atgataagat	acattgatga	gtttggga		

Código de colores: rojo-codón de inicio de la secuencia BiP; verde- sitio de restricción BglII; rosado-1^{er} codón Env (secuencia optimizada); violeta- sitio de restricción ApaI; celeste-sitio de corte con enteroquinasa; marrón-strep-tag (x2)

pT350 Env FLK-BLV 33-437mut

Alignment: C:\DocumentsandSettings\ltome\Escritorio\gp51\expresionDrosophila\secuencias\33-437mut

	5	15	25	35	45	55
pT350env o	catctcagtg	caactaaagg	ggggatccga	tctcaatatg	aagttagtca	tattactggc
2-Env21.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1-Env21.12	-----	-----	-----	---CAAT ATG	AAGTTATGCA	TATTACTGGC

	65	75	85	95	105	115
pT350env o	cgctcgtggc	tttggtggcc	tctcgcctcg	gagatctacg	tggcgcctgct	cgctgctcgt
2-Env21.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1-Env21.12	CGTCGTGGCC	TTTGTGGCC	TCTCGCTCGG	GAGATCTACG	TGGCCTGCT	CGCTGTCGCT

	125	135	145	155	165	175
pT350env o	gggaaatcag	cagtggatga	ccgcctacaa	ccaggaggcc	aagttcagta	ttagtattga
2-Env21.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1-Env21.12	GGGAAATCAG	CAGTGGATGA	CCGCCTACAA	CCAGGAGGCC	AAGTTCAGTA	TTAGTATTGA

	185	195	205	215	225	235
pT350env o	ccagatcctg	gaggcccaca	accagagtcc	gttctgcgcc	aagagcccac	gctacacccct
2-Env21.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1-Env21.12	CCAGATCCTG	GAGGCCACAA	ACCAGAGTCC	GTTCTGCGCC	AAGAGCCCAC	GCTACACCCT

	245	255	265	275	285	295
pT350env o	ggattcggtg	aatggctacc	ccaagattta	ttggccacca	ccacagggac	gccgcccgtt
2-Env21.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1-Env21.12	GGATTCGGTG	AATGGCTACC	CCAAGATTTA	TTGGCCACCA	CCACAGGGAC	GCCGCCGCTT

	305	315	325	335	345	355
pT350env o	cggagcccgc	gccatggtga	cgtacgactg	cgagccacgc	tgcccatatg	tgggagccga
2-Env21.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1-Env21.12	CGGAGCCCGC	GCCATGGTGA	CGTACGACTG	CGAGCCACGC	TGCCCATATG	TGGGAGCCGA

	365	375	385	395	405	415
pT350env o	tcgctttgac	tgcccacact	gggataacgc	ctcccaggcc	gaccagggat	cgttctacgt
2-Env21.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1-Env21.12	TCGCTTTGAC	TGCCCACACT	GGGATAACGC	CTCCAGGCC	GACCAGGGAT	CGTCTACGT

	425	435	445	455	465	475
pT350env o	gaatcatcag	atcctgtttc	tgcacctgaa	gcagtgccat	ggcatcttca	cactgacctg
2-Env21.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1-Env21.12	GAATCATCAG	ATCCTGTTC	TGCACCTGAA	GCAGTGCCAT	GGCATCTTCA	CACTGACCTG

	485	495	505	515	525	535
pT350env o	ggagatttgg	ggatatgata	cactgatcac	cttcagtctg	cataagattc	ccgatcccc
2-Env21.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1-Env21.12	GGAGATTTGG	GGATATGATC	CACTGATCAC	CTTCAGTCTG	CATAAGATTC	CCGATCCCC

	545	555	565	575	585	595
pT350env o	gcagccggac	tttccacagc	tgaacagcga	ttgggtgcca	agtgtgcgca	gctgggctct
2-Env21.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1-Env21.12	GCAGCCGGAC	TTTCCACAGC	TGAACAGCGA	TTGGGTGCCA	AGTGTGCGCA	GCTGGGCTCT

	605	615	625	635	645	655
pT350env o	gctgtgtaat	cagaccgccc	gcgcctttcc	agactgcgcc	atctgctggg	agccaagccc
2-Env21.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1-Env21.12	GCTGTGTAAT	CAGACCGCCC	GCGCCTTTCC	AGACTGCGCC	ATCTGCTGGG	AGCCAAGCCC

	665	675	685	695	705	715
pT350env o	accatgggct	cccagatcc	tggtgtacaa	caagacgatt	agctccagcg	gccccggact
2-Env21.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
1-Env21.12	ACCATGGGCT	CCCAGATCC	TGGTGTACAA	CAAGACGATT	AGCTCCAGCG	GCCCCGGACT

	725	735	745	755	765	775
pT350env o	ggccctgcca	gacgcccaga	ttttctgggt	gaacacaagt	agctttaata	ccacgcaggg
2-Env21.12	-----CA	GACGCCCAGA	TTTTCTGGGT	GAACACAAGT	AGCTTTAATA	CCACGCAGGG
1-Env21.12	GGCCCTGCCA	G.....

	785	795	805	815	825	835
pT350env o	ctggcaccat	ccaagtcagc	gcctgctggt	caactgagc	cagggaaatg	ccctgctgct
2-Env21.12	CTGGCACCAT	CCAAGTCAGC	GCCTGCTGTT	CAACGTGAGC	CAGGGAAATG	CCCTGCTGCT
1-Env21.12

	845	855	865	875	885	895
pT350env o	gccgccaatc	tccctggtga	acctgtcgac	cgccctctcg	gccccaccaa	cgcgctgcg
2-Env21.12	GCCGCCAATC	TCCCTGGTGA	ACCTGTGAC	CGCCTCCTCG	GCCCCACCAA	CGCGCTGTA
1-Env21.12

	905	915	925	935	945	955
pT350env o	ccgctcccc	gtggccgcc	tgacactggg	cctggccctg	tcggtgggccc	tgaccggaat
2-Env21.12	TAAT TCCCCC	GTGGCCGCCC	TGACTCTGGG	CCTGGCCCTG	TCGGTGGGCC	TGACCGBAAT
1-Env21.12

	965	975	985	995	1005	1015
pT350env o	caatgtggcc	gtgtccgcc	tgctgcacca	gcgctgacc	agcctgattc	atgtgctgga
2-Env21.12	CAATGTGGCC	GTGTCCGCCC	TGTCGCACCA	GCGCCTGACC	AGCCTGATTC	ATGTGCTGGA
1-Env21.12

	1025	1035	1045	1055	1065	1075
pT350env o	gcaggatcag	cagcgctga	tcacggccat	taaccagaca	cactacaacc	tgctgaatgt
2-Env21.12	GCAGGATCAG	CAGCGCTGA	TCACGCCAT	TAACCAGACA	CACTACAACC	TGCTGAATGT
1-Env21.12

	1085	1095	1105	1115	1125	1135
pT350env o	ggcctccgtg	gtggcccaga	atcgccgagg	actggactgg	ctgtatatcc	gcctgggatt
2-Env21.12	GGCCTCCGTG	GTGGCCAGCA	ATCGCCGAGG	ACTGGACTGG	CTGTATATCC	GCCTGGGATT
1-Env21.12

	1145	1155	1165	1175	1185	1195
pT350env o	ccagtccctg	tgcccaacaa	tcaacgagcc	ctgctgcttt	ctgcgattc	agaatgattc
2-Env21.12	CCAGTCCCTG	TGCCCAACAA	TCAACGAGCC	CTGCTGCTTT	CTGCGCATTC	AGAATGATTC
1-Env21.12

	1205	1215	1225	1235	1245	1255
pT350env o	gateattcgc	ctgggagacc	tgcagccact	gagtcagcgc	gtgagcacgg	attggcagtg
2-Env21.12	GATCATTCGC	CTGGGAGACC	TGCAGCCACT	GAGTCAGCGC	GTGAGCACGG	ATTGGCAGTG
1-Env21.12

	1265	1275	1285	1295	1305	1315
pT350env o	gccgtggaac	tgggacctgg	gactgacagc	ctgggtgagc	gagaccattc	atgggcccctt
2-Env21.12	GCCGTGGAAC	TGGGACCTGG	GACTGACAGC	CTGGGTGAGC	GAGACCATTC	ATGGGCCCTT
1-Env21.12

	1325	1335	1345	1355	1365	1375
pT350env o	cgaagacgat	gacgataagg	ccggttggag	tcattccaaa	ttcgagaagg	gcgccggctc
2-Env21.12	CGAAGACGAT	GACGATAAGG	CCGGTGGAG	TCATCCAAA	TTCGAGAAGG	GCGCCGGCTC
1-Env21.12

	1385	1395	1405	1415	1425	1435
pT350env o	cggaggtgga	tcaggaggtg	gttcttggtc	acaccctcaa	ttcgagaagt	gagtttaaac
2-Env21.12	CGGAGGTGGA	TCAGGAGGTG	GTTCTTGGTC	ACACCCTCAA	TTCGAGAAGT	GAGTTTAAAC
1-Env21.12

	1445	1455	1465	1475	1485	1495
pT350env o	ccgctgatca	gcctcgactg	tgccttctaa	ggcctgagct	cgctgatcag	cctcgatcga
2-Env21.12
1-Env21.12
		
	1505	1515	1525	1535		
pT350env o	ggatccagac	atgataagat	acattgatga	gtttggg		
2-Env21.12		
1-Env21.12		

Código de colores: rojo-codón de inicio de la secuencia BiP; verde- sitio de restricción BglII; rosado-1^{er} codón Env (secuencia optimizada); violeta- sitio de restricción ApaI; celeste-sitio de corte con enteroquinasa; marrón-strep-tag (x2); naranja- mutaciones simples R300N y R301N; amarillo-codón stop.

pT350 Env FLK-BLV 33-418wt

Alignment: C:\Documents and Settings\ltome\Escritorio\gp51\expresion Drosophila\secuencias\lore

	5	15	25	35	45	55
4-env15.12	-----	--ATGAAGTT	ATGCATATTA	CTGGCCGTCG	TGGCCTTTGT	TGGCCTCTCG
6-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350 env0	tccgatctca	atatgaagtt	atgcatatta	ctggccgtcg	tggcctttgt	tggcctctcg

	65	75	85	95	105	115
4-env15.12	CTCGGGAGAT	CTACCTGGCG	CTGCTCGCTG	TCGCTGGGAA	ATCAGCAGTG	GATGACCGCC
6-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350 env0	ctcgggagat	ctacgtggcg	ctgctcgctg	tcgctgggaa	atcagcagtg	gatgaccgcc

	125	135	145	155	165	175
4-env15.12	TACAACCAGG	AGGCCAAGTT	CAGTATTAGT	ATTGACCAGA	TCCTGGAGGC	CCACAACCAG
6-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350 env0	tacaaccagg	aggccaagtt	cagtattagt	attgaccaga	tcctggaggc	ccacaaccag

	185	195	205	215	225	235
4-env15.12	AGTCCGTTCT	GCGCCAAGAG	CCCACGCTAC	ACCCTGGATT	CGGTGAATGG	CTACCCAAG
6-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350 env0	agtccgttct	gcgccaagag	cccacgctac	accctggatt	cggtgaatgg	ctacccaag

	245	255	265	275	285	295
4-env15.12	ATTTATTGGC	CACCACCACA	GGGACGCCGC	CGCTTCGGAG	CCCGCGCCAT	GGTGACGTAC
6-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350 env0	atttattggc	caccaccaca	gggacgccgc	cgcttcggag	cccgcgccat	ggtgacgtac

	305	315	325	335	345	355
4-env15.12	GACTGCGAGC	CACGCTGCCC	ATATGTGGGA	GCCGATCGCT	TTGACTGCCC	ACACTGGGAT
6-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350 env0	gactgcgagc	cacgctgccc	atatgtggga	gccgatcgct	ttgactgccc	acactgggat

	365	375	385	395	405	415
4-env15.12	AACGCCTCCC	AGGCCGACCA	GGGATCGTTC	TACGTGAATC	ATCAGATCCT	GTTTCTGCAC
6-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350 env0	aacgcctccc	aggccgacca	gggatcgttc	tacgtgaatc	atcagatcct	gtttctgcac

	425	435	445	455	465	475
4-env15.12	CTGAAGCAGT	GCCATGGCAT	CTTCACACTG	ACCTGGGAGA	TTTGGGGATA	TGATCCACTG
6-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350 env0	ctgaagcagt	gccatggcat	cttcacactg	acctgggaga	tttggggata	tgatccactg

	485	495	505	515	525	535
4-env15.12	ATCACCTTCA	GTCTGCATAA	GATTCCCGAT	CCCCCGCAGC	CGGACTTTCC	ACAGCTGAAC
6-env15.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pT350 env0	atcaccttca	gtctgcataa	gattcccgat	cccccgcagc	cggactttcc	acagctgaac

	545	555	565	575	585	595
4-env15.12	AGCGATTGGG	TGCCAAGTGT	GCGCAGCTGG	GCTCTGCTGC	TGAATCAGAC	CGCCCgcgcc
6-env15.12	AGCGATTGGG	TGCCAAGTGT	GCGCAGCTGG	GCTCTGCTGC	TGAATCAGAC	CGCCCgcgcc
pT350 env0	agcgattggg	tgccaagtgt	gcgcagctgg	gctctgctgc	tgaatcagac	cgcccgcgcc

	605	615	625	635	645	655
4-env15.12	TTTCCAGACT	GCGCCATCTG	CTGGGAGCCA	AGCCCACCAT	GGGCTCCCGA	GATCCTGGTG

6-env15.12	TTTCCAGACT	GCGCCATCTG	CTGGGAGCCA	AGCCCACCAT	GGGCTCCCGA	GATCCTGGTG
pT350 env0	tttccagact	gcgccatctg	ctgggagcca	agcccaccat	gggctcccga	gatcctggtg

	665	675	685	695	705	715
4-env15.12	TACAACAAGA	CGATTAGCTC	CAGCGGCCCC	GGACTGGCCC	TGCCAGACGC	CCAGATTTTC
6-env15.12	TACAACAAGA	CGATTAGCTC	CAGCGGCCCC	GGACTGGCCC	TGCCAGACGC	CCAGATTTTC
pT350 env0	tacaacaaga	cgattagctc	cagcgcccc	ggactggccc	tgccagacgc	ccagattttc

	725	735	745	755	765	775
4-env15.12	TGGGTGAACA	CAAGTAGCTT	TAATACCACG	CAGGGCTGGC	ACCATCCAAG	TCAGCGCCTG
6-env15.12	TGGGTGAACA	CAAGTAGCTT	TAATACCACG	CAGGGCTGGC	ACCATCCAAG	TCAGCGCCTG
pT350 env0	tgggtgaaca	caagtagctt	taataccacg	cagggctggc	accatccaag	tcagcgctg

	785	795	805	815	825	835
4-env15.12	CTG.....
6-env15.12	CTGTTCAACG	TGAGCCAGGG	AAATGCCTG	CTGCTGCCGC	CAATCTCCCT	GGTGAACTG
pT350 env0	ctgttcaacg	tgagccaggg	aaatgcctg	ctgctgccgc	caatctccct	ggtgaacctg

	845	855	865	875	885	895
4-env15.12
6-env15.12	TCGACCGCCT	CCTCGGCCCC	ACCAACGCGC	GTGCGCCGCT	CCCCGTGGC	CGCCCTGACA
pT350 env0	tcgaccgcct	cctcggcccc	accaacgcgc	gtgcgcccgt	ccccgtggc	cgccctgaca

	905	915	925	935	945	955
4-env15.12
6-env15.12	CTGGGCCTGG	CCCTGTGCGT	GGGCCTGACC	GGAATCAATG	TGGCCGTGTC	CGCCCTGTGCG
pT350 env0	ctgggcctgg	ccctgtcgg	gggcctgacc	ggaatcaatg	tggccgtgtc	cgccctgtc

	965	975	985	995	1005	1015
4-env15.12
6-env15.12	CACCAGCGCC	TGACCAGCCT	GATTCATGTG	CTGGAGCAGG	ATCAGCAGCG	CCTGATCACG
pT350 env0	caccagcgcc	tgaccagcct	gattcatgtg	ctggagcagg	atcagcagcg	cctgatcacg

	1025	1035	1045	1055	1065	1075
4-env15.12
6-env15.12	GCCATTAACC	AGACACACTA	CAACCTGCTG	AATGTGGCCT	CCGTGGTGGC	CCAGAATCGC
pT350 env0	gccattaacc	agacacacta	caacctgctg	aatgtggcct	ccgtggtggc	ccagaatcgc

	1085	1095	1105	1115	1125	1135
4-env15.12
6-env15.12	CGCGGACTGG	ACTGGCTGTA	TATCCGCTG	GGATTCCAGT	CCCTGTGCC	AACAATCAAC
pT350 env0	cgcggaactg	actggctgta	tatccgcctg	ggattccagt	ccctgtgcc	aacaatcaac

	1145	1155	1165	1175	1185	1195
4-env15.12
6-env15.12	GAGCCCTGCT	GCTTTCTGCG	CATTCAAGAA	GATTTCGATCA	TTCGCTGGG	CGACCTGCAG
pT350 env0	gagccctgct	gctttctgcg	cattcagaat	gatttcgatca	ttcgctggg	cgacctgcag

	1205	1215	1225	1235	1245	1255
4-env15.12
6-env15.12	CCACTGAGTC	AGCGCGTGAG	CACGGATTGG	GGGCCCTTCG	AAGACGATGA	CGATAAGGCC
pT350 env0	ccactgagtc	agcgcgtgag	cacggattgg	gggcccttcg	aagacgatga	cgataaggcc

	1265	1275	1285	1295	1305	1315
4-env15.12
6-env15.12	GGT TGGAGTC	ATCCACAATT	CGAGAAG GGC	GGCGGCTCCG	GAGGTGGATC	AGGAGGTGGT
pT350 env0	ggttggagtc	atccacaatt	cgagaagggc	ggcggctccg	gaggtggatc	aggaggtggt

	1325	1335	1345	1355	1365	

```

4-env15.12 .....
6-env15.12 TCCTTGGTCAC ACCCTCAATT CGAGAAGTGA GT.....
pT350 envo tcctggtcac accctcaatt cgagaagtga gtttaaacc gctgatcag

```

Código de colores: rojo-codón de inicio de la secuencia BiP; verde- sitio de restricción BgIII; rosado-1^{er} codón Env (secuencia optimizada); violeta- sitio de restricción ApaI; celeste-sitio de corte con enteroquinasa; marrón-strep-tag (x2); amarillo-codón stop.

pT350 Env FLK-BLV 33-418mut

Alignment: C:\Documents and Settings\ltome\Escritorio\gp51\expresion Drosophila\33-418mut

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5      15      25      35      45      55
pT350 envo ----- tccga tctcaatatg aagttatgca tattactggc
3-Env21.12 ----- -CTCAATATG AAGTTATGCA TATTACTGGC
4-Env21.12 -----

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      65      75      85      95      105     115
pT350 envo cgctcgtggcc tttgttggcc tctcgcctcgg gagatctacg tggcgcgtgct cgctgctcgct
3-Env21.12 CGTCGTGGCC TTTGTTGGCC TCTCGCTCGG GAGATCTACG TGGCGCTGCT CGCTGTGCGT
4-Env21.12 -----

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      125     135     145     155     165     175
pT350 envo gggaaatcag cagtggatga cgcctacaa ccaggaggcc aagttcagta ttagtattga
3-Env21.12 GGGAAATCAG CAGTGGATGA CCGCCTACAA CCAGGAGGCC AAGTTCAGTA TTAGTATTGA
4-Env21.12 -----

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      185     195     205     215     225     235
pT350 envo ccagatcctg gaggcccaca accagagtcc gttctgcgcc aagagcccac gctacaccct
3-Env21.12 CCAGATCCTG GAGGCCCACA ACCAGAGTCC GTTCTGCGCC AAGAGCCCAC GCTACACCCT
4-Env21.12 -----

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      245     255     265     275     285     295
pT350 envo ggattcgggtg aatggctacc ccaagattta ttggccacca ccacagggac gccgcggctt
3-Env21.12 GGATTCGGGTG AATGGCTACC CCAAGATTTA TTGGCCACCA CCACAGGGAC GCCGCCGCTT
4-Env21.12 -----

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      305     315     325     335     345     355
pT350 envo cggagcccgc gccatggtga cgtacgactg cgagccacgc tgcccatatg tgggagccga
3-Env21.12 CGGAGCCCGC GCCATGGTGA CGTACGACTG CGAGCCACGC TGCCCATATG TGGGAGCCGA
4-Env21.12 -----

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      365     375     385     395     405     415
pT350 envo tcgctttgac tgcccacact gggataacgc ctcccaggcc gaccagggat cgttctacgt
3-Env21.12 TCGCTTTGAC TGCCCACACT GGGATAACGC CTCCCAGGCC GACCAGGGAT CGTTCACGT
4-Env21.12 -----

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      425     435     445     455     465     475
pT350 envo gaatcatcag atcctgtttc tgcacctgaa gcagtgccat ggcatttca cactgacctg
3-Env21.12 GAATCATCAG ATCCTGT TTC TGCACCTGAA GCAGTGCCAT GGCATCTTCA CACTGACCTG
4-Env21.12 -----

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      485     495     505     515     525     535
pT350 envo ggagatttgg ggatatgatc cactgatcac cttcagtctg cataagattc cccgatcccc
3-Env21.12 GGAGATTTGG GGATATGATC CACTGATCAC CTTCAGTCTG CATAAGATTC CCGATCCCC
4-Env21.12 -----

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|

```

	545	555	565	575	585	595
pT350 env0	gcagccggac	tttccacagc	tgaacagcga	ttgggtgcca	agtgtgcgca	gctgggctct
3-Env21.12	GCAGCCGGAC	TTTCCACAGC	TGANCAGCGA	TTGGGTGCCA	AGTGTGCGCA	GCTGGGCTCT
4-Env21.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	605	615	625	635	645	655
pT350 env0	gctgctgaat	cagaccgccc	gcgctttcc	agactgcgcc	atctgctggg	agccaagccc
3-Env21.12	GCTGCTGAAT	CAGACCGCCC	GCGCTTTCC	AGACTGCGCC	ATCTGCTGGG	AGCCAAGCCC
4-Env21.12	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	665	675	685	695	705	715
pT350 env0	accatgggct	cccagatacc	tggtgtacaa	caagacgatt	agctccagcg	gccccggact
3-Env21.12	ACCATGGGCT	CCCAGATACC	TGGTGTACAA	CAAGACGATT	AGCTCCAGCG	GCCCCGGACT
4-Env21.12	-----	-----	-----	-----	-----G	GCCCCGGACT

	725	735	745	755	765	775
pT350 env0	ggcctgcca	gacgccaga	ttttctgggt	gaacacaagt	agctttaata	ccacgcaggg
3-Env21.12	GGCC.....
4-Env21.12	GGCCCTGCCA	GACGCCCAGA	TTTTCTGGGT	GAACACAAGT	AGCTTTAATA	CCACGCAGGG

	785	795	805	815	825	835
pT350 env0	ctggcaccat	ccaagtcagc	gcctgctggt	caactgagc	cagggaaatg	ccctgctgct
3-Env21.12
4-Env21.12	CTGGCACCAT	CCAAGTCAGC	GCCTGCTGTT	CAACGTGAGC	CAGGGAAATG	CCCTGCTGCT

	845	855	865	875	885	895
pT350 env0	gccgccaatc	tccctggtga	acctgtcgac	cgctctctcg	gccccaccaa	cgcgctgcg
3-Env21.12
4-Env21.12	GCCGCAATC	TCCCTGGTGA	ACCTGTGCAC	CGCTCCTCG	GCCCCACCAA	CGCGCTGAA

	905	915	925	935	945	955
pT350 env0	ccgctcccc	gtggccgcc	tgactgagg	cctggccctg	tcggtgggcc	tgaccggaat
3-Env21.12
4-Env21.12	TAATTCCCCC	GTGGCCGCC	TGACTGAGG	CCTGGCCCTG	TGGTGGGCC	TGACCGGAAT

	965	975	985	995	1005	1015
pT350 env0	caatgtggcc	gtgtccgcc	tgctgcacca	gcgctgacc	agcctgattc	atgtgctgga
3-Env21.12
4-Env21.12	CAATGTGGCC	GTGTCCGCC	TGTCGCACCA	GCGCCTGACC	AGCCTGATTC	ATGTGCTGGA

	1025	1035	1045	1055	1065	1075
pT350 env0	gcaggatcag	cagcgctga	tcacggccat	taaccagaca	cactacaacc	tgctgaatgt
3-Env21.12
4-Env21.12	GCAGGATCAG	CAGCGCTGA	TCACGGCCAT	TAACCAGACA	CACTACAACC	TGCTGAATGT

	1085	1095	1105	1115	1125	1135
pT350 env0	ggcctccgtg	gtggcccaga	atcgccgagg	actggactgg	ctgtatatcc	gcctgggatt
3-Env21.12
4-Env21.12	GGCCTCCGTG	GTGGCCCAGA	ATCGCCGAGG	ACTGGACTGG	CTGTATATCC	GCCTGGGATT

	1145	1155	1165	1175	1185	1195
pT350 env0	ccagtccctg	tgcccacaaa	tcaacgagcc	ctgctgcttt	ctgctgattc	agaatgattc
3-Env21.12
4-Env21.12	CCAGTCCCTG	TGCCCAACAA	TCAACGAGCC	CTGCTGCTTT	CTGCTGATTC	AGAATGATTC

	1205	1215	1225	1235	1245	1255
pT350 env0	gatcattcgc	ctggcgacc	tgagccact	gagtcagcgc	gtgagcacgg	attgggggcc
3-Env21.12
4-Env21.12	GATCATTTCG	CTGGCGACC	TGCAGCCACT	GAGTCAGCGC	GTGAGCACGG	ATTGGGGGCC

	1265	1275	1285	1295	1305	1315

```

pT350 envo      cttcgaagac gatgacgata aggccggttg gagtcatcca caattcgaga agggcggcgg
3-Env21.12     .....
4-Env21.12     CTTCGAAGAC GATGACGATA AGGCCGGTTG GAGTCATCCA CAATTCGAGA AGGGCGGCGG

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                1325      1335      1345      1355      1365      1375
pT350 envo      ctccggaggt ggatcaggag gtggttctctg gtcacaccct caattcgaga agtgagtta
3-Env21.12     .....
4-Env21.12     CTCCGGAGGT GGATCAGGAG GTGGTTCTCTG GTCACACCCT CAATTCGAGA AGTGAGT...

                ....|....| ....
                1385
pT350 envo      aaccgctga tcag
3-Env21.12     .....
4-Env21.12     .....

```

Código de colores: rojo-codón de inicio de la secuencia BiP; verde- sitio de restricción BgIII; rosado-1^{er} codón Env (secuencia optimizada); violeta- sitio de restricción ApaI; celeste-sitio de corte con enteroquinasa; marrón-strep-tag (x2); naranja-mutaciones simples R300N y R301N; amarillo-codón stop.

Apéndice 6- RF cloning protocol

1- Megaprimer synthesis

Tube 1		Vol. reaction= 50 uL
5X GC Phusion buffer		10 uL (1X)
10 mM dNTPs		1 uL (200 uM)
Primer FOR (10uM)		2 uL (0,4uM)
Primer REV (10uM)		2 uL (0,4uM)
Phusion DNA pol (2U/uL)		1 uL
Target DNA		50 ng
H2O		Up to (50uL)
Cycling		
98°C	2'	(denaturing without enzyme)
Add enzyme		
98°C	3'	1 cycle
98°C	30''	35 cycles
58-60°C	1'	
72°C	30''	
72°C	10'	1 cycle

2- Megaprimers purification

DNA extraction from agarose gels using kit (Macherey Nagel for ex)

Elution volumen= 30uL in H2O

Measure DNA concentration (Nanodrop)

3- RF Cloning

Tube 1	Vol. 50 uL
5X HF Phusion buffer	10 uL (1x)
10 mM dNTPs	1 uL (200uM)
Purified megaprimers	250ng
Plasmid vector (destination plasmid)	40ng
Phusion ADN pol (2U/uL)	1 uL
H2O	Up to 50uL

Cycling	
98°C	2' (denaturing without enzyme)
Add enzyme	
98°C	3' 1 cycle
98°C	30''
60°C	1' 35 cycles
72°C	1'/kb of vector máx
72°C	10' 1 cycle

You can run a gel or continue with digestion of parental DNA.

4- Dpn I digestion

Digest parental DNA with 1uL Dpn I (20U/uL) 1h at 37°C.

Inactivate enzyme 20' at 80°C.

Include a negative control for digestion (HF buffer, plasmid vector, Dpn I & H2O)

Apéndice 7- Kits empleados para la cristalogénesis

Se realizaron en particular screening de cristales en matriz dispersa como se realiza habitualmente para los ensayos de cristalización iniciales. Este tipo de screening involucra un sesgo intencional hacia combinaciones de condiciones que han funcionado previamente.

Los kits Crystal Screen 1 &2 contienen 50 soluciones únicas conteniendo varias sales, buffers y precipitantes. Estas 100 soluciones se colocan en los pocillos de las placas de cristalización como reservorio. Crystal Screen 1 kit esta basado en el metodo publicado por Jancarik y Kim¹¹⁶ mientras que el kit Crystal Screen 2 está basado en el método publicado por by Cudney et al.⁵⁴ y es una extensión del Crystal Screen 1. Los kits Structure Screen 1 & 2 de Molecular Dimensions limited posee también 50 condiciones cada uno ordenadas por pH. Los kits Wizard 1 &2 de Emerald Biostructures tambien están

basados en screening de matriz dispersa y fueron desarrollados por Steve L. Sarfaty and Wim. G. J. Hol. Estos kits también poseen 50 condiciones donde se prueban 16 tipos de precipitantes y cuyas soluciones finales poseen un pH entre 4.2 y 10.5

Finalmente los kits de Jena BioScience consisten en 10 kits (JBS1-JBS4 y JBS5-JBS8) que abarcan 240 condiciones. La composición de los kits son el resultado de la información recavada para miles de proteínas cristalizadas. Este screening contiene los mejores buffers (a nivel estadístico) que han resultado en cristales de proteínas para difracción de rayos X^{54, 96, 116}. Estos kits se ordenan por el tipo y concentración de precipitante

JBS1 basado en PEG 400-3000

JBS2 basado en PEG 4000

JBS3 basado en PEG 4000 + isopropanol, sal, glicerol

JBS4 basado en PEG 6000-8000

JBS5 basado en PEG 8000-20000

JBS6 basado en sulfato de amonio

JBS7 basado en MPD

JBS8 basado en MPD/alcohol

Por último PEGion/Cryo (Hampton) es un screening de cristalización diseñado para evaluar PEG 3,350 de alta pureza monodisperso y 48 sales únicas que representan un completo rango de aniones y cationes frecuentemente utilizados en la cristalización de macromoléculas biológicas. Las variables primarias del screening son PEG, el tipo de ion, la fuerza iónica y el pH.

ii) Anexo tesis B- Publicaciones

- (1) Moratorio G., Fischer S., Bianchi S., **Tomé L.**, Rama G., Obal G., Carrión F., Pritsch O., Cristina J. (2013) A detailed molecular analysis of complete bovine leukemia virus genomes isolated from B-cell lymphosarcomas. *Vet Res. Mar* 18;44(1):19.
- (2) **Tomé L.**, Frabasile S., Candia C., Pittini A., Farina N., Melero J. A., Arbiza J. (2012) Selection and characterization of human respiratory syncytial virus escape mutants resistant to a polyclonal antiserum raised against the F protein. *Arch Virol. Jun*;157(6):1071-80.
- (3) Blanc A., Berois M., **Tomé L.**, Epstein A., Arbiza J. R. (2012) Induction of humoral responses to BHV-1 glycoprotein D expressed from HSV-1 amplicon vectors. *J Vet Sci. Mar*;13(1):59-65.

iii) Anexo tesis C- Manuscritos en preparación

1- N-Glycan profile of recombinant soluble BLV Env protein, implications in immunogenicity.

Lorena Tomé^{1,2}, Gonzalo Obal^{1,2}, Federico Carrión¹, Madelon Portela⁵, Gleysin Cabrera⁶, Sergio Bianchi^{1,3}, Natalia Olivero¹, Rosario Duran⁵, Analia Lima⁵, Ernesto Rodríguez², Andrés Addiego^{1,2}, Félix Rey⁴, Otto Pritsch^{1,2}

¹Unidad de Biofísica de Proteínas (IPMon), ²Departamento de Inmunobiología (FMed, UdelaR), ³Departamento Básico de Medicina (HC,FMed, UdelaR), ⁴Unidad de Virología Estructural (IP París), ⁵Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica (IPMon), ⁶Laboratorio de Glicobiología. Departamento de Química de Carbohidratos. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba.