

PEDECIBA

**Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
Opción Biología Celular y Molecular**

Estudio del efecto de mutaciones puntuales en la proteína de fusión del Virus Respiratorio Sincial Humano: caracterización en virus mutantes resistentes a un suero policlonal contra la proteína F y análisis de proteínas F recombinantes.

Lorena Tomé
Sección Virología
Facultad de Ciencias

Orientador: Prof. Dr. Juan Arbiza

Co-orientador: Dra. Sandra Frabasile

Tribunal

Presidente:

Vocales:

Febrero 2010

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	5
1.1 EL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL HUMANO: IMPACTO CLÍNICO Y ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA INFECCIÓN POR VRSH.	5
1.2 CARACTERÍSTICAS DEL VIRIÓN, CICLO REPLICATIVO Y PROTEÍNAS VIRALES.	6
1.3 LA PROTEÍNA DE FUSIÓN DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL HUMANO Y SU HOMOLOGÍA ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL CON OTRAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN VIRALES.....	8
1.4 EL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL HUMANO: SELECCIÓN DE MUTANTES RESISTENTES A ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES Y SU CONTRIBUCIÓN A LA ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE LA PROTEÍNA F	17
1. 5 ANTECEDENTES E HIPÓTESIS.....	21
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
4. METODOLOGÍA.....	28
4.1 TÉCNICAS BASADAS EN CULTIVOS CELULARES	28
4.1.1. MANEJO DE LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS PARA INFECCIÓN VIRAL Y TRANSFECCIÓN	28
4.1.1.1. HEp-2	28
4.1.1.2. BSR-T7.....	28
4.1.2. CRECIMIENTO DEL VIRUS VRSH-E1 EN PRESENCIA DE SUERO POLICLONAL ANTI-F Y PASAJE EN AUSENCIA DE PRESIÓN INMUNE.	28
4.1.3. PURIFICACIÓN Y TITULACIÓN POR PLAQUEO VIRAL.....	29
4.1.4. ENSAYO PARA OBSERVACIÓN DE EFECTO CITOPÁTICO DE LOS VIRUS TITULADOS.....	30
4.1.5. ENSAYO DE MICRONEUTRALIZACIÓN	30
4.2. TÉCNICAS SEROLÓGICAS.....	31
4.2.1. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)	31
4.2.1.1. Preparación de láminas de IFI a partir de infección de células HEp-2 con VRSH mutantes y control.	31
4.2.1.2. Preparación de láminas de IFI a partir de transfección de células BSR-T7 con plásmidos que expresan proteínas F del VRSH recombinantes.....	31
4.2.1.3 Protocolo IFI.....	32
4.2.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).....	32
4.2.2.1. Preparación de extractos celulares a partir de células infectadas con VRSH.....	32
4.2.2.2. Ensayo de reactividad por ELISA	33
4.2.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE). TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANA DE NITROCELULOSA PARA SU INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT).....	33
4.3 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	34
4.3.1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL POR EL MÉTODO DEL TRIZOL® A PARTIR DE CÉLULAS INFECTADAS	34
4.3.2 SÍNTESIS DE ADNc (RT), AMPLIFICACIÓN DEL ADNc MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS.	34
4.3.2.1. Retrotranscripción del ARN extraído.....	34
4.3.2.2. Amplificación del ADNc por PCR	35
4.3.2.3. Electroforesis de ácidos nucleicos	35
4.3.3. PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	35
4.3.4. SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	36
4.3.5. PREPARACIÓN DE CÉLULAS DH5α Y XL-1 BLUE COMPETENTES.....	36
4.3.6. CLONAJE EN PLÁSMIDO pJET1.2/BLUNT DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE VIRUS MUTANTES SIN PLAQUEO VIRAL.....	37
4.3.6.1. Ligación del plásmido pJET-1/Blunt con productos de PCR con extremos romos.	37
4.3.6.2. Transformación de bacterias competentes XL-blue con plásmidos pJET1.2/Blunt conteniendo el gen completo de la proteína F del VRSH.	37
4.3.6.3. Producción y purificación de los plásmidos pJET1.2/blunt conteniendo las variantes del gen de la proteína F presentes en los productos de PCR.	37
4.3.6.4. Secuenciación del gen de la proteína F clonado en vector pJET1.2/blunt.	38
4.3.7. PRODUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pTM1-F MUTANTES: Val533Met, Asn268Ile/Val533Met, Asn268Ile, Val533Leu, Val533Cys, Val533Met/Val536Met y Val533Met/Val536Met/Val544Met.....	38
4.3.7.1. Mutagénesis dirigida para la producción de simples, dobles y triples mutantes.....	38
4.3.7.2. Diseño de cebadores para mutagénesis dirigida.....	39

4.3.7.3. Producción y purificación de los plásmidos pTM1-F conteniendo las variantes de la proteína F	39
4.3.7.4 Expresión transitoria de proteínas F en sistema de expresión eucariota con los plásmidos pTM1-F salvaje y mutantes.....	40
4.3.8. CLONAJE DE LA PROTEINA F TM- EN PLÁSMIDO pAEUA2	41
4.3.8.1. Producción del pAEUA2	41
4.3.8.2. Amplificación del fragmento correspondiente al gen que codifica para la proteína F sin la región transmembrana (TM-).....	41
4.3.8.3. Ligación y transformación.....	42
4.3.8.4. Confirmación de clones positivos por digestión con enzimas de restricción.	42
4.3.8.5. Producción y purificación del plásmido pAEUA2/FTM-.....	42
5. RESULTADOS.....	44
5.1. PARTE 1: ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE VIRUS MUTANTES	44
5.1 A) CONFIRMACIÓN DE LAS MUTACIONES SELECCIONADAS EN EL DOBLE MUTANTE VRSH-E1.....	44
5.1 B) ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LAS MUTACIONES SELECCIONADAS EN AUSENCIA DE PRESIÓN INMUNE: SELECCIÓN DEL VIRUS MUTANTE VRSH-C10.	46
5.1 C) PURIFICACIÓN POR PLAQUEO VIRAL DE LOS VIRUS VRSH-E1, VRSH-E2 Y VRSH-E3 Y TITULACIÓN DE LOS VIRUS EN ESTUDIO.	49
5.1 D) EFECTO CITOPÁTICO PRODUCIDO POR LOS VIRUS MUTANTES VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 Y VRSH-C10 Y LOS VIRUS CONTROL VRSH-E2 Y VRSH-E3	50
5.1 E) EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA NEUTRALIZACIÓN POR EL SUERO POLICLONAL ANTI-F DE LOS VIRUS MUTANTES SELECCIONADOS MEDIANTE ENSAYO DE MICRONEUTRALIZACIÓN.	51
5.1 F) CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE LOS VIRUS QUE ESCAPAN A LA NEUTRALIZACIÓN	52
5.1 f.1) ELISA.....	52
5.1 f.2) Inmunofluorescencia Indirecta	53
5.1 G) ANÁLISIS POR WB DE LAS PROTEÍNAS CORRESPONDIENTES A LOS VIRUS MUTANTES Y CONTROL.....	56
5.1 H) CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS VIRUS MUTANTES VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 PURIFICADOS QUE ESCAPAN A LA PRESIÓN POR UN SUERO POLICLONAL.....	57
5.2 PARTE 2: ANÁLISIS DE PROTEÍNAS F RECOMBINANTES	59
5.2 A) EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL PLÁSMIDO pTM1-FWT	59
5.2 B) MUTAGÉNESIS DIRIGIDA Y EXPRESIÓN TRANSITORIA DE LOS PLÁSMIDOS SIMPLES, DOBLES Y TRIPLES MUTANTES.....	60
5.2 b1) Producción del mutante transmembrana Val533Met	60
5.2 b2) Producción de los mutantes Asn268Ile (simple mutante) y Asn268Ile/Val533Met (doble mutante) ...	62
5.2 b3) Producción de los simples mutantes transmembrana Val533Leu y Val533Cys	64
5.2 b4) Producción de los mutantes transmembrana Val533/536Met (doble mutante) y Val533/536/544Met (triple mutante).....	65
5.2 C) PRODUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pAEUA2-FTM-.....	66
6. DISCUSIÓN.....	68
6.1 PARTE 1: CARACTERIZACIÓN DE VIRUS MUTANTES RESISTENTES A LA PRESIÓN POR UN SUERO POLICLONAL ANTI-F Y ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LAS MUTACIONES SELECCIONADAS.	68
6.2 PARTE 2: IMPLICANCIAS DE LA MODIFICACIÓN DE RESIDUOS AMINOACÍDICOS EN LA PROTEÍNA F, EN PARTICULAR EN LA REGIÓN TM - DEL VRSH.....	74
7. CONCLUSIONES.....	78
8. PERSPECTIVAS	79
8. REFERENCIAS	81
9. ANEXOS	88
ANEXO 1: Selección y aislamiento de mutantes resistentes por pasajes sucesivos en presencia de suero policlonal contra la glicoproteína F.....	88
ANEXO 2: Diseño de cebadores para mutagénesis dirigida.....	88
ANEXO 3: Mapas plasmídicos.....	91
ANEXO 4: Reactivos y materiales.....	92
ANEXO 5: Ensayo de microneutralización.....	95
ANEXO 6: Secuencia completa gen proteína F salvaje clonado en pTM1.....	96

ABREVIATURAS

Aa	aminoácido	BSA	seroalbúmina bovina
AcMo	anticuerpo monoclonal	SFB	suero fetal bovino
Acs	anticuerpos	siRNAs	ARNs pequeños interferentes (sigla en inglés)
ADN	ácido desoxirribonucleico	SNC	suero normal de conejo
ADNc	ADN copia	TA	temperatura ambiente
ARN	ácido ribonucleico	TM	transmembrana
ARNm	ARN mensajero	Tween	polioxietileno sorbitan monopalmitato
DMS	dimetilsulfóxido	µg	microgramos
DTT	dithiotreitol	uL	microlitros
ECP	efecto citopático	um	micrómetros
EDTA	ácido etilendiaminotetracético	UFP	unidades formadoras de placa
ELISA	Enzimo inmunoensayo (sigla en inglés)	VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
Fwt	Proteína F salvaje	VRSH	virus respiratorio sincicial humano
GFP	proteína fluorescente verde	WB	western blot
H	hemaglutinina		
HN	hemaglutinina- neuraminidasa		
HR	repetidos de heptadas (sigla en inglés)		
IFI	inmunofluorescencia indirecta		
Ig	inmunoglobulina		
IMPDH	inosin monofosfato deshidrogenasa		
mg	miligramos		
mL	mililitros		
mM	milimolar		
MOI	multiplicidad de infección (sigla en inglés)		
MPVH	metapneumovirus humano		
NDV	virus de la enfermedad de Newcastle (sigla en inglés)		
Ng	nanogramos		
NMR	nuclear magnetic resonance		
NTP	nucleósido trifosfato		
nts	nucleótidos		
PB	pares de bases		
PBS	buffer fosfato salino		
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (sigla en inglés)		
PIV3	Parainfluenza virus 3		
PIV5	Parainfluenza virus 5 (antes llamado SV5)		
PZ	Palivizumab		
RT	retrotranscripción		

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

EL VIRUS RESPIRATORIO SINICIAL HUMANO: IMPACTO CLÍNICO Y ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA INFECCIÓN POR VRSH.

El Virus Respiratorio Sincicial Humano (VRSH) es el principal agente etiológico viral a nivel mundial de enfermedades respiratorias pediátricas^[1], con síntomas que abarcan desde una neumonía severa y bronquiolitis, que involucran el tracto respiratorio bajo, a infecciones más leves similares a un resfriado común^[2-6]. A su vez, la infección por el VRSH afecta a la población adulta en general, causando infecciones respiratorias graves principalmente en ancianos e individuos inmunocomprometidos^[7-10].

La reinfección por este virus es recurrente debido a la protección inmune parcial que se establece como resultado de una infección natural. El VRSH a su vez puede infectar niños en presencia de anticuerpos maternos^[5] y la infección por VRSH en la infancia es considerada un factor de riesgo para el desarrollo de asma^[11, 12].

Este virus presenta dos grupos antigénicos, A y B que han sido identificados en base a la reactividad con paneles de anticuerpos monoclonales dirigidos contra distintas proteínas del virus (N, P, M, G y F)^{[13] [14] [15] [16] [17]}.

Estos grupos antigénicos co-circulan en la mayoría de las epidemias en la población humana en todo el mundo y su prevalencia varía año a año. A su vez se ha descrito una gran variación antigénica y genética dentro de cada grupo antigénico^{[18] [19-23]}. De hecho, distintos genotipos han sido identificados dentro de cada grupo antigénico y estudios epidemiológicos mostraron que múltiples genotipos co-circulan durante las epidemias. Los genotipos dominantes alternan su prevalencia cada año sugiriendo un mecanismo adicional para las frecuentes re-infecciones por evasión de la inmunidad generada por cepas previas^[24, 25]. Se ha propuesto que el modelo evolutivo del VRSH es similar al del virus Influenza B en el que varios linajes co-circulan durante la misma epidemia. Estos virus muestran una rápida diseminación y una variación temporal más que geográfica^[26].

Al día de hoy no existe una vacuna disponible contra la infección por VRSH. De hecho el estudio de algunas vacunas potenciales demostró que generaban un fenómeno de “inmunopotenciación” o “enfermedad exacerbada por vacunación”^[27-29].

Uno de los abordajes que se utilizan para la prevención del VRSH es el uso de anticuerpos anti-VRSH. Al inicio el más empleado era la inmunoglobulina RSV-IGIV (RespiGam®) pero posteriormente fue sustituido por el palivizumab (Synagis®)^[30-35]. El RSV-IGIV es una preparación concentrada de anticuerpos neutralizantes anti-VRSH policlonales obtenida del suero de pacientes adultos. Estos anticuerpos se administraron en recién nacidos prematuros y se demostró que reducen los días de hospitalización con oxígeno^[36]. Actualmente ha sido sustituido por el palivizumab^[37]. El palivizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra un epítopo localizado en el sitio antigénico II de la proteína de fusión (F) del VRSH (ver Fig. 5). Se utiliza para la profilaxis en niños de alto riesgo^[35, 36, 38] y también ha sido

administrado en pacientes transplantados^[39]. Actualmente se ha diseñado una versión mejorada del palivizumab, el motavizumab, que presenta mayor afinidad por la proteína F del VRSH y tiene mayor capacidad neutralizante pero aún se encuentra en ensayos clínicos^[40, 41] [41-43]

Otra de las estrategias para el tratamiento de esta infección es el uso de inhibidores los cuales pueden dividirse en: i) inhibidores de unión/fusión^[44], ii) oligonucleótidos cuyo blanco es el ARN viral, iii) aquellos cuyo blanco es la proteína N, iv) los que inhiben alguna función de la ARN polimerasa ARN dependiente y v) aquellos que inhiben la inosin monofosfato deshidrogenasa (IMPDH)^[45]. De hecho la ribavirina (inhibidor de la inosin monofosfato deshidrogenasa) es la única droga antiviral aprobada para el tratamiento de infecciones por VRSH aunque el mecanismo específico de inhibición no se ha determinado aún^[46-50]. Actualmente el empleo de pequeños ARNs interferentes (siRNAs) con actividad anti-VRSH específica como terapia antiviral ha sido probado en modelos animales y se planea probar en humanos^[51, 52]

Con respecto al desarrollo de una vacuna efectiva existen varios factores que dificultan su implementación: a) la falta de inducción de anticuerpos neutralizantes contra el virus, b) una respuesta inmune incompleta luego de la inmunización natural con VRSH, c) la inducción de una respuesta inmune inapropiada como se vio en la vacuna inactivada con formalina (respuesta inmune exacerbada de tipo Th2), d) la falta de inmunidad de tipo Th1 inducida por los antígenos del VRSH y e) la limitada inducción de células T CD8+^[53]. Como ejemplo actualmente se están evaluando vacunas a ADN expresando el gen de la proteína F con un adyuvante de mucosa como es la toxina colérica^[54], vectores adenovirales (Adv5) que expresan la proteína F optimizada para el uso de codones^[55], virosomas reconstituidos de influenza inmunoestimulantes (IRIVs) que incorporan la proteína F recombinante^[56], y se ha optimizado el candidato sensible a la temperatura diseñado por genética reversa que conserva las mutaciones obtenidas en el virus atenuado original^[57].

1.2 CARACTERÍSTICAS DEL VIRIÓN, CICLO REPLICATIVO Y PROTEÍNAS VIRALES.

El VRSH es un pneumovirus perteneciente a la familia *Paramyxoviridae* dentro del orden Mononegavirales. Es un virus envuelto que consta de un genoma de ácido ribonucleico (ARN) simple hebra, no segmentado de polaridad negativa de aproximadamente 15,2 kilobases (para la cepa de referencia A2). El orden de los genes virales en el ARN genómico del VRSH es: 3´- NS1 - NS2 - N - P - M - SH - G - F - M2 - L - 5´. Cada uno de estos genes está flanqueado por secuencias conservadas de inicio y terminación de la transcripción. Dado que estos genes están bajo un promotor único que se encuentra en el extremo 3´ del ARN genómico, una vez que la polimerasa alcanza una señal de terminación génica poliadenila, liberando un ARNm monocistrónico. A continuación inicia la síntesis de ARN en la siguiente señal de inicio. De todos modos la polimerasa tiende a liberarse del ARN genómico en las regiones intergénicas y debido a la presencia de un promotor único debe volver al extremo 3´ lo cual resulta en un gradiente de expresión siendo los genes ubicados en el extremo 3´ lo que se transcriben más frecuentemente^[58-62]. Este genoma es transcrito entonces en 10 ARN mensajeros (ARNms) subgenómicos cada uno de los cuales codifica una única proteína, a excepción del ARNm del gen M2 que codifica para las proteínas M2-1 y M2-2[1]. La mayoría de las proteínas codificadas por el virus son estructurales y por tanto se encuentran tanto en el

virión como en las células infectadas. Sin embargo las proteínas no estructurales NS1, NS2, y aún queda por determinar si M2-2, se hallan presentes únicamente en las células infectadas ^[63].

Las proteínas N, P, L y M2-1 están asociadas a la nucleocápside y a la polimerasa viral. La proteína N es responsable de una variedad de funciones incluyendo la formación de estructuras para el ensamblaje del virión y la protección del genoma de la digestión por proteasas. La proteína L funciona como una ARN polimerasa ARN dependiente e interactúa con la proteína P la cual es importante para la activación del complejo enzimático y aumenta la estabilidad de la proteína L ^[64]. La proteína M2-2 por su parte participa en la regulación de la síntesis de ARN. La proteína M es la proteína de matriz, y las proteínas NS1 y NS2 fueron identificadas como antagonistas del sistema del interferón α/β ^[1, 65]. Finalmente tres glicoproteínas transmembrana (SH, G y F) se hallan insertas en la envuelta lipídica (proveniente de la célula huésped) tanto en viriones maduros como en células infectadas. Mientras la porción interna de estas proteínas interactúa con la proteína de matriz, la porción externa queda expuesta en la superficie lo que conlleva a que las glicoproteínas F (proteína de fusión) y G (proteína de adhesión o de unión al receptor) sean las principales proteínas inmunogénicas que posee el virus, e inducen la producción de anticuerpos neutralizantes en el sistema inmune del huésped ^[66-70] (Fig. 1).

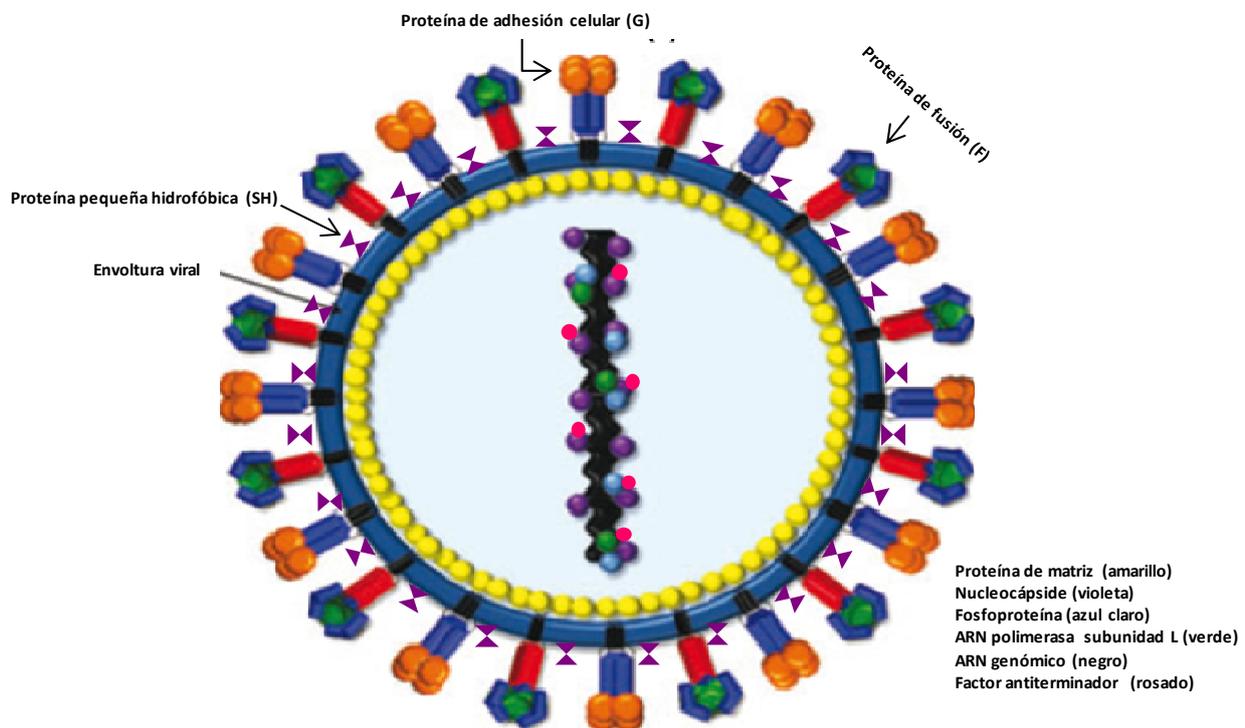


Figura 1: Esquema del virión del Virus Respiratorio Sincicial Humano. En azul se representa la envoltura viral con las glicoproteínas de superficie F (proteína de fusión), G (proteína de adhesión), SH (proteína pequeña hidrofóbica) señaladas con flechas. En amarillo se representa la proteína de matriz M; en violeta la proteína de nucleocápside N asociada al genoma de ARN simple cadena de polaridad (-) (en negro) junto con las proteínas de la polimerasa viral L (en verde) y la fosfoproteína P (en azul claro) y la proteína M2-1 (rosado). Adaptado de Smith 2009 ^[71].

La entrada del virus a la célula huésped está mediada por las glicoproteínas de superficie F y G. La unión primaria del virus a la célula blanco es promovida por la proteína de unión al receptor G, la cual se une a heparina y proteoglicanos de superficie celular^[72]. La proteína F es luego responsable de la penetración viral mediante la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula huésped. Sin embargo se ha demostrado para los pneumovirus que la glicoproteína G podría no ser obligatoria para la entrada del virus a la célula. En este sentido se ha reportado tanto un VRSH atenuado como también un VRSH recombinante que carecen de la proteína G y sin embargo continúan replicando en cultivo^[73-75]. Esto indica que la proteína F por si misma puede unirse para permitir la entrada del virus siendo por tanto necesaria y suficiente para la infección viral y la fusión de células infectadas con sus vecinas para formar sincicios^(30, 51) no dependiendo de otras glicoproteínas virales para su activación. Se ha demostrado que la proteína F es capaz de unirse a heparina aunque el requerimiento por los glucosaminoglicanos es menor que para la proteína G lo que sugiere la existencia de interacciones con otro tipo de receptor^[76, 77]. No se ha identificado aún un receptor específico para la proteína F del VRSH, sin embargo para otro pneumovirus muy relacionado como el Metapneumovirus Humano (MPVH), se ha reportado que la proteína F estaría involucrada con la integrina $\alpha\beta 1$ para la entrada del virus a la célula^[78]. Los datos planteados previamente sugieren entonces que la interacción de la proteína G con los glucosaminoglicanos podría ser el contacto inicial para facilitar el acceso, seguido por un segundo paso de unión, el que de hecho involucra a la unión con el receptor celular aún desconocido requerido para disparar la fusión de membranas y el ingreso del virus.

A partir del proceso de fusión de la partícula viral con la membrana plasmática de la célula blanco, la nucleocápside viral, la polimerasa y el resto de las proteínas del virión se depositan en el citoplasma de la célula infectada donde la transcripción y la replicación tienen lugar. Como se mencionó anteriormente la transcripción resulta en la síntesis de 10 ARN mensajeros monocistrónicos, con cap 5', metilados y poliadenilados los cuales se traducen por la maquinaria celular. La replicación por su parte involucra la generación de un ARN completo, de polaridad positiva, complementario al genoma: el ARN antígenómico. Este es generado una vez finalizada la síntesis de ARNm y actúa como molde para la síntesis del ARN genómico (-). Los genomas se incorporan en las nucleocápsides a medida que se sintetizan y pueden reciclarse a través de las vías de síntesis de ARN o bien ser transportados a la membrana plasmática para el ensamblaje de las partículas virales^[63]. La liberación de viriones se hace por brotamiento a través de la membrana plasmática de la célula infectada con participación de proteínas del citoesqueleto. Este brotamiento está circunscrito a regiones determinadas en la superficie celular y visualmente se observa como un proceso opuesto al mecanismo de fusión.^{[79-81] [82-85]}

1.3 LA PROTEÍNA DE FUSIÓN DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL HUMANO: HOMOLOGÍA ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL CON OTRAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN VIRALES.

Como se mencionó anteriormente la proteína F (proteína de fusión) del VRSH dirige la penetración viral mediante la fusión entre la envoltura del virión y la membrana plasmática de la célula huésped, liberando la ribonucleoproteína viral en el citoplasma celular^[86, 87]. Luego, durante la infección, la proteína F

expresada y localizada en la superficie celular puede entonces mediar la fusión entre células vecinas dando lugar a la formación de sincicios^[88]. Este fenómeno constituye un importante efecto citopático, lo que da origen al nombre de este virus, y probablemente sea un mecanismo adicional de propagación viral^[1].

La glicoproteína F es una proteína transmembrana tipo I, que se sintetiza como un precursor F0 inactivo^[89] de aproximadamente 574 aminoácidos. Este precursor es modificado co-traduccionalmente por la adición de N-carbohidratos en el retículo endoplásmico rugoso^[90], donde se oligomeriza para formar homotrímeros. La proteína F está glicosilada en cinco o seis sitios potenciales de N-glicosilación localizados principalmente en la subunidad F2 y contiene palmitato^[6, 90]. La conservación de estos sitios de N-glicosilación podría estar implicada en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la proteína. En este sentido se observó que sólo tres de los sitios potenciales de N-glicosilación estaban ocupados por oligosacáridos de los cuales únicamente el hallado en el residuo Asn500 era importante para la actividad de fusión de la proteína^[91]. Otra modificación post-traduccional involucra la acilación del residuo Cys550. El precursor F0 (70 kDa) es procesado proteolíticamente en dos sitios en cada monómero por una endoproteasa tipo furina en la red o compartimento del trans- Golgi, durante su traslado a la membrana celular para dar lugar a dos polipéptidos unidos covalentemente por puentes disulfuro: F2 y F1; actualmente se piensa que son dos los puentes disulfuro que unen ambos fragmentos lo que explicaría en parte la termoestabilidad única que posee el dominio extracelular de la proteína F^[92] ^[93]. El fragmento pequeño F2 (20 kDa) está ubicado en el extremo N-terminal y el fragmento F1 (50 kDa) se encuentra en la porción C-terminal, el cual presenta un péptido hidrofóbico (en el extremo C-terminal de F1) que permite el anclaje de esta proteína a la membrana, seguido por una cola citoplasmática de 24 aa^[6, 90]. El procesamiento proteolítico en ambos sitios sería necesario para que la proteína adquiriera su potencial fusogénico^[94]. El procesamiento proteolítico libera el péptido de fusión hidrofóbico (de 18 aa) en el extremo N-terminal de la subunidad F1, que se cree es el directamente involucrado en la inserción en la membrana blanco para iniciar la fusión produciendo una proteína madura y biológicamente activa^[94, 95] (Fig. 2B). Recientemente se ha demostrado que para obtener una proteína completamente activa se requiere de un péptido de fusión funcional^[96].

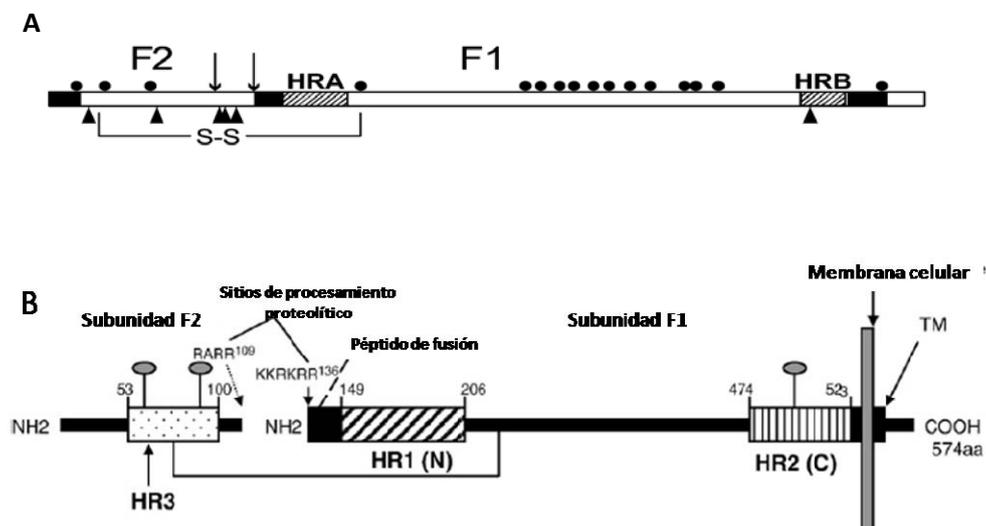


Figura 2: Representación de la estructura primaria de la proteína de fusión del VRSH en sus formas no procesada, precursor F0 (A) y procesada proteolíticamente dando lugar a las subunidades F2 y F1 (B). En ambas figuras se señalan los dominios conservados: péptido señal, péptido de fusión (FP) y dominio transmembrana (TM), hidrofóbicos, que en (A) se representan como rectángulos negros; heptadas HRA (o HR1) y HRB (o HR2), la heptada HR3 (obtenida por predicción); la cola citoplasmática (en el extremo C-terminal) y los puentes disulfuro S-S. En (A) se marcan con flechas los sitios de procesamiento proteolítico y en (B) se muestran los aminoácidos donde se realizaron los cortes. Los sitios de N-glicosilación se señalan en (A) con triángulos negros y en (B) se marcan sólo los conservados (forma de paleta). Los residuos de cisteína son señalados en (A) como círculos negros. (A) Adaptado de Ruiz-Argüello 2004^[97]. (B) Adaptado de Yunus 2010^[44].

Como se muestra en la figura 2, la estructura primaria de la glicoproteína F presenta tres secuencias hidrofóbicas. La primera corresponde al péptido señal (aminoácidos 1-25) localizado en el extremo N-terminal de la cadena F2, el cual es removido de la glicoproteína madura. La segunda secuencia hidrofóbica ubicada en el extremo N-terminal de la cadena F1 (aminoácidos 138-155) corresponde al péptido de fusión, segmento rico en glicina que se inserta en la membrana celular blanco durante el proceso de fusión y la tercer secuencia, cercana al extremo C-terminal de la porción F1, constituye la región transmembrana (aminoácidos 525-549). Inmediatamente adyacente al péptido de fusión y a la región transmembrana, existen dos zonas de repetición de heptadas denominadas HRA (también denominada HR1 o HRN, que abarca los aminoácidos 156-199) y HRB (también denominada HR2 o HRC, que abarca los aminoácidos 488-524). Las heptadas son secuencias de siete aminoácidos formadas por residuos de leucina e isoleucina. Estos motivos están involucrados con la formación de estructuras superenrolladas^[6, 98-101] vinculadas al proceso de fusión de membranas^[102-104]. Finalmente una tercer región (HR3) de secuencias repetidas de heptadas fue identificada en la subunidad F2 y abarca los residuos 53-100^[105] pero su papel aún no se ha determinado.

Con respecto a los residuos de cisteína presentes en la proteína F (15 residuos en total), algunos están localizados en las inmediaciones del sitio de procesamiento proteolítico mientras que el resto se encuentran en medio de la subunidad F1 conformando una región rica en cisteínas (11 residuos) que se cree participan en el plegamiento correcto de la proteína madura (Fig. 2A).

La proteína F del VRSH es estructuralmente similar a las proteínas F de otros paramyxovirus en lo que respecta a la localización de los dominios hidrofóbicos, las heptadas y los residuos de cisteína así como la activación proteolítica que resulta en la exposición del péptido de fusión hidrofóbico^[106]

Con respecto a la estructura tridimensional de la proteína F del VRSH aún no existe información detallada de la misma, a pesar de que se tiene la estructura de cristal correspondiente a la región del núcleo o "core" hexamérico compuesto por tres heterodímeros HRA/HRB^[102].

Varios diseños experimentales han sido aplicados para el estudio de la estructura secundaria y para la aproximación a la estructura terciaria de la proteína F del VRSH. En este sentido varios abordajes se han llevado a cabo, como estudios de NMR, microscopía electrónica^[107, 108] y la construcción de modelos de estructura tridimensional basados en los datos de cristalografía obtenidos para el "core" de la proteína F del VRSH junto con los datos de la estructura cristalográfica parcial de la porción extracelular de proteína F post-fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV)^[109, 110]. Con estos datos se postuló que la proteína F del VRSH es una proteína trimérica cuyos monómeros están compuestos por pares F2-F1 unidos por puentes disulfuro que se disponen simétricamente con respecto a un eje central. Esta proteína se

divide en tres regiones: cabeza, cuello y tallo^[92, 104, 107, 111, 112]. El tallo es elongado, constituye la base de la proteína y está compuesto por seis hélices antiparalelas superenrolladas (región del “core”^[102] también denominado 6HB) compuestas por las heptadas: HRA y HRB. La región de la cabeza presenta una cavidad central que se comunica con el exterior a través de un canal axial y tres canales radiales dispuestos simétricamente^[104] (Fig. 3-1). Recientemente han sido elucidadas: la estructura cristalográfica completa del dominio extracelular de la proteína de fusión del virus Parainfluenza humano 3 en su estado post-fusión (Fig. 3-2 b)^[113] así como la del dominio extracelular de la proteína F del virus Parainfluenza 5 (antes llamado SV5) en su conformación pre-fusión^[114] (Fig. 3-2a). Estas estructuras también se han empleado para realizar modelos tridimensionales de la proteína F del VRSH^[92].

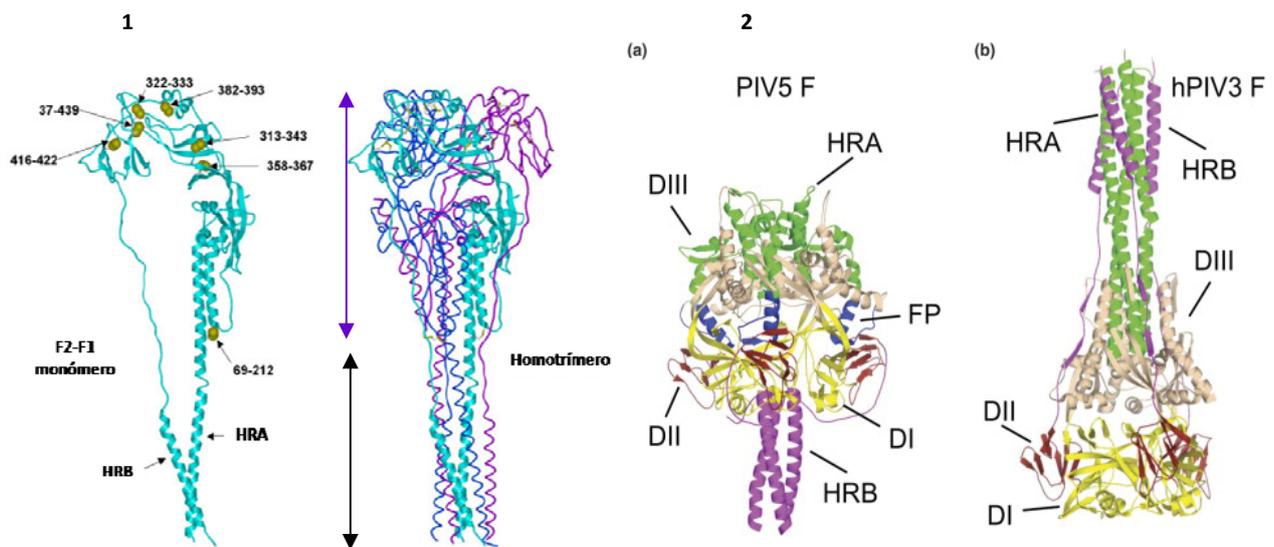


Figura 3: 1. Modelo de la estructura molecular del ectodominio de la proteína F del VRSH utilizando como modelo la estructura del ectodominio de la proteína F del virus Parainfluenza Humano 3. En el modelo se muestra, a la izquierda, el diagrama de cintas correspondiente al monómero F2-F1 y a la derecha el homotrímero de la proteína F. Las heptadas HR1 y HR2 están indicadas así como los residuos de cisteína (círculos amarillos). Se señalan las posiciones de la cabeza, cuello (doble flecha violeta) y tallo (doble flecha negra) de la proteína F. Adaptado de Day 2006^[92].
2. (a) Trímero de la proteína F del PIV5 en su conformación pre-fusión. En la figura se muestra: HRA (verde), HRB y su región terminal (violeta), péptido de fusión (azul), dominios DI (amarillo) y DII (rojo). **(b)** Trímero de la proteína F del PIVh3 en su conformación post-fusión, los colores representan los mismos dominios que en **(a)**. Adaptado de Lamb 2007^[115].

Con respecto al proceso de fusión como mencionamos anteriormente la penetración del VRSH al igual que el resto de los virus envueltos ocurre por la fusión de membranas catalizada por las proteínas de fusión presentes en la envoltura lipídica. La maquinaria involucrada es bastante simple al menos cuando se compara con el aparato necesario para los eventos de fusión de membranas que ocurre en las células. Una razón para esta simplicidad es que los factores de fusión viral son utilizados únicamente una vez. La actividad de fusión es gatillada una vez que recibe la señal ya sea debido a la unión al receptor o por un descenso del pH lo cual induce cambios conformacionales irreversibles en las proteínas de fusión virales.

Asimismo se ha observado que el “core” trimérico descrito para la proteína F del VRSH también se halla presente en un número elevado de proteínas de fusión virales lo que podría reflejar un elemento

mecanístico común^[103]. De hecho las heptadas (HRA y HRB) presentes en la secuencia de la proteína F del VRSH pueden formar estructuras triméricas tipo horquilla similares a las encontradas en las proteínas de fusión de un gran número de virus envueltos^[116-129]. Esta estructura podría colocar las membranas celular y viral de modo de facilitar la aposición entre ambas, trayendo el péptido de fusión, el cual se inserta en la membrana celular, cerca del segmento transmembrana que se halla anclado en la membrana viral (o de una célula infectada) (Fig. 4). Es probable que esta estructura hexamérica superenrollada observada en el complejo HRA/HRB (o 6HB) corresponda a la conformación estable post-fusión^[102] ya que la orientación antiparalela que adquiere esta estructura localiza el péptido de fusión muy cercano a la región transmembrana en uno de los extremos de la partícula. La formación de esta estructura hexamérica se vincula a la mezcla del contenido lipídico de ambas membranas probablemente acoplando la energía libre liberada del replegamiento de la proteína con la fusión de las membranas^[130].

Diversas etapas tienen lugar durante el proceso de fusión de las proteínas virales de tipo I. Luego del procesamiento proteolítico las proteínas se encuentran en una conformación metaestable pre-fusogénica antes de que la proteína se active. Una vez que la proteína es activada sufre una serie de cambios conformacionales (Fig. 4 a-c) dando lugar a la exposición e inserción del péptido de fusión en la membrana de la célula blanco con la subsecuente fusión de membranas^[131] (Fig. 4 d-e). Este cambio conformacional da lugar a una estructura de la proteína más estable (estado post-fusión) y con la energía liberada en este proceso tiene lugar la fusión de membranas. La fusión de membranas es un proceso de alto costo energético dado que para realizar la fusión de membranas el virus debe proveer de suficiente energía para deformar bicapas en aposición resultando finalmente en la formación de un poro de fusión y liberando el genoma viral dentro de la célula^[132] (Fig. 4 abajo). La comprensión del proceso de fusión en paramyxovirus se vio aumentada por la elucidación de las estructuras cristalinas de las formas pre-fusión del PIV5 así como las formas post-fusión de la proteína F del NDV y del PIVh3^[110, 113, 114].

Como se muestra en la figura 4 (arriba) en la forma pre-fusión los dominios HRA se hallan separados y el péptido de fusión hidrofóbico queda secuestrado en su interior (en la región de la cabeza) mientras que las regiones HRB interactúan en una conformación superenrollada. El modelo de fusión propuesto postula que luego de la activación, se producen cambios conformacionales que dan lugar a que las regiones HRB se separen en primer lugar de la región de la cabeza quedando como cadenas extendidas no helicoidales (Fig. 4b). Posteriormente se forma la estructura de pre-horquilla que da lugar a la formación de un superenrollamiento largo de HRA y la subsecuente inserción del péptido de fusión en la membrana blanco (Fig.4c). A continuación el plegamiento subsecuente de HRB da lugar a la formación de una estructura de horquilla que posiciona HRB en una posición antiparalela dentro de los huecos del superenrollamiento trimérico de los HRA para dar lugar a la formación de 6HB (Fig. 4e). Se cree que la formación de este core hexamérico provee algo de la energía necesaria para la fusión de las membranas. Subsecuentemente el poro de fusión se expande y este paso de expansión se cree es el que conlleva el mayor costo energético para el proceso de fusión de membranas^[114]. La fusión de membranas involucra las siguientes etapas: contacto con la membrana (unión y aposición de membranas), mezcla de lípidos (hemifusión), y mezcla de los contenidos lipídicos (formación de poro y estabilización); que involucra que la

proteína pasa de la conformación pre-fusión metaestable a un estado de menor energía post-fusión como se muestra en la figura 4 (abajo) ^{[133, 134] [135]}.

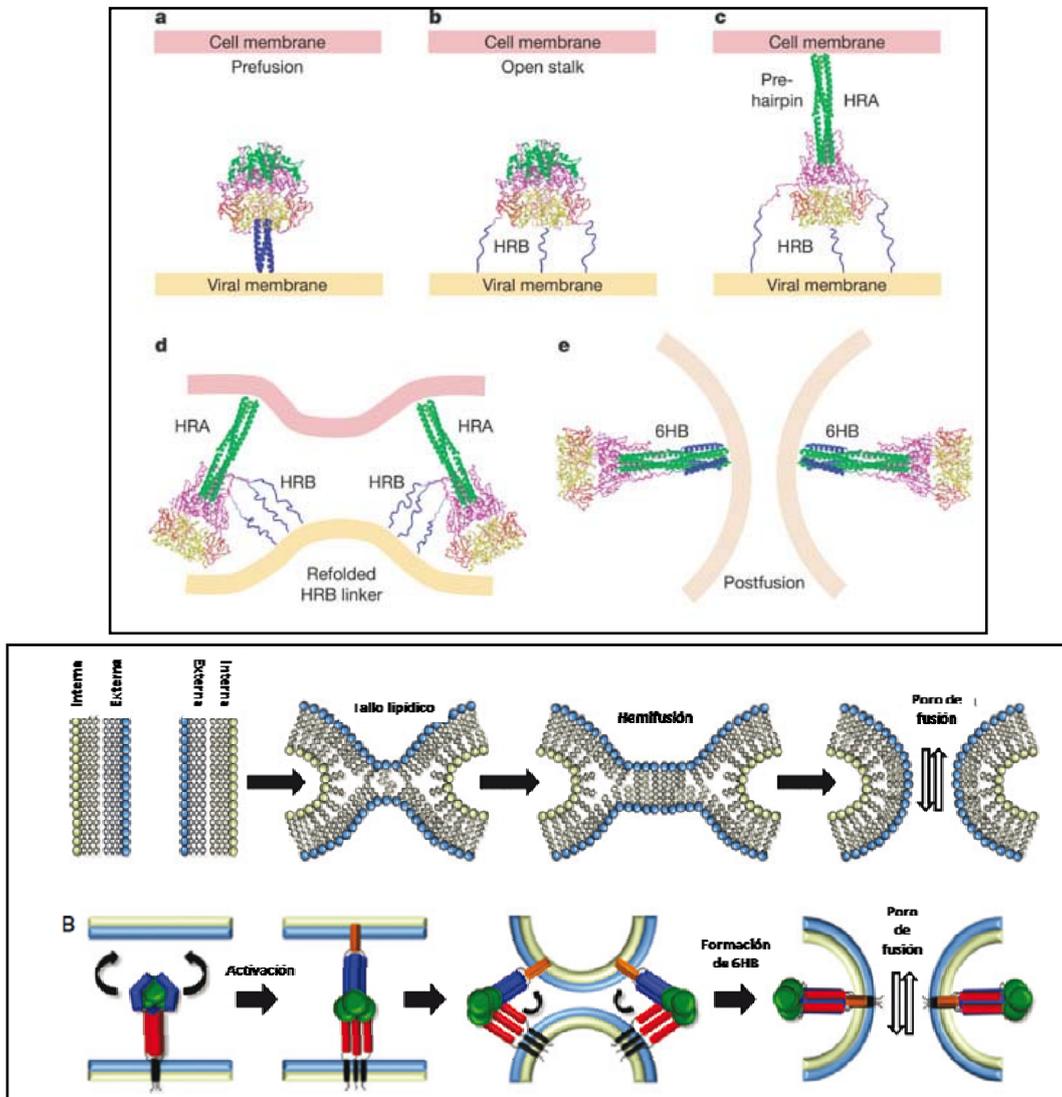


Figura 4: Modelo de fusión de proteínas F de paramyxovirus. Arriba: se describen los cambios conformacionales que sufre la proteína F durante el proceso de fusión de membranas. a) estructura de la proteína F en su conformación pre-fusión (HRB-azul, HRA-verde, dominios I, II y II-amarillo, rojo y fucsia respectivamente). b) Conformación "open stalk" (o de tallo extendido), HRB se separa y estos dominios quedarían extendidos separándose de la cabeza de la proteína pre-fusión. c) Intermediario pre-horquilla puede formarse por replegamiento del dominio DIII facilitando la formación del superenrollamiento de HRA y la inserción del péptido de fusión en la membrana blanco. d) Antes de la formación del hexámero 6HB, el plegamiento de HRB en la superficie expuesta de DIII con la formación de hebras beta adicionales podría estabilizar la yuxtaposición de las membranas celular y viral. e) Formación de 6HB post-fusión que se asocia con la fusión de membranas y la formación del poro yuxtaponiendo los péptidos de fusión y los dominios transmembrana. Arriba adaptado de Yin 2006 ^[114]. Abajo: otra representación de los intermediarios que participan en el proceso de fusión en este caso incluye también los intermediarios lipídicos que culminan en la formación del poro de fusión. Péptido de fusión: naranja, HRA: azul, HRB: rojo, dominio transmembrana TMD: negro. Abajo adaptado de Smith 2009 ^[71].

Se cree que la glicoproteína F del VRSH, al igual que otras proteínas de fusión de tipo I (por ejemplo la gp41 del VIH-1), adopta una conformación prefusogénica metaestable hasta que es activada en presencia de la membrana blanco y/o receptor^[102]. Sin embargo para la proteína F del VRSH aún no se ha demostrado que es lo que dispara los cambios conformacionales presentes en la misma para llevar a cabo la fusión. Dado que al igual que en VIH-1, la fusión del VRSH tiene lugar en la superficie celular y que es independiente del pH se presume que la unión de la proteína F a un receptor celular dispararía los cambios conformacionales^[63]. A pesar de que se han probado varios ligandos que podrían unir a la proteína F, aún no se ha podido determinar cuál sería el receptor correcto para esta proteína^{[44, 136-138] [139]}.

Recientemente se demostró que una elevada temperatura podría servir para disparar *in vitro* la formación del core hexamérico en la proteína F del VRSH^[44]; la temperatura podría servir como disparador de cambios conformacionales en la proteína F lo cual es consistente con lo propuesto para otros paramyxovirus^[115]. El estudio del proceso de los cambios conformacionales que ocurren en las proteínas de fusión de diversos virus envueltos (Parainfluenza Virus 5, Influenza, VIH-1, etc.) ha permitido desarrollar el modelo denominado “spring loaded trap model”. En este modelo la conformación de la proteína F no fusogénica a pH neutro estaría atrapada en un estado cinético de alta energía y esta energía sería liberada como resultado del cambio conformacional en la proteína. De acuerdo con este modelo, a pH neutro la presencia de urea, calor o presión podrían pueden desestabilizar a la forma nativa no fusogénica, ocasionando que espontáneamente sufra una transición hacia la forma fusogénica sugiriendo que esta proteína es metaestable^[140, 141]. Estos estudios también proponen que un cambio de pH o la unión al receptor compensarían los requerimientos energéticos para realizar la fusión de membranas lo que podría satisfacerse por un aumento de temperatura u otra fuerza desestabilizadora como urea o presión^{[140] [142]}. El trabajo de Yunus y cols.^[44] demostró que la temperatura dispara la formación del “core” de la proteína F del VRSH y coteja la hipótesis de metaestabilidad para esta proteína lo cual no se había probado en presencia de la proteína nativa.

El primer trabajo donde se visualizó un posible cambio conformacional en la proteína F del VRSH fue en el trabajo de Calder y cols^[107] donde se correlacionaba por microscopía electrónica la existencia de estructuras en forma de cono con la conformación de la proteína F en su estado pre fusogénico, mientras que estructuras en forma de “lollipop” (paleta o chupetín) se relacionaron con la proteína en su estado post-fusión^[107]. La transición de un estado al otro estaba relacionado con el procesamiento proteolítico completo de la proteína F. Se infería a su vez que estas orientaciones eran consistentes con la posibilidad de que los tallos de los bastones con forma de “lollipop” estuvieran formados por las heptadas HRA y HRB dispuestas en forma antiparalela lo cual se confirmó posteriormente al obtenerse el cristal del core hexamérico^[102].

Por tanto el procesamiento proteolítico está directamente relacionado con la activación de la proteína F del VRSH para la fusión de membranas. Interesantemente esta proteína de fusión presenta dos sitios de procesamiento proteolítico a diferencia del resto de las proteínas de los paramyxovirus (Fig. 2). El potencial fusogénico de la proteína F del VRSH así como en otras proteínas de fusión virales está regulado por el procesamiento proteolítico del precursor F0 el cual impide la activación de la proteína y por ende la fusión durante el ensamblaje del virus. El procesamiento proteolítico también genera los estados metaestables de las glicoproteínas virales que presentan los arreglos conformacionales requeridos para

la fusión^[89]. Como se observa en la figura 4 (arriba) en la proteína nativa el procesamiento proteolítico resulta en un cambio estructural mínimo posiblemente limitado al secuestro del péptido de fusión en un ambiente no acuoso para ser liberados sólo cuando el contacto con la célula blanco (o su activación) gatille la exposición de los péptidos de fusión^[114]. El procesamiento proteolítico total deja al péptido de fusión listo para actuar. Existe una teoría para la proteína F del VRSH que plantea que el hecho de completar el procesamiento proteolítico de la proteína en ambos sitios podría ser el paso de activación de la misma. Sólo cuando los tres monómeros del trímero son procesados proteolíticamente se induce el cambio conformacional que expone el péptido de fusión. Se propone entonces que el procesamiento proteolítico del precursor es ineficiente en la célula infectada. Así moléculas de la proteína F incorporadas al virión contienen monómeros no procesados o parcialmente procesados proteolíticamente que mantienen al trímero en una conformación pre-activa. El procesamiento proteolítico completo en todos los monómeros cuando el virus va a infectar una nueva célula podría ser el paso de activación que dispara la fusión de membranas^[143] [93, 94]. Como se mencionó anteriormente los cambios conformacionales asociados a la fusión por parte de la proteína F se consideran irreversibles. Es importante entonces que la activación sea regulada apropiadamente tanto espacial como temporalmente^[144]. La proteína F del VRSH puede ser fusogenicamente activa en ausencia de la proteína G lo cual sugiere que esta proteína a diferencia de otras posee un requerimiento de energía menor para realizar la transición desde el estado metaestable y a su vez no requiere la presencia de la proteína de unión para estabilizar la forma prefusogénica^[71]. El modelo planteado para este tipo de proteínas (como la proteína F del VRSH) es que una vez sintetizadas, las proteínas de fusión y de unión viajarían separadas por la vía secretoria llegando a la superficie celular de forma independiente dado que la proteína de unión no es requerida para interactuar con la proteína F para promover la fusión a pesar de que la unión con el receptor facilitaría el proceso trayendo las membranas en cercana proximidad^[71].

Por otro lado, todavía no se han definido claramente los sitios específicos de la proteína F involucrados en el proceso de fusión, si bien se sabe que son necesarios los dominios correspondientes a las heptadas y al péptido de fusión. En particular, se ha demostrado que la introducción de mutaciones puntuales en la región correspondiente al péptido de fusión que resultan en un cambio por un aminoácido con propiedades fisicoquímicas diferentes, altera su funcionalidad^[96]. Estudios más recientes, por su parte, mostraron que mientras la delección de la región citoplasmática no altera su función^[145], la sustitución de las cisteínas del dominio extracelular (no presentes en el péptido de fusión) por residuos de serina sí afecta su función^[146]. Esto sugiere que estos aminoácidos son esenciales para la correcta actividad de la proteína.

Sin embargo aún se desconocen las características del dominio transmembrana de la proteína F del VRSH así como su contribución en el proceso de fusión.

La región transmembrana (TM) de la proteína F del VRSH comparte características estructurales con el resto de los paramyxovirus. Asimismo tanto la naturaleza de los aminoácidos que la componen así como la longitud del dominio también es similar entre estos virus aunque difieran en su secuencia aminoacídica. En general la longitud de los dominios transmembrana oscila entre los 15-20 aa, sin embargo en el caso del VRSH y del PIV5 ambos poseen una región TM más larga, de 25 aa, pero que no alcanza a la longitud que presenta por ejemplo la región TM de la proteína S del coronavirus SARS (con 33 aa).

A modo de ilustración se muestra la región transmembrana (putativa) de la proteína F del VRSH (aminoácidos 525-549) y del PIV5 (aminoácidos 489-509):

```
VRSH      I M I T T I I I V I I V I L L S L I A V G L L L Y
PIV5      V L S I I A I C L G S L G L I L I I L L S V V V W
```

Los dominios TM de las proteínas de fusión virales han sido menos estudiados que sus contrapartes del ectodominio y hasta hace algún tiempo sólo se creía que participaban en el anclaje de la proteína a la membrana. Sin embargo el anclaje a la membrana es solo una de las funciones que posee, ya que actualmente se lo vincula con el ensamblaje del virión, el reclutamiento y la oligomerización de proteínas, y la fusión^[147]. Tampoco se conoce si en la proteína F trimérica del VRSH estas regiones interactúan formando una hélice^[148, 149] como en PIV5 o si permanecen como monómeros separados que semeja las patas de un trípode como se ha demostrado en VIH-1^[148]. A su vez sería sumamente interesante observar que sucede con los residuos aromáticos presentes en la TM de la F del VRSH dado que se ha visto por ejemplo para la proteína de fusión de VIH-1 que estarían involucrados en el agrandamiento del poro de fusión. A su vez la presencia de dominios ricos en cisteína se cree que colaboran con el proceso de fusión dando flexibilidad a la membrana^[147].

En el caso del PIV3 una vez obtenida la estructura del ectodominio de la proteína F se planteó que la región TM podría ser un determinante importante en la estabilidad de la conformación pre-fusión de la proteína, proveyendo buena parte de la energía necesaria para atrapar a la proteína en su estado metaestable pre-fusión ya que en ausencia de esta región la proteína F soluble se pliega directamente a una conformación final post-fusión más estable^[113].

El dominio transmembrana es una región de la cual resulta difícil obtener su estructura o generar modelos, por este motivo se están realizando estudios de dinámica molecular a través de métodos computacionales por ejemplo en el dominio TM de la gp41 de VIH-1^[150]. En estos trabajos se estudian los monómeros y la formación de trímeros de la región TM para estudiar oligomerización, demostrando nuevamente que este dominio cumple un papel importante en la fusión.

Varios dominios transmembrana de proteínas de fusión virales han sido estudiadas, entre las que se encuentran la hemaglutinina del virus Influenza^[151], la proteína G del VSV, la proteína gp41 de VIH-1, la proteína S de coronavirus^[147], etc, demostrando que esta región juega un papel fundamental en el proceso de fusión en sí. En el caso del VRSH los escasos trabajos realizados en el dominio TM de la proteína F están relacionados con el hecho de que esta región tendría determinantes estructurales que facilitan el transporte a la membrana y que funcionan independientemente de su orientación^[152].

1.4 EL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL HUMANO: SELECCIÓN DE MUTANTES RESISTENTES A ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES Y SU CONTRIBUCIÓN A LA ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE LA PROTEÍNA F

El VRSH al ser un virus ARN resulta ser genéticamente heterogéneo de modo que cada población viral consiste en una distribución de genomas relacionados pero no idénticos, en lugar de especies moleculares únicas con secuencias idénticas. Estas distribuciones dinámicas son llamadas cuasiespecies; la denominación cuasiespecie refleja tanto la heterogeneidad del ARN viral así como la replicación competitiva entre las variantes genómicas que van surgiendo^[153]. El fenómeno de cuasiespecies de las poblaciones virales está relacionado con la tasa de error de la polimerasa que replica genomas ARN. Esta replicación errónea de virus ARN resulta en poblaciones complejas de virus mutantes relacionados. A diferencia de los virus que presentan genomas compuestos por ADN, los virus ARN poseen algunas características que contribuyen a la gran variabilidad presente en estos virus. En este sentido los virus ARN presentan: a) un mayor número de rondas de replicación por unidad de tiempo, b) genomas cuyo tamaño oscila entre 3×10^3 y 3×10^4 pb, c) alto número de partículas virales en un organismo infectado y d) una mayor tasa de mutación durante la replicación. En este sentido las ARN polimerasas virales, a diferencia de las ADN polimerasas no poseen actividad exonucleasa 3'-5' correctora y reparadora que otorgan alta fidelidad de copia al proceso de replicación. Se estima que la tasa de mutación oscila en el orden de una mutación por genoma por ronda de replicación. En este sentido una de las predicciones de la estructura de cuasiespecies de los virus ARN es la existencia de una relación con el umbral de error^[154, 155]. El umbral es definido por el valor de fidelidad de copia en el cual ocurre una marcada transición entre un espectro organizado de mutantes y secuencias al azar que carecen de contenido en la información (ingreso a la catástrofe de error). Los virus ARN se replican cerca del umbral de catástrofe de error con una fidelidad de copia que permite la producción masiva de copias conteniendo errores^[153]. La complejidad genética limitada permite a las secuencias que componen a los virus ARN a moverse a través del espacio de secuencia como una estrategia adaptativa^[155]. Esto permite a los virus ARN mejorar su adaptación a un ambiente constante y a la vez tener el potencial de adaptarse rápidamente a los cambios en las condiciones ambientales^[153].

La respuesta inmune del huésped es una de las fuerzas adaptativas más significativas que los virus que infectan vertebrados deben enfrentar durante la replicación. Los virus responden a este desafío acumulando mutaciones que permiten que el virus escape del reconocimiento por parte de los anticuerpos. A su vez las variantes que escapan a la neutralización se convierten en blancos antigénicos de nueva especificidad e inducen la producción de más anticuerpos que constituyen una nueva presión selectiva y promueven la acumulación de más mutaciones en el virus^[156]. Por este motivo, entender la evasión de los anticuerpos es de vital importancia para el diseño racional de estrategias antivirales.

Por lo mencionado anteriormente ha sido posible seleccionar mutantes del VRSH sometidos a diversas presiones, ya sea con anticuerpos o con determinados inhibidores. Si nos focalizamos en los virus mutantes del VRSH cuyos cambios se generaron en la proteína de fusión estos pueden dividirse en: a)

resistentes a anticuerpos monoclonales, lo cual ha contribuido a elucidar la estructura antigénica de la proteína F, b) resistentes a inhibidores, permitiendo establecer los sitios de acción de inhibidores de fusión para mejorar el diseño de drogas y c) resistentes a anticuerpos monoclonales de uso clínico, lo cual ha permitido inferir si el tratamiento con el anticuerpo monoclonal humanizado palivizumab (utilizado en población de riesgo como profiláctico) podría generar población resistente.

En primer lugar la selección de mutantes que escapan a la presión por anticuerpos monoclonales anti-F fue de gran utilidad para conocer la estructura antigénica de una de las principales proteínas inmunogénicas que posee el virus. En este sentido la proteína F reviste mayor importancia dado que induce una respuesta de anticuerpos con mayor capacidad neutralizante^[18, 157, 158] y los epitopes de esta proteína se hallan más conservados en los distintos aislados naturales del virus. A su vez la respuesta inmune contra la proteína F confiere inmunidad protectora contra ambos grupos antigénicos a diferencia de la generada contra la proteína G^[66, 67]. Por este motivo es el candidato de preferencia para el diseño de vacunas y drogas para lo cual es necesario realizar la caracterización antigénica de esta proteína para entender el papel de sus epitopes en la respuesta inmune. Varias preguntas pueden formularse con respecto a la estructura antigénica de la proteína F: ¿Cuántos sitios antigénicos posee y dónde se ubican? ¿cuántos epitopes contiene cada sitio antigénico? ¿qué características tienen sus epitopes, son lineales o conformacionales? ¿están vinculados a la neutralización o fusión del virus? El análisis de los sitios antigénicos presentes en esta glicoproteína al comienzo fue abordado mediante el empleo de anticuerpos policlonales y monoclonales en la interacción con péptidos sintéticos así como con productos de digestión enzimática con el propósito de diagramar la estructura antigénica de esta proteína^[159-161] ^[159, 160, 162]. Los resultados obtenidos inicialmente establecieron que varios epítopes no poseían un carácter lineal sino que requerían de la conformación nativa de la proteína para su interacción. Los epitopes lineales dependen de la secuencia lineal de aminoácidos en la estructura primaria de la proteína. Los epitopes conformacionales sin embargo dependen de la estructura nativa de la proteína debido a que los aminoácidos que componen estos epitopes pueden hallarse distantes en la secuencia primaria de la proteína siendo muy próximos en la proteína plegada. Por este motivo se han aislado y secuenciado mutantes resistentes del VRSH que escapan a la neutralización por determinados anticuerpos monoclonales anti-F, de forma de identificar los residuos aminoácidos que forman parte de los distintos sitios antigénicos, discriminar cuáles aminoácidos son esenciales para la integridad de los epitopes y poder establecer su carácter conformacional o lineal. También permitió correlacionar la contribución de cada sitio antigénico a la actividad biológica de la proteína^[159, 161, 163]. En este sentido el uso de anticuerpos que neutralizan (esto es, bloquean) la fusión del virus con la célula huésped constituye una herramienta exploratoria útil para evaluar qué regiones son potencialmente relevantes para la actividad fusogénica de la proteína F.

De esta forma utilizando ambas estrategias (para estudio de epitopes lineales y conformacionales) fueron localizados los sitios o áreas antigénicas principales en la estructura primaria de la proteína F del VRSH. Varios sitios antigenicos han sido identificados y cada uno de ellos posee múltiples epitopes. Estos sitios antigénicos se vio que agrupaban en zonas inmunogénicas “calientes”^[6, 164], conocidas como sitios antigénicos I, II y IV/V/VI ^[159, 160, 164-168] ^[18, 158, 169](Fig. 5).

Estos sitios antigénicos se localizan entre la región del cuello y la cabeza de la proteína en el modelo de la estructura tridimensional^[104, 107, 111] (Ver Fig. 3.1). Cada uno de los sitios antigénicos contiene múltiples epitopes alguno de los cuales están involucrados en la inhibición de la fusión (sitios antigénicos II y IV/V/VI)^[158, 159, 165, 166].

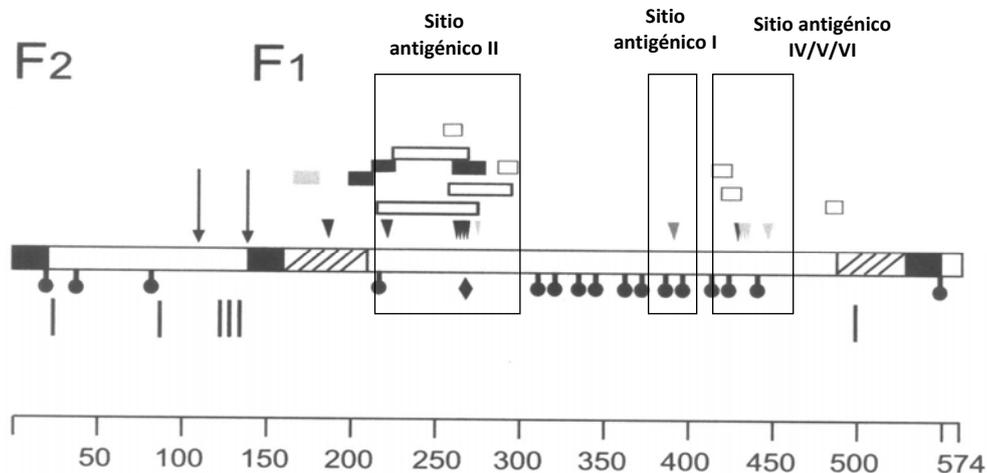


Figura 5: Mapa antigénico parcial de la proteína F del VRS. En la figura las regiones hidrofóbicas y las heptadas HRA y HRB se indican como rectángulos negros y rayados respectivamente, en la secuencia primaria de la proteína. Los sitios de N-glicosilación (I), los residuos de cisteína (●) y los sitios de procesamiento proteolítico (▼) también se señalan. Los sitios antigénicos I, II y IV/V/VI fueron se muestran con un recuadro dentro de los cuales se señala la posición aproximada de los aminoácidos que han sido modificados en mutantes resistentes a la neutralización por AcMos anti-F (▼ y ▼)^[159, 161, 163]. Con (◆) se señala la posición del cambio aminoacídico registrado en un mutante resistente al Fab 19 y las barras blancas indican la localización de péptidos sintéticos que reaccionan con AcMos o con anticuerpos policlonales anti-VRS y que inducen anticuerpos neutralizantes anti- VRS en animales (barras negras). A su vez se muestra la ubicación del péptido al que une el AcMo 3 bovino (barra gris)^[94, 159, 161, 163, 167, 170-180] Adaptado de Candia^[162].

El estudio de estos sitios antigénicos como mencionamos anteriormente fue realizado, entre otros abordajes experimentales, mediante la selección de mutantes que resistieran a la presión por anticuerpos monoclonales, lo cual permitió establecer los sitios de selección de mutaciones que estarían involucrados en el proceso de neutralización. De este modo los anticuerpos monoclonales han sido agrupados como pertenecientes a un mismo grupo antigénico por ensayos de competición o por reactividad con virus mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales neutralizantes^[13, 18, 158, 168, 169, 181]. En estos casos podría ocurrir que el sitio de mutación fuera una parte integral del epítipo o que la sustitución provocara un cambio conformacional en un sitio distante. Por este motivo la identidad de la posición se confirma como parte del epítipo testando la reactividad de dicho AcMo con péptidos sintéticos que abarcan la mutación^[160]. De este modo se definieron los distintos sitios antigénicos presentes en la proteína F del VRSH.

El sitio antigénico II es considerado una región inmunodominante y neutralizante y está localizado hacia el extremo N-terminal de la subunidad F1 en una región resistente a la tripsina^[165]. Como se mencionó anteriormente al comienzo se pensó que los epitopes de este sitio eran de carácter lineal, sin embargo se vio que algún tipo de conformación local era necesaria en determinados epitopes dado que mutaciones resultantes de la selección con un determinado anticuerpo también afectaba la reactividad con

otros anticuerpos que seleccionaban cambios en otras posiciones^[159]. Se observó que mutaciones en los residuos 262, 268, 272 y 275 modificaban epitopes en esta región. La mayor parte de los anticuerpos que reconocen este sitio reaccionan con un péptido que abarca los residuos 215-275 que aparentemente reproduciría la conformación local de esta región de la proteína^[160]. Este sitio antigénico contiene epitopes solapados pero no idénticos reconocidos por los AcMos 47F, 49F, 7C2, AK13A2, 11 y B4, entre otros. A su vez esta región contiene epitopes que son antigénicos en varios huéspedes dado que AcMos murinos y bovinos que reconocen epitopes en el área antigénica II han sido aislados en varios laboratorios^[18, 168, 182-185]. Por otra parte se observó que sueros humanos post-infección y antisueros hiperinmunes de conejo contienen anticuerpos que compiten con alguno de estos anticuerpos por la unión al sitio antigénico II indicando que los paratopes presentes en esos AcMos podrían estar representados en el suero policlonal^[186] y reaccionan con péptidos sintéticos de esta misma área^[160]. Un número importante de mutantes resistentes a AcMos que reconocen epitopes en este sitio antigénico han sido seleccionados poniendo de manifiesto que la alteración de un residuo en este sitio afecta no sólo al epitope reconocido por el AcMo sino también al resto de los epitopes que conforman el sitio antigénico II. Dentro de este grupo queremos destacar aquellos que vencen la neutralización por los AcMos 11 y 47F dando lugar a la selección de la mutación Asn268Ile y que, como se mencionó anteriormente, provoca la pérdida de todos los epitopes del sitio antigénico II^[159, 165].

La otra región que incluye epitopes reconocidos por anticuerpos neutralizantes está localizada cerca del extremo C-terminal de la región rica en cisteínas, cercana a la heptada HRB, y es sensible a la tripsina. Los sitios antigénicos IV, V y VI se encuentran en esta región y son sitios que están solapados. Mutaciones en los residuos 429, 432 y 436 afectan a los epitopes de los sitios antigénicos IV, V y VI respectivamente mientras que un solo cambio en la posición 433 modifica los epitopes de todos estos sitios simultáneamente^[166]. Este sitio también es de carácter conformacional. La selección de dobles mutantes utilizando los AcMos de los sitios antigénicos II y IV reveló que surgen los mismos cambios que los seleccionados en los simples mutantes indicando que los cambios aminoacídicos en sitios antigénicos individuales no influyen en los cambios seleccionados en un sitio separado. La localización de ambos sitios antigénicos II y IV/V/VI implica que los AcMos dirigidos contra epitopes en estas regiones se unen a ambos lados de la región rica en cisteínas (Fig. 5). Es probable que estos AcMos inhiban cambios conformacionales en la subunidad F1 asociados con el proceso de fusión^[144].

Finalmente el sitio antigénico I está localizado en la parte central de la región rica en cisteínas. Este sitio no está vinculado a la neutralización dado que los AcMos dirigidos contra este sitio tienen un efecto marginal o nulo en la neutralización viral^[166]. Sin embargo se han aislado mutantes resistentes a AcMos del sitio antigénico I en los cuales un cambio en el residuo 389, cambia el epitope reconocido por estos AcMos^[166].

Por su parte el palivizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que mapea en el sitio antigénico II de la proteína F (Fig. 5) y deriva del anticuerpo monoclonal murino 1129. Estudios previos habían seleccionado un mutante con el anticuerpo parental 1129 que presentaba una reducida susceptibilidad a la neutralización por un suero policlonal hiperinmune^[171]. Como se mencionó anteriormente el palivizumab se utiliza actualmente como profiláctico en niños de alto riesgo y pacientes

transplantados. Si bien no hay reportados casos de resistencia contra este anticuerpo en pacientes, y al parecer todas las cepas de VRSH son neutralizadas por el palivizumab, sí se ha reportado *in vitro* e *in vivo* (en ratas alodoneras) la selección de mutantes del VRSH que escapan a la presión por este anticuerpo^[178, 179]. Estos estudios adquieren relevancia dado que este anticuerpo es empleado cada vez con mayor frecuencia en pacientes inmunodeprimidos y en niños pequeños lo cual provee oportunidades de emergencia de virus resistentes en humanos. Los mutantes resistentes al PZ seleccionados *in vitro* e *in vivo* presentaron cambios que nuevamente involucraban a los residuos aminoacídicos 272 y 268^[179, 180] [178].

En todos los mutantes resistentes a la neutralización por anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína F, sólo se identificaron mutaciones puntuales en el genoma que implicaban uno o dos cambios en la proteína F. A diferencia de los mutantes que escapan a la presión por anticuerpos monoclonales anti-F, los mutantes seleccionados a partir de AcMos dirigidos contra la proteína G presentan cambios drásticos en la secuencia nucleotídica (inserciones y/o deleciones que generan cambios en el marco de lectura de la proteína^[187]) [18, 159-161, 163].

1. 5 ANTECEDENTES E HIPÓTESIS

Hace más de 15 años que nuestro laboratorio trabaja intensamente en el estudio de la variabilidad antigénica y genética del VRSH, y en particular en la caracterización molecular de las 2 principales glicoproteínas de superficie: F y G. Con respecto a la glicoproteína F la determinación de los sitios vinculados a la neutralización ha sido uno de los principales objetivos que se ha intentado alcanzar en estos años participando en el análisis de los sitios antigénicos presentes en la glicoproteína F^[159-161], en particular mediante la selección y caracterización de mutantes resistentes a anticuerpos monoclonales (AcMos) pertenecientes a los sitios antigénicos II y IV como se mencionó anteriormente. Uno de estos trabajos reveló que la selección con AcMos pertenecientes a sitios antigénicos diferentes daba lugar a dobles mutantes con una marcada disminución en el tamaño de los sincicios que generaba^[161]. Por este motivo, se continuó con el abordaje de esta proteína ahora no solamente desde el punto de vista antigénico sino también funcional. Esto motivó a que se iniciaran estudios midiendo la fusión de proteínas F del VRSH expresadas en un sistema eucariota conteniendo mutaciones dobles o simples con el fin de establecer si alguna de las variantes o algún cambio en particular determinaba la pérdida de la funcionalidad de la proteína.

Recientemente hemos seleccionado *in vitro* por presión inmune, mediante pasajes seriados del VRSH en presencia de antisuero policlonal contra la proteína de fusión, un doble mutante de la proteína F, resistente a la neutralización y fusogénicamente activo^[162, 188]. Este mutante fue denominado VRSH-E1. La caracterización molecular preliminar de VRSH-E1 reveló la presencia de dos mutaciones puntuales, en distintas regiones de la proteína F: una transversión en el nucleótido 816 (A x T) que conlleva un cambio en la secuencia deducida de aminoácidos en la posición 268 (Asn x Ile) y una transición en el nucleótido 1610 (G x A) que se traduce en un cambio en el aminoácido 533 (Val x Met)^[189]. La mutación Asn268Ile, está presente en la porción extracelular de la proteína e involucra uno de los sitios antigénicos principales: el

sitio antigénico II. La segunda mutación, Val533Met, se encuentra ubicada en la región transmembrana de la proteína F quedando en teoría inaccesible a la interacción con anticuerpos. Sin embargo, este hallazgo resultó interesante en el sentido que la selección de un cambio aminoacídico en esta región podría estar asociado con el mantenimiento de la actividad fusogénica del virus mutante por parte de la región transmembrana en sí misma o por su localización cercana a una de las regiones (heptadas) que participan activamente en la fusión de membranas mediadas por la proteína F.

El único dato previo que se tenía de selección y caracterización de mutantes del VRSH que escapan a la presión por anticuerpos policlonales fue realizado por Sullender y cols ^[190]. Ellos seleccionaron *in vitro* variantes del VRSH resistentes a sueros policlonales de primates dirigidos contra la glicoproteína G. Una mutación en la región transmembrana de la proteína G del VRSH fue encontrada pero el fenotipo resistente no pudo ser atribuido sólo por la presencia de este cambio debido a que otras dos mutaciones también habían sido seleccionadas en la misma proteína viral mutante, de todos modos los autores plantearon que un cambio en esta región podría contribuir a la pérdida de reactividad por anticuerpos neutralizantes ^[190] ^[191].

Cabe destacar, sin embargo, que el mutante VRSH-E1 no había sido purificado previo a la caracterización y esto adquiere relevancia por lo mencionado anteriormente acerca del concepto de cuasiespecies virales. En este sentido, luego de la caracterización preliminar del mutante a nivel molecular observamos que en el VRSH-E1 existía genoma de virus mutante (como población mayoritaria) pero a la vez, y en particular en lo que refiere a la mutación en la región transmembrana, existía genoma de virus salvaje^[189]. Por esta razón para realizar la caracterización del mutante VRSH-E1 a nivel antigénico y genético es importante la obtención del virus mutante puro. De este modo a su vez podremos establecer si el virus con ambas mutaciones es fusogénicamente activo *per se* o si los datos preliminares de actividad fusogénica del virus mutante sin purificar correspondían a la contribución que realizaba la proporción salvaje presente en la mezcla de genomas que componen a este virus. Asimismo consideramos de gran interés analizar la estabilidad de las mutaciones seleccionadas en el virus mutante VRSH-E1.

A su vez dado que el mutante resistente a la neutralización por anticuerpos policlonales obtenido *in vitro* seleccionó una mutación en la región transmembrana, es de interés investigar, cómo la presencia de la mutación Val533Met afecta la funcionalidad de la proteína. Esto contribuye a esclarecer cuáles son los sitios vinculados con el mecanismo de fusión presente en esta glicoproteína de superficie. Cabe aclarar que los estudios que se plantean para este dominio serán realizados únicamente con la proteína recombinante y no con virus recombinantes. Como se mencionó anteriormente no existen estudios relevantes respecto a la participación directa de la región transmembrana en el proceso de fusión en el VRSH. En este sentido la información disponible más cercana respecto a un posible papel de la región transmembrana en el proceso de fusión proviene de estudios realizados con homólogos de la proteína F en otros miembros de la familia *Paramyxoviridae* ^[192, 193]. Los resultados obtenidos a partir de este trabajo serán una primera aproximación entonces al estudio funcional de esta proteína mediante el análisis de la región transmembrana.

Hipótesis de trabajo:

El trabajo está dividido en dos partes de acuerdo a las hipótesis de trabajo:

- i) El mutante VRSH-E1 presenta dos mutaciones las cuales pensamos que no poseen la misma estabilidad. Por tanto, este mutante será sometido a pasajes sin presión para evaluar la permanencia de las mismas. Por su parte, para evaluar si este virus es capaz de vencer la presión y formar sincicios *per se* o en cooperación con proteínas salvajes presentes en el virus sin purificar, es necesaria la purificación y caracterización de este virus y de los virus obtenidos como producto de la purificación.

- ii) Dado que el doble mutante seleccionó una mutación en la región transmembrana es importante evaluar cuál sería la contribución de su selección a la expresión y actividad de la proteína. Ese es el punto de partida para un trabajo exploratorio en el que se incluyen a su vez las mutaciones halladas en el doble mutante junto con otras que consideramos de interés.

Para ello se plantean los objetivos que se detallan en la siguiente sección.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

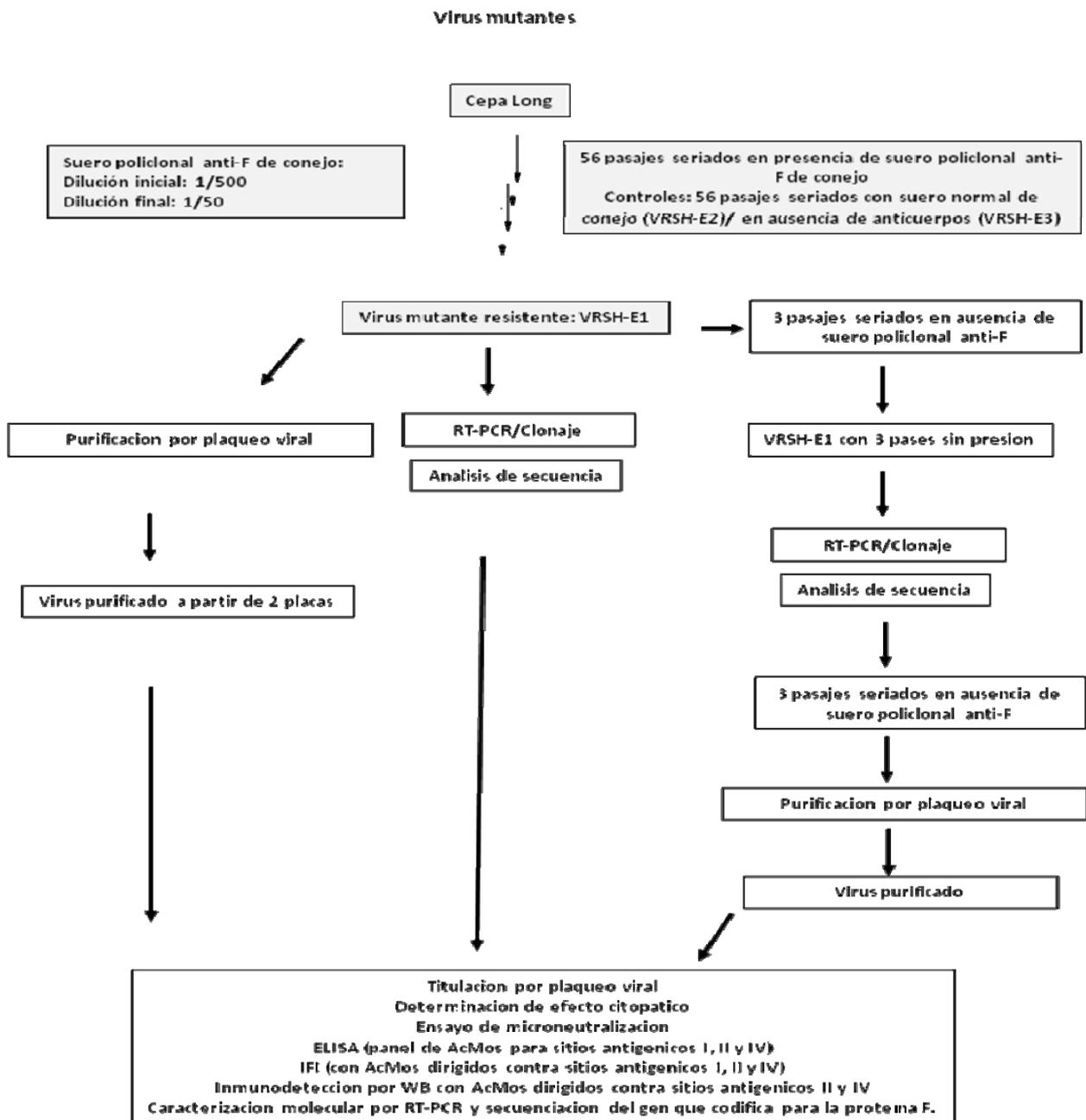
Caracterización de la proteína F en mutantes del VRSH resistentes a la presión por un suero policlonal anti-F y evaluación del efecto de mutaciones puntuales en la expresión y actividad fusogénica de proteínas F recombinantes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analizar la estabilidad en ausencia de presión inmune de las mutaciones seleccionadas en el doble mutante VRSH-E1 resistente a la neutralización por un suero policlonal contra la glicoproteína de fusión.
- 2) Caracterizar antigénicamente el doble mutante VRSH-E1 a fin de reconocer qué sitios antigénicos se ven afectados.
- 3) Purificar mediante plaqueo viral el doble mutante VRSH-E1 para la caracterización antigénica y genética del virus purificado.
- 4) Estudiar el efecto en la expresión y en la capacidad fusogénica de mutaciones puntuales en la región extracelular y transmembrana de proteínas F recombinantes del VRSH así como en proteínas F recombinantes que no posean la región transmembrana.

3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

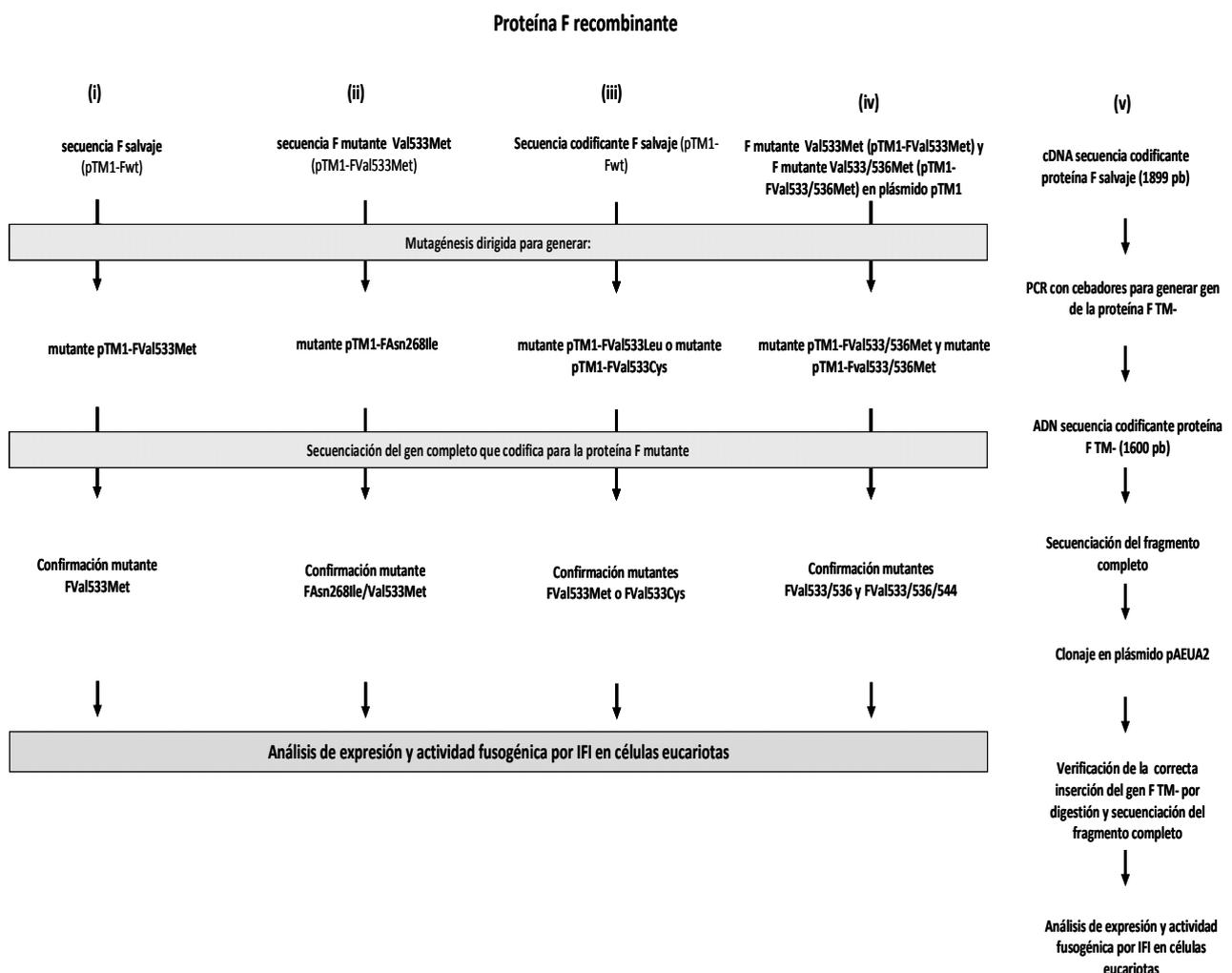
1.



La estrategia experimental para los virus mutantes utilizará como material de partida un virus resistente a la neutralización por un suero policlonal contra la proteína de fusión del VRSH (derivado de la cepa Long) el cual se seleccionó y caracterizó a nivel primario un trabajo previo en el laboratorio^[162, 189]. Este VRSH mutante fue seleccionado luego de 56 pasajes *in vitro* en presencia de cantidades crecientes de un suero policlonal anti-F (1/500-1/50) y fue denominado VRSH-E1^[162, 189]. El análisis de secuencia nucleotídica del gen completo de la proteína F de VRSH-E1 reveló la presencia de dos mutaciones puntuales: Asn268Ile y Val533Met. Dos controles se llevaron a cabo para asignar las mutaciones observadas

en VRSH-E1 a la evasión de la presión por el suero policlonal anti-F. Estos controles fueron obtenidos a partir de virus de la cepa Long luego de 56 pasajes seriados en presencia de suero normal de conejo (VRSH-E2) y en ausencia de anticuerpos (VRSH-E3) para descartar potenciales mutaciones que se originen como resultado del pasaje en presencia de anticuerpos no específicos o que provengan de deriva génica, respectivamente (los recuadros color gris representan lo realizado en el trabajo anterior). En este trabajo en primer lugar se aislará el virus mutante VRSH-E1 con la presión inmune de selección (1/50) para confirmar las mutaciones halladas previamente. Este virus se utilizará en ensayos de titulación así como en ensayos para su caracterización antigénica: inmunofluorescencia (IFI), ELISA y WB. A su vez se analizará la estabilidad de las mutaciones halladas en el doble mutante VRSH-E1 mediante pasajes seriados del virus en ausencia de presión inmune con posterior análisis de secuencia a partir de RT-PCR y clonaje. El virus obtenido de los pasajes en ausencia de suero policlonal anti-F será purificado por plaqueo viral y finalmente se utilizará en los ensayos que se describen para el VRSH-E1 parental junto con su caracterización genética. Asimismo el virus mutante VRSH-E1 será purificado por plaqueo viral y los virus purificados también serán sometidos a ensayos de: titulación, microneutralización, determinación de efecto citopático, ELISA, IFI, WB y RT-PCR para la secuenciación completa del gen que codifica para la proteína de fusión.

2.



La segunda estrategia experimental plantea estudiar el efecto de mutaciones puntuales en la región extracelular y transmembrana de la proteína de fusión del VRSH mediante mutagénesis dirigida y expresión de las variantes mutadas de la proteína F recombinante en células eucariotas. Las mutaciones fueron elegidas para: i) modificar el aminoácido valina por metionina en la posición 533, que corresponde a la mutación hallada en el doble mutante VRSH-E1, ii) mimetizar la variante obtenida en el doble mutante VRSH-E1 (Asn268Ile/Val533Met), iii) alterar la posición aminoacídica 533 sustituyendo el residuo valina por leucina o cisteína, iv) generar dobles y triples mutantes en la región transmembrana sustituyendo dos o los tres residuos de valina por metionina y v) generar una proteína F mutante que no posea la región transmembrana (TM-).

En primer lugar se intentará establecer si la mutación Val533Met en la región transmembrana es capaz, por si misma, de alterar la funcionalidad de la proteína intentando con esto explicar la razón de la selección espontánea de esta mutación en el doble mutante VRSH-E1. A su vez la mimesis de las mutaciones obtenidas *in vitro* Asn268Ile y Val533Met permitirá comparar la expresión/actividad de las proteínas de fusión mutantes en el marco de la infección viral con respecto a proteínas F portando estas mutaciones pero expresadas en células eucariotas.

Por su parte la modificación del aminoácido Val533 por leucina o cisteína se realizará para establecer si la selección de esta mutación en la región transmembrana (aminoácido 533) es relevante ya sea por su localización en esta región o por la naturaleza de su aminoácido. De este modo el residuo Val533 será sustituido por: i) un aminoácido de características fisicoquímicas - en concreto, su carácter hidrofóbico - similares al de tipo salvaje (Val) y al seleccionado por presión inmune (Met), específicamente, Val533→Leu; y ii) otro aminoácido que comparta con el seleccionado en el mutante el hecho de poseer un átomo de azufre pero con diferentes propiedades fisicoquímicas - en concreto, su carácter polar -, específicamente, Val533→Cys. En cuarto lugar dado que la región transmembrana de la proteína de fusión del VRSH posee únicamente tres residuos de valina se generarán mutantes de la proteína F con incorporación de dos y tres mutaciones sustituyendo valina por metionina en los aminoácidos 533, 536 y 544. La elección de los residuos de valina para la sustitución así como el aminoácido metionina como reemplazante fue debido a la presencia de la mutación Val533Met en los dobles mutantes seleccionados. Este ensayo es exploratorio en el sentido que no existen datos previos de modificación de residuos en la región transmembrana de la proteína F del VRSH. Finalmente la construcción de una proteína F recombinante sin la región transmembrana permitirá evaluar de forma aproximada cuál será la contribución de esta región hidrofóbica no sólo a la expresión de la misma sino, en especial a la capacidad fusogénica que tiene la proteína F.

4. METODOLOGÍA

4.1 TÉCNICAS BASADAS EN CULTIVOS CELULARES

4.1.1. MANEJO DE LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS PARA INFECCIÓN VIRAL Y TRANSFECCIÓN

4.1.1.1. HEp-2

La línea celular continua HEp-2 fue crecida con Medio Basal de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con: NaHCO₃ (2.2mg/mL), 1% antibióticos (AB) y suero fetal bovino (SFB) al 10% para crecimiento celular y 2% para mantenimiento de la línea celular. Las células se incubaron a 37°C en estufa con saturación de CO₂ al 5%. La propagación de la línea se realizó cada 48 o 72 horas, empleando una solución de tripsina. La línea celular se almacenó en nitrógeno líquido (-196°C) en una mezcla 9:1 de SFB al 10% y DMSO. Previamente las células fueron pre-enfriadas a 4, -20 y -70°C antes de colocarlas en nitrógeno líquido.

4.1.1.2. BSR-T7

Esta línea celular, es derivada de la línea BHK-21 (de riñón de hamster bebé) transfectada constitutivamente con un plásmido de expresión conteniendo el gen que codifica para la ARN polimerasa del fago T7 y su promotor. Esta línea celular fue cedida por Cozzelmann^[194]. El mantenimiento de la línea estable se realiza mediante el agregado del antibiótico de selección G418 luego de subcultivar las células (alternando una vez con y una vez sin G418). Las condiciones para el crecimiento, mantenimiento y almacenamiento de la línea son las mismas que las descritas para HEp-2.

4.1.2. CRECIMIENTO DEL VIRUS VRSH-E1 EN PRESENCIA DE SUERO POLICLONAL ANTI-F Y PASAJE EN AUSENCIA DE PRESIÓN INMUNE.

El virus doble mutante VRSH-E1 fue seleccionado por pasajes seriados en presencia de concentraciones crecientes de suero policlonal contra la proteína de fusión del VRSH en un trabajo preliminar realizado en el laboratorio^[162, 189] junto con sus controles correspondientes. En el Anexo 1 se detalla el procedimiento para la obtención de este virus mutante resistente a la presión por un suero policlonal anti-F. Como resultado de esta selección, se obtuvieron los siguientes virus que fueron empleados en este trabajo:

- VRSH cepa Long con 56 pases en presencia de suero policlonal contra la proteína F con 2 mutaciones puntuales (Asn268Ile y Val533Met) denominado VRSH-E1^[162, 189].
- VRSH cepa Long con 56 pases en presencia de suero normal de conejo (SNC) denominado VRSH-E2^[189] [162].
- VRSH cepa Long con 56 pases en ausencia de suero inmune denominado VRSH-E3^[162, 189].

Para el aislamiento del virus mutante VRSH-E1, en primer lugar se realizó una neutralización en presencia de suero policlonal anti-F diluido 1/50 durante 1h a 37°C. Posteriormente esta mezcla de neutralización se utilizó para infectar monocapas de células HEp-2 parcialmente confluentes (70% de crecimiento celular aproximadamente) durante 1-2hs a 37°C. Finalmente las células infectadas se dejaron con medio de infección (DMEM suplementado-SFB 2%) con suero policlonal anti-F (dilución 1/50). Los virus control fueron crecidos en idénticas condiciones excepto que el suero policlonal anti-F fue sustituido por suero normal de conejo o DMEM-1%AB para los virus VRSH-E2 y VRSH-E3, respectivamente. Las cepas virales se almacenaron en N2 líquido. Ninguno de los virus antes mencionados había sido previamente purificado.

A su vez el VRSH-E1 aislado en este trabajo en presencia de suero policlonal anti-F diluido 1/50, fue crecido en ausencia de presión inmune durante 6 pasajes utilizando el mismo procedimiento que para el virus control VRSH-E3 sin anticuerpos que se detalla en el Anexo 1.

La cepa de referencia Long (perteneciente al grupo A, adaptada a cultivos) que dio origen a los virus mutantes seleccionados también fue crecida al igual que los virus VRSH-E1, VRSH-E2 y VRSH-E3 pero sin la etapa de neutralización y sin la incorporación de anticuerpos.

4.1.3. PURIFICACIÓN Y TITULACIÓN POR PLAQUEO VIRAL

Este ensayo fue empleado para la purificación de los virus mutantes seleccionados en estudios previos y en el presente trabajo: VRSH-E1, y VRSH-E1 luego de 6 pasajes en ausencia de anti-F, así como para los virus control: VRSH-E2 y VRSH-E3. Una vez purificados, los virus fueron titulados utilizando nuevamente el ensayo de plaqueo viral. Este protocolo de purificación/titulación fue adaptado de J.L. McKimm-Breschkin^[195] con sugerencias de esta investigadora.

Entre 4,8- 6 x 10⁵ de células HEp-2 fueron sembradas en cada uno de los pocillos de una placa de 6 pocillos. A las 24hs las células fueron lavadas 3 veces con medio de lavado (DMEM + 1% AB) e incubadas con cada uno de los virus seleccionados diluidos en medio de lavado en diluciones seriadas en base 10 (-1, -2, -3, -4, -5). Se dejó un pocillo como control de células. El inóculo se dejó en contacto con las células durante 4hs a 37°C en estufa de CO₂, con agitación suave cada 30 minutos. Luego de la adsorción, se retiró el inóculo y las células se lavaron 3 veces con medio de lavado antes de agregar el medio de plaqueo viral. Al medio de plaqueo viral se le agregó suero policlonal anti-F o suero normal de conejo, en una dilución 1/500 en cada caso correspondiente. Luego de 7 días de incubación (a 37°C en estufa de CO₂) las placas virales se visualizaron en microscopio óptico (Nikon).

Para la purificación se eligieron aquellas placas virales que estuvieran lo suficientemente aisladas y las placas se picaron utilizando una punta azul cortada como sacabocado. El trocito de agarosa obtenido, correspondiente a la placa seleccionada, se colocó en un tubo de microcentrífuga (Epp). El sitio donde se

encontraba la placa viral se lavó con 30uL de medio de lavado y se colocó junto con el trocito de agarosa en el tubo correspondiente. Posteriormente se agregaron 300uL de medio de lavado más y se vortexeó para solubilizar la agarosa guardándose luego a -80°C. 50uL de este “virus purificado” fue incubado 1h a 37°C con 450uL de medio de lavado conteniendo suero policlonal anti-F (1/50), SNC (1/50) o sin Acs en cada caso correspondiente. El producto de esta incubación se utilizó para infectar células HEp-2 crecidas en una placa de 12 pocillos (M12). Se dejó adsorber 1h a 37°C y se completó luego con medio de infección + anti-F (1/50), SNC (1/50) o sin Acs. Los virus purificados presentes en los pocillos de la placa M12 que presentaron buen ECP fueron cosechados para la extracción de ARN (ver Metodología 4.3.1), y para volver a infectar monocapas de células HEp-2 en placas de 60mm en las mismas condiciones que se utilizaron para infectar la placa M12. Al igual que en el caso anterior una vez observado un buen ECP el virus fue cosechado para realizar la extracción de ARN y de proteínas (ver Metodología 4.3.1), y se guardó el virus restante en N₂ líquido.

La titulación de los virus purificados se realizó utilizando el mismo protocolo que para la purificación. Para este ensayo luego de los 7 días de incubación en las placas de 6 pocillos, las células fueron fijadas con formaldehído al 1% en NaCl 0,15M durante 24hs. Posteriormente las placas se sumergieron en H₂O para eliminar la agarosa y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 1% en EtOH 20%. El título viral se expresó en UFP/mL. En el ensayo de titulación también se incluyó el mutante VRSH-E1 sin purificar y la cepa de referencia Long.

4.1.4. ENSAYO PARA OBSERVACIÓN DE EFECTO CITOPÁTICO DE LOS VIRUS TITULADOS

Una vez titulados, los virus fueron utilizados para infectar monocapas de células HEp-2 sembradas en placa de 24 pocillos a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,05 para observación y registro del efecto citopático de cada uno. Para ello se infectaron 5 pocillos para cada uno de los virus en presencia de suero policlonal anti-F 1/50, suero normal de conejo y en ausencia de anticuerpos según corresponda.

4.1.5. ENSAYO DE MICRONEUTRALIZACIÓN

Este ensayo se empleó con el fin de confirmar la pérdida de la capacidad neutralizante del suero policlonal anti-F sobre los mutantes seleccionados.

Para el ensayo de microneutralización 1000 UFP de los virus mutante y control, previamente titulados y purificados, se enfrentaron con diluciones del suero policlonal anti-F 1/1000, 1/500, 1/250, 1/150, 1/100 y 1/50 por 1 hora a 37°C (neutralización)^[179]. Estas soluciones virales neutralizadas se utilizaron para inocular células HEp-2 crecidas en placa de 96 pocillos por triplicado durante 1h a 37°C. Para cada dilución se incluyó un control de virus sin anti-F y un control negativo de células HEp-2 sin infectar, ambos también por triplicado. Posteriormente, el inóculo fue removido, las células se lavaron con PBS y se agregó medio de infección suplementado con el anti-F en la dilución correspondiente excepto en los

pocillos control. Luego de 72hs de incubación las células se lavaron con PBS-Tween 20 (0.05%) y se fijaron y permeabilizaron con acetona 80% en PBS pre-enfriada durante 15 minutos a 4°C. El bloqueo se realizó agregando una solución de PBS- suero de cerdo al 5%- Tween 20, 0.05%, 30' a 37°C. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS-Tween 20, 0.05%. El anticuerpo monoclonal 021/21G diluído 1/5000 en solución de bloqueo se incubó 1h 37°C y fue utilizado como anticuerpo primario^[196]. Posteriormente se lavó 5 veces con PBS-Tween 20, 0.05% y se incubó con un anti-IgG de ratón conjugado con biotina como anticuerpo secundario (1h 37°C, dilución 1/5000 en PBS-suero de cerdo 5%). Luego de 3 lavados con agua destilada, se incubó con estreptavidina-peroxidasa (dilución 1/500 en PBS-suero de cerdo 5%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó 5 veces con agua destilada y el ensayo fue revelado con el sustrato OPD + 0.015% H₂O₂ en buffer fosfato- citrato pH 5,0. La reacción se detuvo empleando H₂SO₄ 3N. Las placas se leyeron a una densidad óptica de 492nm en espectrofotómetro (Varioskan). La absorbancia neta para cada uno de los virus fue calculada promediando los 3 valores obtenidos para cada concentración de anti-F y a este valor se le restó el valor promedio de las absorbancias correspondientes a los controles celulares.

4.2. TÉCNICAS SEROLÓGICAS

4.2.1. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

4.2.1.1. Preparación de láminas de IFI a partir de infección de células HEp-2 con VRSH mutantes y control.

Monocapas de células infectadas con los virus control y mutantes purificados así como virus de la cepa de referencia Long se rasparon, tomándose 500uL del cultivo, se colocaron en tubos Epp y se centrifugaron 10' a 1000 x g. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo. Los pellet celulares se resuspendieron posteriormente en la cantidad mínima de PBS (entre 500-800uL) y la suspensión se colocó en cada uno de los pocillos de la lámina portaobjeto (aprox. 30-50uL) y se dejó secar. Como control del ensayo se incluyeron pocillos conteniendo suspensiones de células sin infectar.

4.2.1.2. Preparación de láminas de IFI a partir de transfección de células BSR-T7 con plásmidos que expresan proteínas F del VRSH recombinantes.

Monocapas de células BSR-T7 fueron transfectadas con pTM1-F salvaje y mutantes o pAEUA2-F TM(-) como se describe en Metodología 4.3.7.4.

4.2.1.3 Protocolo IFI

Las células infectadas o transfectadas fueron colocadas en portaobjeto o crecidas en un sustrato adecuado para IFI (cámara de 8 pocillos o en un cubreobjetos) y se fijaron con paraformaldehído (PAF) 4% durante 30' a 37°C. El PAF se removió mediante 2 lavados de 10' con PBS, para incubar luego con 500uL de una solución 50mM de NH₄Cl durante 10' a TA. Esta solución se eliminó posteriormente mediante lavados con PBS (3 lavados de 10' cada uno). A continuación las células fueron permeabilizadas con 500uL de Tritón X-100* al 0,3% durante 5' a TA, y se eliminó mediante 3 lavados con PBS (10'). Los pocillos se bloquearon con PBS-leche en polvo 5% a 37°C durante 1h luego de la cual se lavaron 3 veces con PBS durante 10'. Posteriormente se agregaron 50uL de los anticuerpos monoclonales, diluidos en PBS-SAB 1% los cuales se incubaron durante 30' a 37°C en cámara húmeda. Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron: 2F (1/50) y 44F (1/50) pertenecientes al sitio antigénico I; 47F (puro), 11F (1/100) y 7C2 (1/1000) pertenecientes al sitio antigénico II y 19F (1/100) perteneciente al sitio antigénico IV/V/VI. Las láminas se lavaron luego 3 veces con PBS durante 10' y se agregaron 50uL del anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fluorocromo. Se utilizó indistintamente isotiocianato de fluoresceína (ITCF) (diluído 1/50 en PBS) o Alexa Fluor® 488 (diluído 1/500 en PBS) como anticuerpos secundarios conjugados. Se utilizó asimismo el fluoróforo Alexa Fluor® 568 (diluído 1/500 en PBS) en aquellas láminas donde hubiera también emisión de fluorescencia a la misma λ que los fluorocromos mencionados anteriormente. En todos los casos estos anticuerpos secundarios fueron incubados 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. El conjugado fue removido mediante 3 lavados de 10' con PBS. Finalmente las láminas se montaron con anti-fade (Dabco) con DAPI, eliminándose por completo el exceso y se sellaron con esmalte de uñas. Las láminas se observaron en microscopio de epifluorescencia (Nikon) utilizando filtros para DAPI, Alexa 488 y Alexa 568. Las imágenes fueron capturadas y procesadas utilizando los programas Image J e Image Pro. En algunos casos también se tomaron fotografías en campo claro (sin filtro UV). Las láminas no procesadas en el momento se guardaron (una vez fijadas) a -80°C mientras que las láminas procesadas se conservaron a -20°C.

4.2.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

4.2.2.1. Preparación de extractos celulares a partir de células infectadas con VRSH.

Monocapas de células HEp-2 infectadas con: a) virus mutantes (plaqueados y sin plaquear), b) virus control (crecidos en presencia de SNC y en ausencia de Acs), c) virus de la cepa Long de partida todos presentando un efecto citopático evidente, y d) células HEp-2 sin infectar, se cosecharon y centrifugaron 5' a 1000 x g. Los pellet obtenidos se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en buffer de lisis. Posteriormente se sonicaron 40'' en baño de hielo y el extracto fue clarificado mediante centrifugación a 11000 x g durante 5'. Se recuperaron los sobrenadantes y se guardaron a -20°C para su uso posterior.

4.2.2.2. Ensayo de reactividad por ELISA

Los extractos obtenidos en la sección anterior (Metodología 4.2.2.1) se emplearon como antígeno en la técnica de ELISA utilizando placas de 96 pocillos Nunc-Polysorp. Estos extractos se incubaron toda la noche a 4°C. Los pocillos se saturaron luego con PBS-SAB al 1% durante 30-45' a temperatura ambiente. Luego se incubaron con 50µL de los siguientes anticuerpos monoclonales: 2F (1/1000), 47F (1/50), AK13A2 (1/10000), 11 (1/1000), 7C2 (1/100000), 13 (1/5000) y 19 (1/1000) dirigidos contra la proteína F; 021/21G (1/5000) y 63G (1/500) dirigidos contra la proteína G y 1BC11 (1/100) como control negativo, durante 1h a 37°C diluidos en PBS-SAB 0.1%. Se lavó la placa 3 veces con agua destilada y posteriormente se incubó durante 1h a 37°C con el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con biotina, diluido 1/5000 en PBS-SAB 0.1% y luego con estreptavidina-peroxidasa (diluída 1/500 en PBS-SAB 0.1%) incubada 30'a temperatura ambiente previo lavado 3 veces con agua destilada entre ambas incubaciones. Posteriormente la placa se lavó 5 veces con agua destilada. La reacción se reveló con el sustrato OPD (ver Metodología 4.1) leyéndose a 492nm. El desarrollo de color se detuvo empleando H₂SO₄ 3N.

4.2.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (SDS-PAGE). TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANA DE NITROCELULOSA PARA SU INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT)

Para este ensayo las muestras empleadas fueron las mismas que las utilizadas en Metodología 4.2.2. y la concentración de proteínas en estas muestras fue dosificada por ensayo de Bradford 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 1 µg/µL, incubándose previamente a 100°C durante 5'. 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' previo a su siembra en el gel. Las proteínas presentes en estos lisados se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones denaturalizantes. La corrida electroforética se realizó en buffer Tris-Glicina pH 8,3 en las siguientes condiciones: 20mA/gel para el gel concentrador (aproximadamente 20') y 25mA/gel para el gel separador (el tiempo necesario para que el frente de corrida alcance el borde del gel). Las proteínas presentes en el gel separadas durante la electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C, GE Healthcare) en una cuba de transferencia (Tank Unit Transfer TE 22 GE Healthcare) conteniendo el buffer de transferencia, durante 1h 30' 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 para quitar el rojo ponceau. 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%. Los AcMos utilizados fueron: 18B2 (1/30) y 19F (1/60), ambos dirigidos contra la proteína F, y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente. Los AcMos fueron removidos mediante 3 lavados con PBS-Tween 20 0,3% con agitación vigorosa durante 5'. El anticuerpo

secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa 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 y expuesto a una placa autorradiográfica (Hyperfilm ECL Amersham-GE Healthcare) durante un tiempo de exposición de 1, 2 y 20 minutos.

4.3 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

4.3.1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL POR EL MÉTODO DEL TRIZOL® A PARTIR DE CÉLULAS INFECTADAS

Monocapas de células HEp-2 (crecidas en botellas de 75cm²) infectadas con a) virus mutantes (plaqueados y sin plaquear), b) virus control (crecidos en presencia de SNC y en ausencia de Acs), c) virus de la cepa Long de partida, y d) células HEp-2 sin infectar, se rasparon 48-72hs luego de la infección al observarse un marcado efecto citopático.

Luego de centrifugar 5' a 1000 x g, el pellet celular se lavó con PBS y se volvió a centrifugar (5' a 1000 x g). Finalmente se le adicionó 1mL de Trizol® empleado para la extracción del ARN total. Posteriormente se agregaron 0.2 mL de cloroformo por mL de Trizol®, se dejó incubar 3' y se centrifugó (15'/4°C/11000 x g). Se recuperó posteriormente la fase superior donde se encuentra el ARN total, en un tubo Epp limpio. El ARN luego se precipitó en presencia de isopropanol (0.5mL por mL de Trizol®), dejándose 10' a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10' a 11000 x g (4°C). Se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol 75% al ARN precipitado (por mL de Trizol®). Se centrifugó 2' a 11000 x g (4°C), se retiró el sobrenadante, se secó ligeramente el pellet resuspendiéndose finalmente en 50µL de H₂O estéril comercial. El ARN posteriormente fue almacenado a -80°C.

4.3.2 SÍNTESIS DE ADNc (RT), AMPLIFICACIÓN DEL ADNc MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS.

4.3.2.1. Retrotranscripción del ARN extraído

Previo a la amplificación del ADN, se sintetizó el ADNc correspondiente al ARNm de la proteína F mediante retrotranscripción a partir del ARN total (ver Metodología 4.3.1). Para ello 1µL del oligonucleótido F1899 EcoRI(-) (Tabla 1), en una concentración 500µg/mL fue incubado con aproximadamente 2µg de ARN total y 1µL de una solución conteniendo una mezcla equimolar de los cuatro dNTPs (10mM cada uno). Finalmente se agregó H₂O estéril comercial hasta un volumen de 12µL. Esta mezcla fue incubada a 65°C durante 5' y posteriormente colocada en un baño de H₂O-hielo. Luego se agregaron 4µL buffer First Strand 5x y 2µL DTT (0.1M). Esta mezcla fue pre-incubada durante 2'a 42°C y se agregó 1µL de la transcriptasa reversa Superscript II RNase H⁻ (200U/µL) completándose en 20µL el volumen

final de reacción. Esta reacción se incubó 50' a 42°C y a 70°C durante 15'. Esta reacción se realizó en un termociclador (Thermo Scientific y/o Eppendorf).

4.3.2.2. Amplificación del ADNc por PCR

El ADNc obtenido en esta reacción se utilizó como molde en la reacción de amplificación por PCR. Para ello se incuban: 5µL buffer PCR 10x, 1.5µL MgCl₂ (50mM), 1µL de dNTPs (10mM), 1µL de cada uno de los cebadores (10µM), 0.4µL de la ADN polimerasa recombinante Taq (5U/µL), 2µL del ADNc y finalmente se agrega H₂O estéril comercial hasta alcanzar un volumen final de 50µL. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen completo de la proteína F del VRS fueron el F1Bam (+) y el F1899 EcoRI (-) (Tabla 1). Las condiciones para llevar a cabo la reacción de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 5' y 25 ciclos de: desnaturalización a 94°C durante 1'30'', hibridación a 55°C durante 1'30'' y extensión a 72°C durante 1'30''. Finalmente se realiza una extensión final a 72°C durante 7'. Esta reacción también se realizó empleando un termociclador (Thermo Scientific y/o Eppendorf).

4.3.2.3. Electroforesis de ácidos nucleicos

Los productos de la RT-PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% empleando buffer TBE 1x como buffer de corrida y una diferencia de potencial de 100V. Los geles se tiñeron con el agente intercalante bromuro de etidio de modo que las bandas de ADN pudieran ser visualizadas mediante luz ultravioleta. Las fotografías de los geles se tomaron mediante una cámara digital KODAK DC290. Como marcador de peso molecular se utilizó 1kb Ready Load (Invitrogen).

4.3.3. PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para la purificación de ácidos nucleicos se empleó el kit comercial NucleoSpin Extract II. Los productos de PCR (o plásmidos) se analizaron en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1x. Las bandas de ADN se cortaron del gel, se pesaron y se colocaron en tubos Epp a los que se le adicionó el buffer NT. Esta mezcla se incubó 10 minutos a 50°C empleando vortex para ayudar a la completa disolución de la agarosa. Luego la muestra se colocó en una columna (NucleoSpin Extract II Columns) del kit comercial y se centrifugó 1' a 11000 x g. El ADN retenido en la columna se lavó con 600uL de buffer NT3 conteniendo etanol 96-100%(Dorwil®) y se centrifugó 1'a 11000 x g. Finalmente luego de una segunda centrifugación de 2' a 11000 x g, el ADN se eluyó con 15-50uL (según el caso) de H₂O estéril comercial precalentada a 60-70°C mediante 1-2' de centrifugación a 11000 x g. Los productos de purificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las muestras de ADN purificadas se conservaron a -20°C. Para la cuantificación de ADN se empleó un espectrofotómetro, $\lambda = 260$ y $\lambda = 260/280$ (Nanodrop) aunque en algunos casos se cuantificó por intensidad de banda en gel de agarosa empleando 5uL de Fast Ruler.

4.3.4. SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La secuenciación del ADN correspondiente al gen completo de la glicoproteína F del VRSH se realizó utilizando secuenciadores automáticos Applied Biosystems 3730xl de la empresa MacroGen Inc (Corea). Los oligonucleótidos empleados para la secuenciación del gen completo de la proteína F fueron los siguientes: F597 (-), F844 (-), F665 (+), F1069 (+), F1899EcoRI (-) (Tabla 1) en una concentración 5µM. Estos cebadores se disponen en el molde como se muestra en la figura (Fig. 6) para cubrir todo el gen.

Las secuencias obtenidas tanto de los mutantes seleccionados así como de los controles fueron analizadas por medio del programa informático Bioedit.

Nombre	Secuencia	Posición en el gen F
F1Bam (+)	5'CGGGATCCC-GGGGCAAATAACAATGG 3'	1- 17
F597 (-)	5'-GGTCTAACACTTTGCTGG-3'	579-597
F844 (-)	5' TGTCTAACTATTTGAACA 3'	844- 861
F665 (+)	5'-GAAACTGTGATAGAGTTCC-3'	665-683
F1069 (+)	5'- CCCACAAGCTGAAACATG-3'	1069-1086
F1306 (-)	5'GATTCCACGATTTTTATTGG 3'	1287- 1306
F1899EcoRI (-)	5'CGGAATTCG-ATATACTATAAACTAGG 3'	1882- 1899

Tabla 1: Oligonucleótidos empleados para la retrotranscripción, amplificación y secuenciación del gen completo de la proteína F. Los signos (+) y (-) indican si la secuencia del oligonucleótido corresponde a la secuencia del ARNm del gen F (signo +) o si corresponde a la secuencia complementaria (signo -).

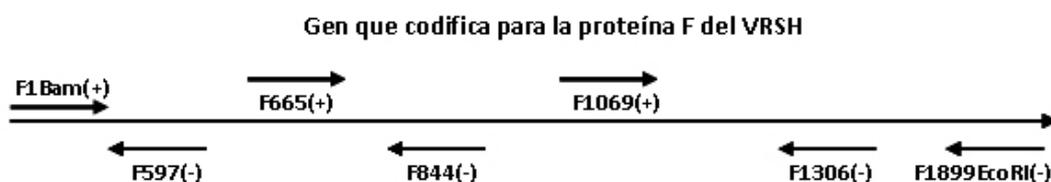


Figura 6: Esquema de la localización de los cebadores: F1Bam(+), F597(-), F665(+), F844(-), F1069(+), F1306(-) y F1899EcoRI (-) utilizados para la secuenciación del gen completo que codifica para la proteína F del VRSH.

4.3.5. PREPARACIÓN DE CÉLULAS DH5α Y XL-1 BLUE COMPETENTES

Se realizó una competencia química de las células bacterianas DH5α (*E.coli*) y XL-1 blue utilizando el método de CaCl₂. A partir de 500uL de un pre-cultivo fresco de células DH5α no competentes en medio LB se produjo un cultivo de 50mL de bacterias. Este cultivo se incubó a 37°C con agitación durante 2-3hs y se

midió turbidez en espectrofotómetro ($\lambda = 600\text{nm}$) hasta un valor entre 0,3 y 0,4. El cultivo se transfirió luego aseptícamente a tubos de centrifuga (tipo Falcon) pre-enfriados y se colocaron en baño H₂O-hielo (0°C) durante 10'. Se centrifugó posteriormente durante 10' a 3000 x g a 4°C. El pellet bacteriano se resuspendió luego en 10mL de CaCl₂ 0,1M frío estéril y se incubó durante 30' en hielo. Posteriormente las bacterias se centrifugaron a 3000-6000 x g durante 15' a 4°C y el pellet se resuspendió nuevamente en CaCl₂ 0,1M frío estéril pero en un volumen de 2mL. Se alicuotaron 200uL de bacterias competentes en tubos Epp conteniendo 50uL de glicerol, se congelaron en N₂ líquido y se guardaron a -80°C. La eficiencia de transformación (transformantes/ug) se calculó como el número de colonias en placa/ng de ADN plaqueado x 1000ng/ug. Como control se utilizó el plásmido pUC19 superenrollado de concentración conocida, 50pg/uL.

4.3.6. CLONAJE EN PLÁSMIDO pJET1.2/BLUNT DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE VIRUS MUTANTES SIN PLAQUEO VIRAL

4.3.6.1. Ligación del plásmido pJET-1/Blunt con productos de PCR con extremos romos.

Con el fin de analizar la proporción de genes F mutantes y salvaje para los distintos mutantes seleccionados se clonaron los productos de PCR en el plásmido pJET1.2/Blunt (Anexo 3 mapa 1). Para la ligación 1uL del producto de PCR sin purificar fue mezclado con 10uL del buffer de reacción 2x, 1uL de DNA blunting Enzyme y H₂O estéril comercial hasta un volumen de 18uL. La mezcla se incubó a 70°C durante 5', colocándose posteriormente en hielo durante varios segundos. A continuación se agregó 1uL del vector pJET1.2/Blunt junto con 1uL de T4 DNA ligasa (5U/uL). La ligación se incubó a 22°C durante 30'.

4.3.6.2. Transformación de bacterias competentes XL-blue con plásmidos pJET1.2/Blunt conteniendo el gen completo de la proteína F del VRSH.

El producto de ligación obtenido en Metodología 4.3.6.1 fue empleado para transformar células *E. coli* XL-Blue competentes. 50uL de bacterias XL-blue fueron transformadas con 1-2uL del producto de ligación.

La transformación se realizó mediante choque térmico: 30' hielo/ 1'30'' a 42°C/ 2' hielo. Posteriormente se agregaron a la mezcla de transformación 50uL de medio LB, plaqueándose directamente en LB agar conteniendo ampicilina (LB agar-ampi). Estas placas se incubaron durante 16hs a 37°C.

4.3.6.3. Producción y purificación de los plásmidos pJET1.2/blunt conteniendo las variantes del gen de la proteína F presentes en los productos de PCR.

Diez colonias presentes en placas LB-ampi de las distintas muestras se picaron para crecer en 3mL de LB con ampicilina (100ug/mL) durante 16hs a 37°C con agitación (200-220rpm). 750uL de bacterias fueron conservadas con 250uL de glicerol a -80°C. La extracción del ADN plasmídico se realizó empleando

el kit NucleoSpin® Plasmid, resuspendiendo el ADN en un volumen final de 50uL de H₂O estéril comercial previamente calentada a 60-70°C. Finalmente el ADN plasmídico extraído fue analizado en electroforesis en geles de agarosa al 1% para verificar la eficiencia del clonaje. Las muestras se corrieron junto a un marcador de peso molecular de 1kb.

4.3.6.4. Secuenciación del gen de la proteína F clonado en vector pJET1.2/blunt.

La secuenciación se realizó exactamente igual que lo descrito en Metodología 4.3.4. Los cebadores empleados en este caso fueron F1Bam+, F597-, F665+, F844-, 1069+, 1899EcoRI- (Tabla 1) junto con los cebadores aportados por el kit correspondientes a los sitios de clonaje del plásmido (pJET for y pJET rev).

4.3.7. PRODUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pTM1-F MUTANTES: Val533Met, Asn268Ile/Val533Met, Asn268Ile, Val533Leu, Val533Cys, Val533Met/Val536Met y Val533Met/Val536Met/Val544Met.

4.3.7.1. Mutagénesis dirigida para la producción de simples, dobles y triples mutantes.

El plásmido pTM1-Fwt es un plásmido derivado del pTM1^[197] y posee clonada la secuencia codificante de la proteína de fusión salvaje del Virus Respiratorio Sincicial humano (VRSH), bajo el promotor de la polimerasa T7 (Anexo 3 mapa 2). La secuencia codificante de la proteína F del VRSH salvaje clonada en el plásmido pTM1-Fwt fue blanco de mutagénesis dirigida para la generación de simples, dobles y triples mutantes en la región antigénica II y en la región transmembrana de esta proteína.

Brevemente 50ng de ADN plasmídico (pTM1-F salvaje, simple o doble mutante que será blanco de mutagénesis dirigida) se incubó con: 10uL buffer Phusion GC 5x, 1uL dNTPs (10mM), 0,5uM de cada uno de los cebadores, 2U de la ADN polimerasa Phusion® High-Fidelity y H₂O estéril comercial hasta completar un volumen de reacción de 50uL. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 98°C 30"; (98°C 10", 55°C 30", 72°C 7) x 30 ciclos; 72°C 10. Luego de esta reacción, se separó un 10% del volumen para analizar si hubo amplificación por electroforesis en gel de agarosa mientras el resto se digirió con la enzima de restricción DpnI (10U/uL) para eliminar el ADN parental. Sólo si se observa producto de amplificación por PCR es que se procede con el paso siguiente de producción y purificación de los plásmidos pTM1-F conteniendo las variantes de la proteína F.

Sólo una ronda de mutagenesis permitió la obtención de los simples mutantes: Val533Met, Asn268Ile y Val533Leu. A partir de Val533Met se produjeron dos dobles y un triple mutante: Asn268Ile/Val533Met, Val533/536Met y Val533/536/544Met, y a partir de Val533Leu se produjo el simple mutante Val533Cys.

Todos los ADN molde de partida (simples mutantes y el doble mutante Val533/536/Met) para las subsiguientes mutagénesis fueron confirmados por secuenciación previo a su utilización.

4.3.7.2. Diseño de cebadores para mutagénesis dirigida.

El diseño de cebadores se realizó de forma manual utilizando la secuencia de la proteína de fusión salvaje correspondiente a la cepa de referencia Long del VRSH. Dichas secuencias fueron analizadas a los efectos de descartar la formación de estructuras secundarias y finalmente fueron encargados a la empresa Integrated DNA Technologies (IDT, USA). El diseño de cebadores para la mutagénesis dirigida se detalla en el Anexo 2. En la tabla 2 se muestran los cebadores utilizados para la generación de simples, dobles y triples mutantes a partir del pTM1-Fwt.

Simples mutantes	
Asn268Ile	5' CATTAAATCAATGATATGCCTATAACAATTGATCAGAAAAAGTTAATGTCCAAC-3'
GCAasn268Ile	5'-GTTGGACATTAACCTTTTCTGATCAATTGTTATAGGCATATCATTGATTAATG-3'
Val533Met	5'-TAACTACTATAATTATAATGATTATAGTAATATTG-3'
GCV533Met	5'-CAATATACTATAATCAATATAATTATAGTAGTTA-3'
Val533Leu	5'-TAACTACTATAATTATAATGATTATAGTAATATTG-3'
GCV533Leu	5'-CAATATACTATAATCAATATAATTATAGTAGTTA-3'
Leu533Cys	5'-TAACTACTATAATTATAATGATTATAGTAATATTG-3'
GCV533Cys	5'-CAATATACTATAATGATATAATTATAGTAGTTA-3'
Dobles mutantes *	
Val536Met	5'-ATAATTATAATGATTATAATGATTATTGTTATCATTAAATT-3'
GCV536Met	5'-AATTAATGATAACAATATCATTATAATCATTATAATTAT3'
Triples mutantes	
Val544Met	5'- TTGTTATCATTAAATTGCTATGGACTGCTCCTATACTGT-3'
GCV544Met	5'-ACAGTATAGGAGCAGTCCATAGCAATTAATGATAACAA-3'

Tabla 2: Lista de oligonucleótidos diseñados para realizar la mutagénesis dirigida de la secuencia codificante de la proteína F del VRSH clonada en el plásmido pTM1-F con el fin de generar simples (Val533Met, Asn268Ile, Val533Leu y Val533Cys), dobles (Asn268Ile/Val533Met y Val533/536Met) y un triple mutante (Val533/536/544Met). En rojo se señalan las mutaciones presentes en los cebadores con respecto a la secuencia original. *Para generar el doble mutante Asn268Ile/Val533Met se utilizaron los mismos cebadores empleados para la generación de los simples mutantes: Val533Met y Asn268Ile.

4.3.7.3. Producción y purificación de los plásmidos pTM1-F conteniendo las variantes de la proteína F

La producción de los plásmidos pTM1-F conteniendo las variantes mutadas de la proteína F del VRSH se realizó tanto en células DH5α como en XL-1 Blue competentes (ver Metodología 4.3.5.).

Para la transformación se descongeló una alícuota de bacterias DH5α o XL-1 blue en hielo. Se colocaron 125uL de bacterias competentes en tubo de polipropileno en hielo. Posteriormente se agregaron 40ng del ADN plasmídico para transformar las bacterias competentes. La transformación se realizó por choque térmico: 15' hielo/1'30" a 42°C/5'hielo. Posteriormente se agregó 1mL de LB y se incubó durante 1h a 37°C. Finalmente 100uL de este cultivo se utilizaron para sembrar placas de LB agar-ampi. Las placas se incubaron 16-18hs en estufa a 37°C. Las colonias obtenidas se picaron y se crecieron en

tubos con 3mL LB con ampicilina. A partir de estos minicultivos se realizó la extracción del ADN plasmídico (según Metodología 4.3.6.3). La cantidad de ADN plasmídico se midió en espectrofotómetro o Nanodrop ($\lambda = 260\text{nm}$). Este será el material de partida a partir del cual se realizaron las mutagénesis dirigidas para obtener las variantes de las proteínas F recombinantes.

Los plásmidos pTM1-F conteniendo las variantes generadas por mutagénesis dirigida fueron purificados según Metodología 4.3.6. El ADN plasmídico purificado fue cuantificado y posteriormente se determinó la secuencia del gen correspondiente a la proteína F completa a fin de evaluar la correcta inserción de las distintas mutaciones ensayadas así como el mantenimiento inalterado del resto de la secuencia. La secuenciación se realizó con los cebadores descritos en Metodología 4.3.4.

Posteriormente se realizó un escalado de los cultivos bacterianos conteniendo los distintos mutantes a fin de disponer de cantidades de plásmidos adecuadas para los ensayos de expresión y actividad fusogénica. Para ello se empleó el kit QIAGEN Plasmid Maxi Prep el cual permite obtener cantidades de ADN del orden de los μg .

4.3.7.4 Expresión transitoria de proteínas F en sistema de expresión eucariota con los plásmidos pTM1-F salvaje y mutantes.

Para la expresión de proteínas F salvaje (wt) y mutantes recombinantes, el sistema de expresión eucariota elegido fue el que utiliza células de la línea BSR-T7^[194].

Brevemente 4×10^4 células BSR-T7 fueron sembradas en cada uno de los pocillos de la cámara de 8 pocillos (1.5×10^5 células para las p60) en presencia de medio de crecimiento (DMEM suplementado + 10% SFB). A las 24hs se les cambió el medio de crecimiento a medio de lavado, incubándolas 1h en estufa con saturación de CO_2 a 37°C . Para la transfección se utilizó el kit de transfección MBS Mammalian Transfection kit (Stratagene®, La Jolla, CA). Las células se incubaron con 250 μL (500 μL para p60) de medio DMEM suplementado con: 6% MBS (suero fetal bovino modificado), 2% glutamina y 0,5% AB en estufa de CO_2 a 37°C . La mezcla de transfección se realizó en tubos de poliestireno a los que se le agregaron (por pocillo de la cámara): 1 μg de ADN plasmídico (con la secuencia codificante de la proteína F salvaje o mutante), purificado y cuantificado, 1,25 μL de la solución 1 conteniendo CaCl_2 , 12,5 μL de la solución 2 (ambas soluciones vienen con el kit) y H_2O estéril comercial hasta 25 μL *. La mezcla de transfección se incubó a temperatura ambiente durante 20' para permitir la adecuada formación del precipitado de ADN- CaPO_4 y se agregó en las células conteniendo el DMEM suplementado + MBS, gota a gota moviendo la cámara con movimiento circular suave. Se incubó durante 4hs en estufa de CO_2 a 37°C . Posteriormente se retiró el sobrenadante, las células se lavaron 2 veces con PBS y finalmente se agregó DMEM suplementado + 2% SFB incubándose en estufa de CO_2 a 37°C durante 48hs.

Como control de transfección se empleó el plásmido pAEUA2 que posee el gen que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP) (Anexo 3 mapa 3). Este ensayo se detuvo a las 24hs, se quitó el DMEM suplementado + 2% SFB y se observó directamente en microscopio de epifluorescencia con filtro adecuado. Se contaron entonces la cantidad de células fluorescentes verdes como medida de eficiencia de transfección.

* la mezcla de transfección para las placas de 60mm² fue la siguiente: 5ug ADN, 25uL solución 1, 250uL solución 2 y H₂O hasta 500uL.

4.3.8. CLONAJE DE LA PROTEINA FTM- EN PLÁSMIDO pAEUA2

4.3.8.1. Producción del pAEUA2

5,5 ug del vector pAEUA2 (Anexo 3 ver mapa 3) se digirieron con 20U de las enzimas de restricción NheI (3uL) y XbaI (2uL) junto con el buffer 2 10x (NEB) y BSA para realizar la doble digestión. El volumen de la mezcla de digestión fue de 100uL y se incubó de 1 a 2hs a 37°C en baño líquido. Cuando transcurrió la primera hora de digestión se tomaron 1,5uL para verificar por electroforesis en gel de agarosa que el plásmido estaba linearizado. En este gel se incluyó el plásmido sin digerir (entre 150-200ng) junto con el marcador de peso molecular de 1kb. Luego de 2hs de digestión se agregó 1uL de CiP incubándose 1h a 37°C. Finalmente el plásmido digerido se purificó con el kit comercial NucleoSpin Extract II resuspendiéndose finalmente en 30-50uL de H₂O estéril comercial precalentada a 60-70°C y se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

4.3.8.2. Amplificación del fragmento correspondiente al gen que codifica para la proteína F sin la región transmembrana (TM-)

Para amplificar la proteína F sin la región transmembrana se utilizó un cDNA de la cepa de referencia Long (obtenido según Metodología 4.3.2.1) utilizando los cebadores F1NheI for y F1599XbaI rev los cuales contienen los sitios de restricción para las enzimas NheI y XbaI, respectivamente (Tabla 3). El cebador F1599XbaI rev contiene además un codón de terminación.

F1NheI for	5' - CTAG GCTAGCGGGGCAAATAACAATGG - 3'
F1599XbaI rev	5' - CTAG TCTAGATTAATTTGTGGTTGATTACC - 3'

Tabla 3: Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen que codifica para la proteína FTM-. En negrita se señalan los sitios de restricción para las enzimas NheI y XbaI y subrayado se señala el codón de terminación (UAA).

Brevemente 1,5uL del cDNA fue incubado junto con 1uL de cada uno de los cebadores F1NheI for(10uM) y F1599XbaI rev(10uM), 5uL de buffer de PCR High Fidelity 10x, 2uL de MgSO₄ (50mM), 1uL dNTPs (10mM), 0,4uL Platinum® Taq DNA polimerasa High Fidelity (5U/uL)y H₂O estéril comercial hasta un volumen de 50uL. Las condiciones para llevar a cabo la reacción de amplificación fueron las siguientes: 94°C/2' y 35 ciclos de: 94°C/45'', 55°C/30'' y extensión a 68°C durante 2'. Finalmente se realizó una extensión final a 68°C durante 10'.

El producto de PCR fue purificado a partir de geles de agarosa mediante el kit de purificación NucleoSpin Extract II (ver Metodología 4.3.3), eluído en 30uL de H₂O estéril comercial precalentada y

analizado en una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El producto de PCR purificado (90ng) se digirió con las enzimas NheI (1uL) y XbaI (1uL) en presencia del buffer empleado para la doble digestión (buffer 2) y BSA en un volumen de digestión de 50uL. Esta mezcla de digestión se incubó 1-2hs a 37°C y posteriormente se purificó nuevamente eluyendo en 20uL de H₂O estéril comercial. Finalmente la cantidad de ADN obtenida se cuantifica ya sea por gel o por NanoDrop.

4.3.8.3. Ligación y transformación.

Para la ligación la relación Vector (V)-Inserto (I) fue de 1 a 3, colocándose en la reacción de ligación 50ng del vector y 31ng de inserto para respetar la relación. La reacción de ligación incluyó además 2uL de buffer de ligación 10x, 1uL de la enzima T4 ADN ligasa (1U/uL) y H₂O estéril comercial hasta alcanzar un volumen de reacción de 20uL. La ligación fue realizada a 16°C durante toda la noche en termociclador. Como control se llevó a cabo la ligación del vector (50ng) en ausencia de inserto.

Se utilizaron 3uL de la ligación entre 50- 80ng ADN total (según se trate del V solo o V+I) para transformar 50uL de células *E. coli* derivadas de DH5 α competentes comerciales. La transformación se realizó por choque térmico con el siguiente protocolo: 30' en hielo/30" a 42°C/5' en hielo. Luego de este procedimiento se agregaron 950uL de SOC comercial y se plaquearon directamente en LB agar-ampí y las placas se incubaron a 37°C durante 16-18hs. Se seleccionaron y picaron un número suficiente de colonias las cuales fueron crecidas en 3mL de LB con ampicilina a 37°C con agitación (200-220rpm) durante 16hs. La extracción del ADN plasmídico se realizó empleando el kit NucleoSpin® Plasmid, resuspendiendo finalmente el ADN en un volumen final de 50uL de H₂O estéril comercial previamente calentada a 60-70°C.

4.3.8.4. Confirmación de clones positivos por digestión con enzimas de restricción.

Para confirmar la correcta incorporación del gen de la proteína F sin la región transmembrana se realizó la digestión de los plásmidos extraídos. La enzima de restricción PstI permite discriminar claramente si el vector pAEUA2 incorporó correctamente o no el inserto (gen F TM-). Esta enzima corta en 3 sitios en el plásmido pAEUA2/F TM-; si la orientación es correcta los fragmentos que se generan son de 291, 586 y 8436pb mientras que si la orientación es incorrecta los fragmentos que se generan son de 586, 1180 y 7547pb. Estos fragmentos son fácilmente identificables mediante electroforesis en gel de agarosa.

La digestión se realizó utilizando 3uL de los plásmidos extraídos los cuales se incubaron con 2,5uL del buffer 3 10x (NEB), 2,5uL BSA 10x, 1uL PstI (2U) y H₂O comercial estéril hasta un volumen de 25uL. Esta mezcla de digestión se incubó 1-2hs a 37°C y finalmente se analizaron 8uL de las digestiones en electroforesis en gel de agarosa al 1-2%. Aquellos clones que fueron seleccionados como positivos se produjeron a gran escala y se secuenciaron utilizando los mismos cebadores que los empleados en Metodología 4.3.4. En esta digestión se incluyó además el plásmido sin inserto.

4.3.8.5. Producción y purificación del plásmido pAEUA2/FTM-.

La producción y purificación del plásmido pAEUA2/FTM- se realizó según Metodología 4.3.7.3

Todos los reactivos, materiales y mapas plasmídicos utilizados se detallan en el anexo 3.

5. RESULTADOS

5.1. PARTE 1: ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE VIRUS MUTANTES

5.1 A) CONFIRMACIÓN DE LAS MUTACIONES SELECCIONADAS EN EL DOBLE MUTANTE VRSH-E1.

Como se indica en la estrategia experimental, el punto de partida de este trabajo fue el crecimiento del virus mutante VRSH-E1 en cultivo de células HEp-2 en presencia del suero policlonal anti-F (1/50) con el fin de obtener la secuencia nucleotídica del mismo para confirmar las mutaciones halladas previamente.

Una de las observaciones realizadas en el trabajo previo a partir de la secuencia nucleotídica del doble mutante seleccionado y confirmada en este, fue que en la posición donde fue seleccionada la mutación transmembrana, nucleótido 1610, el cromatograma presentaba un pico correspondiente a la mutación a la vez que se encontraba el pico correspondiente al nucleótido salvaje.

En la figura 7 se observan los cromatogramas correspondientes a las regiones de la secuencia nucleotídica, del gen de la proteína F, donde se encontraron las mutaciones en el virus mutante VRSH-E1. Mientras que para la posición nucleotídica 816 el pico correspondiente a la mutación A x T (Asn268Ile) es único, para la posición 1610 (región TM) se observa tanto el pico correspondiente a la mutación G x A (Val533Met) como el correspondiente al nucleótido salvaje (G). El sentido de la secuencia para el cromatograma correspondiente al nucleótido 1610 es opuesto al del ARNm. A la derecha de la figura 7 se muestran dos cromatogramas distintos de la mutación transmembrana correspondientes al VRSH-E1 obtenidos a partir de dos eventos de extracción de ARN distintos. En ambos cromatogramas la posición 1610 posee las dos señales, predominando en ambos casos la señal de la mutación. De acuerdo a los resultados de secuencia obtenidos sólo estas dos mutaciones se traducen en cambios aminoacídicos mientras que el resto de la secuencia o permanece inalterada con respecto a los controles o presenta cambios -sinónimos y no sinónimos- también hallados en los virus control.

Para aproximarnos a cuál sería la representación de la mutación transmembrana en la población que conforma el virus mutante VRSH-E1, el producto de PCR del gen de la proteína F de VRSH-E1 se clonó en el plásmido pJET-1/Blunt. Se secuenciaron 10 colonias, 7 de las cuales se lograron secuenciar completamente ya que poseían el gen de la proteína F completo. Las secuencias de las tres colonias restantes no se muestran dado que el gen de la proteína F no estaba completo (sólo se habían clonado fragmentos) y se descartaron. En la tabla 4 se resumen los resultados obtenidos para las dos mutaciones halladas en los clones del mutante VRSH-E1.

	Nucleótido 816	Nucleótido 1610
Long salvaje	A	G
LTM33	T	A
LTM35	T	G
LTM36	T	A
LTM37	T	A
LTM39	T	A
LTM40	T	G
LTM41	T	A

Tabla 4: Se comparan los nucleótidos presentes en las posiciones 816 y 1610 de las colonias analizadas que habían incorporado el gen de la proteína F completo a partir del producto de PCR del virus mutante VRSH-E1. A su vez se muestran los nucleótidos en las posiciones 816 y 1610 de la cepa de referencia Long. LTM33, LTM35-37 y LTM39-41 son los nombres de los clones secuenciados.

Como se esperaba, la mutación A x T en el nucleótido 816 (Asn268Ile) estuvo presente en todas las secuencias del gen de la proteína F clonados, mientras que para el nucleótido 1610 de las 7 colonias obtenidas, 5 presentaron la mutación transmembrana G x A (Val533Met) y las 2 restantes poseían el nucleótido salvaje.

5.1 B) ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LAS MUTACIONES SELECCIONADAS EN AUSENCIA DE PRESIÓN INMUNE: SELECCIÓN DEL VIRUS MUTANTE VRSH-C10.

Para comprobar la estabilidad de las mutaciones seleccionadas (en particular la mutación transmembrana), el virus mutante VRSH-E1 fue crecido en ausencia de suero policlonal anti-F (suero de selección). Se realizaron entonces, en una primera instancia, tres pasajes seriados en cultivo de células HEp-2 del doble mutante pero en ausencia de anticuerpos. Este virus fue denominado VRSH-E1 3P s/p, y se secuenció a partir de la PCR el gen de la proteína F completo. En la figura 8 se muestra únicamente la secuencia nucleotídica que abarca a la posición 1610 y se compara con la misma secuencia obtenida para los virus control VRSH-E2 y VRSH-E3. Nuevamente el sentido de la secuencia para el cromatograma correspondiente al nucleótido 1610 es opuesto al del ARNm.

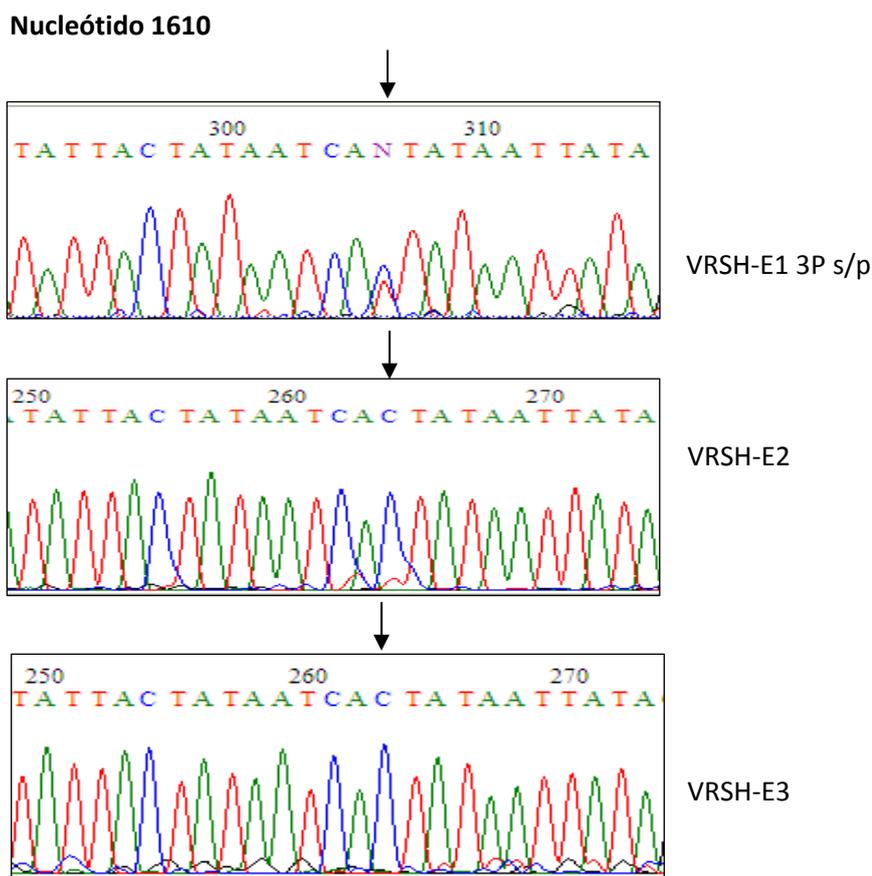


Figura 8: Región del gen que codifica para la proteína F del VRSH correspondiente a la posición nucleotídica 1610; esta posición está marcada con flechas negras para cada uno de los virus. Arriba: virus cepa Long mutante con 3 pases sin presión (VRSH-E1 3P s/p). Centro: virus cepa Long control con suero normal de conejo (VRSH-E2). Abajo: virus cepa Long control sin anticuerpos (VRSH-E3). El sentido de la secuencia es opuesto al del ARNm.

Para el VRSH E1 3P s/p, en la posición 1610 se observan los picos correspondientes al nucleótido mutante y salvaje, en este caso es el salvaje el pico mayoritario para esta posición. Por su parte, aunque no se muestra en la figura, la mutación en la posición nucleotídica 816 estaba presente.

Al igual que en el caso anterior este producto de PCR fue utilizado a su vez para realizar el clonaje del gen de la proteína F en el plásmido pJET-1/Blunt para el análisis de secuencia de las variantes presentes en el VRSH-E1 luego 3 pasajes sin presión inmune.

	Nucleótido 816	Nucleótido 1610
Long salvaje	A	G
LTM23	T	A
LTM24	T	A
LTM28	T	G
LTM29	T	G
LTM30	T	G
LTM31	T	G
LTM32	T	G

Tabla 5: Se comparan los nucleótidos presentes en las posiciones 816 y 1610 de las colonias analizadas que habían incorporado el gen de la proteína F completo a partir del producto de PCR del virus mutante VRSH-E1 3P s/p. A su vez

se muestran los nucleótidos 816 y 1610 de la cepa Long. LTM23, LTM24 y LTM28-32 son los nombres de los clones secuenciados.

La tabla 5 muestra al igual que en la tabla 4 que la mutación en el nucleótido 816 (A x T, Asn268Ile) está presente en todos los clones secuenciados. Para el nucleótido 1610, sin embargo, de las 10 colonias secuenciadas sólo dos poseían la mutación transmembrana G x A (Val533Met) mientras que las 5 restantes presentaban el nucleótido salvaje. En este caso también tres de las colonias secuenciadas sólo poseían algún fragmento del gen de la proteína F demostrando que el clonaje había sido fallido y se descartaron.

Para verificar si las mutaciones Asn268Ile y Val533Met permanecían estables en ausencia del suero policlonal anti-F, se realizaron 3 pasajes más en ausencia de anticuerpos del virus VRSH E1 3P s/p. El virus mutante obtenido a partir de VRSH-E1 luego de 6 pasajes en ausencia de presión inmune se purificó inmediatamente por plaqueo viral. Este virus se denominó VRSH-C10. En la figura 9 se muestran los cromatogramas correspondientes a las posiciones 816 y 1610 del gen de la proteína F secuenciado a partir de la RT-PCR del virus VRSH-C10 y se compara con los virus control VRSH-E2 y VRSH-E3.

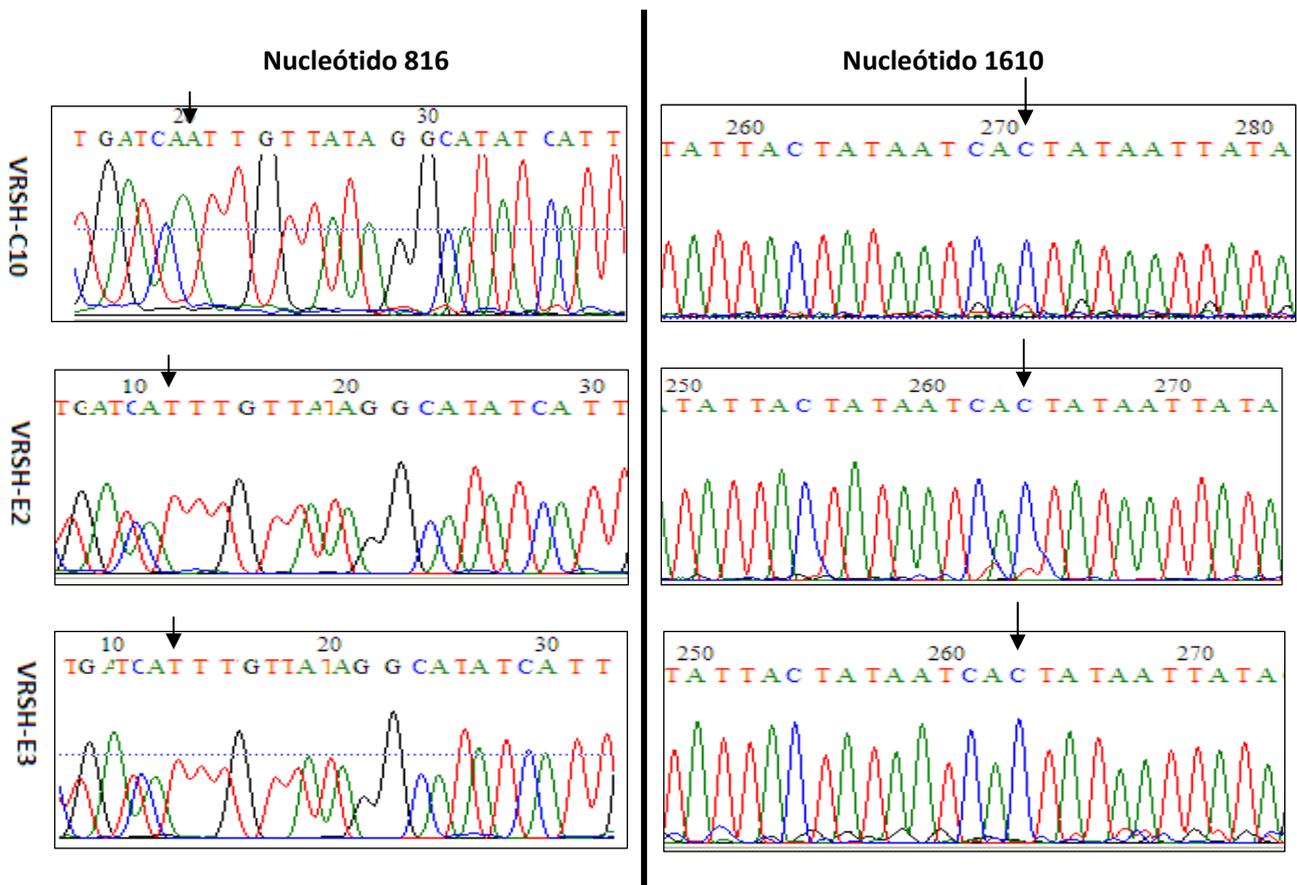


Figura 9: Cromatogramas en los que se muestran regiones del gen que codifica para la proteína F del VRSH correspondientes a las posiciones nucleotídicas 816 y 1610; las cuales están marcadas con flechas negras para cada uno de los virus. Se observa que el virus mutante VRSH-C10 sólo presenta la mutación en la posición 816. Arriba: virus cepa Long mutante VRSH-C10. Centro: virus cepa Long control con suero normal de conejo (VRSH-E2). Abajo: virus cepa Long control sin anticuerpos (VRSH-E3). El sentido de la secuencia para el cromatograma correspondiente al nucleótido 1610 es opuesto al del ARNm.

El análisis de la secuencia nucleotídica del virus VRSH-C10 dio como resultado la permanencia sólo de la mutación en el nucleótido 816 (A x T) mientras que la mutación en la región transmembrana revirtió

al nucleótido presente en el virus salvaje. De este modo logramos una reversión de la mutación en el sitio 1610 y la selección de un simple mutante, VRSH-C10, luego de 6 pasajes en ausencia de presión inmune y posterior purificación por plaqueo viral que sólo presenta la mutación A x T en la posición 816, lo que se corresponde con el cambio aminoacídico Asn x Ile presente en el sitio antigénico II (Asn268Ile).

5.1 C) PURIFICACIÓN POR PLAQUEO VIRAL DE LOS VIRUS VRSH-E1, VRSH-E2 Y VRSH-E3 Y TITULACIÓN DE LOS VIRUS EN ESTUDIO.

El doble mutante VRSH-E1 hasta el momento no había sido purificado y por tanto los resultados descritos en el análisis de estabilidad de las mutaciones, refleja lo que ocurre en el total del conjunto de genomas que están presentes en el VRSH-E1. Por este motivo resultó indispensable, para continuar con la caracterización antigénica y genética de este mutante, tener el virus puro.

La purificación del virus mutante VRSH-E1 se realizó mediante plaqueo viral en presencia de suero policlonal anti-F. De esta purificación se seleccionaron dos virus mutantes, provenientes de placas diferentes que se denominaron VRSH-E1/-2 y VRSH-E1/-1. Los controles de virus crecidos en presencia de suero normal de conejo, VRSH-E2, y en ausencia de anticuerpos, VRSH-E3, también fueron purificados por plaqueo viral. Por su parte el simple mutante VRSH-C10, ya había sido previamente purificado.

Posteriormente se realizó la titulación de los virus VRSH-E1, VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2, VRSH-C10, VRSH-E2 y VRSH-E3. Los títulos virales obtenidos para los virus estudiados se resumen en la tabla 6 donde se incluye la cepa de referencia Long la cual se utilizó para la selección de los virus mutantes y para generar los controles.

Virus	Título viral (UFP/mL)
Long salvaje	$3,6 \times 10^6$
VRSH-E3 (sin Acs)	$1,4 \times 10^6$
VRSH-E2 (con SNC)	$1,5 \times 10^6$
VRSH-E1	$6,5 \times 10^5$
VRSH-E1/-2	$1,7 \times 10^6$
VRSH-E1/-1	$2,3 \times 10^6$
VRSH-C10	$2,1 \times 10^7$

Tabla 6: Títulos virales obtenidos por plaqueo viral para los virus control (VRSH-E2, VRSH-E3 y la cepa Long) y para los virus mutantes VRSH-E1 (sin purificar), VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 y VRSH-C10 (purificados). El título viral se expresa como Unidades Formadoras de Placa/mililitro (UFP/mL).

En la figura 10 se muestra el resultado de la titulación por plaqueo viral del virus VRSH-C10. En esta figura se observa el pequeño tamaño de las placas obtenidas. La presencia de placas pequeñas en todos los virus titulados se presentó como una característica del VRSH no sólo en nuestras condiciones de trabajo [198-200].

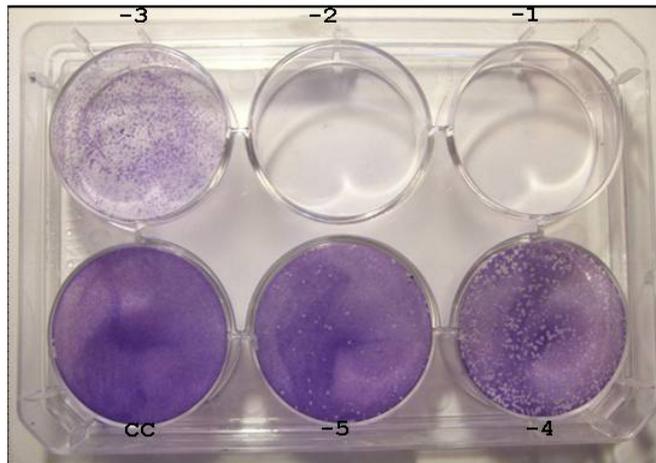


Figura 10: Fotografía de la titulación por plaqueo viral del virus mutante VRSH-C10. Monocapas de células HEp-2 fueron infectadas con las diluciones seriadas del virus que se muestran en negrita. Luego de 4hs de adsorción, se retiró el inoculo y se agregó el medio de plaqueo semisólido con suero policlonal anti-F 1/500. 7 días después se retiró el medio de plaqueo, se fijaron las células y se tiñeron con una solución de cristal violeta. Se utilizó la dilución 10^{-5} para calcular el título viral. CC: control de células sin infectar.

5.1 D) EFECTO CITOPÁTICO PRODUCIDO POR LOS VIRUS MUTANTES VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 Y VRSH-C10 Y LOS VIRUS CONTROL VRSH-E2 Y VRSH-E3

En la figura 11 se muestran las fotografías correspondientes al efecto citopático en 5 réplicas de infección de células HEp-2 con iguales cantidades de cada uno de los virus titulados: VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2, VRSH-C10, VRSH-E2 y VRSH-E3.

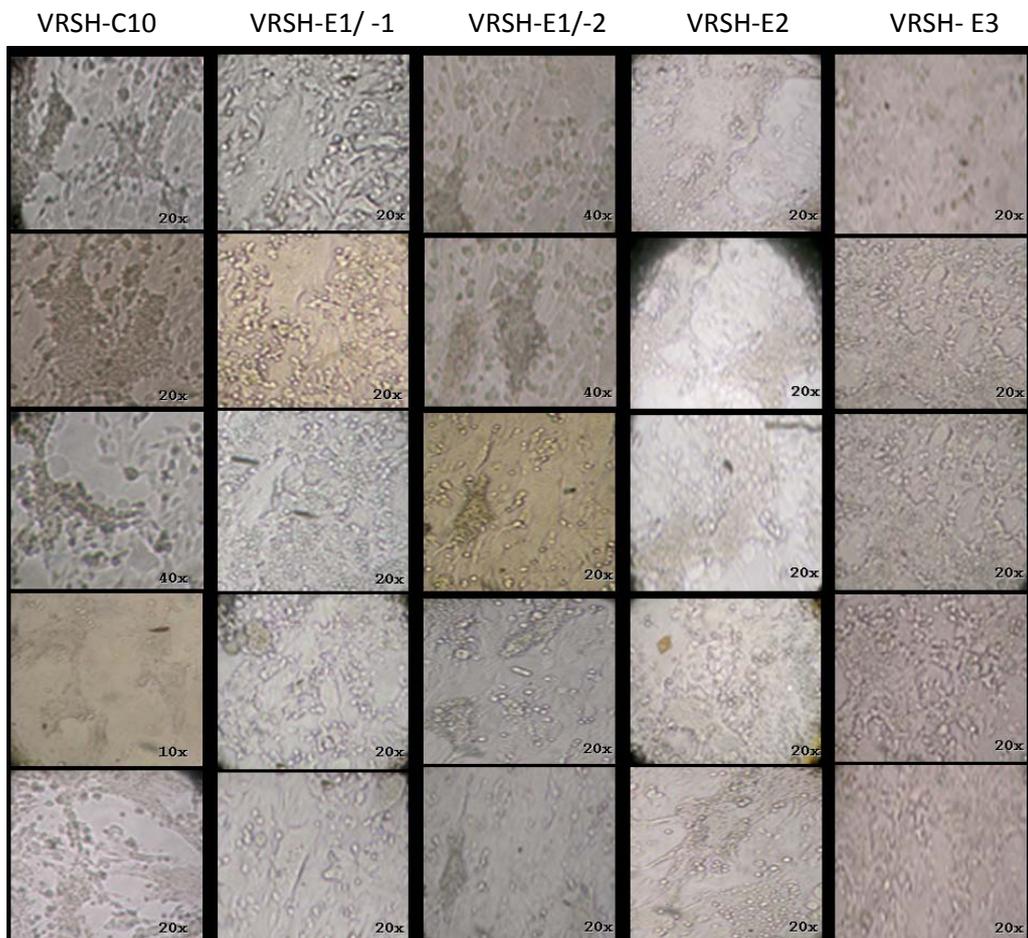


Figura 11: Fotografías tomadas para cada uno de los virus titulados mutantes VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 y VRSH-C10 y controles: VRSH-E2 y VRSH-E3. Cinco pocillos de una placa M24 sembradas con células HEp-2 fueron infectadas a una MOI de 0,05 con cada uno de los virus mencionados. Abajo a la derecha se muestra el aumento del objetivo utilizado en el microscopio óptico para tomar las fotografías (10x y 20x).

Todos los virus analizados mutantes y controles presentaron efecto citopático marcado (sincicios) y no mostraron diferencias con respecto a los controles VRSH-E2 y VRSH-E3. Los virus mutantes por tanto son competentes a nivel replicativo y la función de la proteína F, aunque presenta mutaciones, sigue siendo fusogénicamente activa.

5.1 E) EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA NEUTRALIZACIÓN POR EL SUERO POLICLONAL ANTI-F DE LOS VIRUS MUTANTES SELECCIONADOS MEDIANTE ENSAYO DE MICRONEUTRALIZACIÓN.

Para confirmar la resistencia a la neutralización por el suero policlonal anti-F de los virus mutantes seleccionados, purificados y titulados: VRSH-E1/-2, VRSH-E1/-1 y VRSH-C10, se realizó el ensayo de microneutralización con la misma cantidad de partículas virales para cada uno de los virus (1000 UFP) y utilizando el AcMo 021/21G como anticuerpo primario para cuantificar la cantidad de antígeno viral. Este ensayo permitió medir la fracción de virus capaz de infectar las células luego de la etapa de neutralización con el suero anti-F.

Los valores de absorbancia a 492nm se graficaron en función de la dilución de suero policlonal anti-F empleada (0, 1/1000, 1/500, 1/250, 1/150, 1/100 y 1/50) donde cada una de las barras para cada dilución de suero anti-F representa la absorbancia neta promedio de cada uno de los virus que fueron incluidos en el ensayo (VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2, VRSH-C10/, VRSH-E2 y VRSH-E3) (Fig. 12). En el anexo 5 se muestran todos los valores de absorbancia obtenidos para cada una de las réplicas en cada dilución de los virus en estudio, sus respectivos desvíos estándar así como los valores de absorbancia promedio empleados para obtener la gráfica de la figura 12.

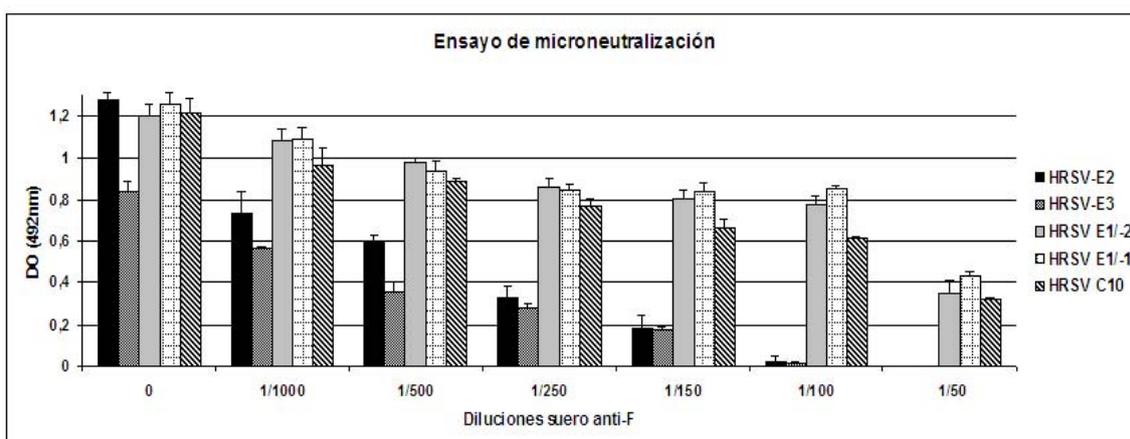


Figura 12: Ensayo de microneutralización de virus mutantes que escapan a la presión por un suero policlonal anti-F (VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 y VRSH-C10) y de los virus control (VRSH-E2 y VRSH-E3). Cantidades iguales de virus mutantes y control (1000 UFP) fueron incubadas con diluciones seriadas de suero policlonal anti-F (1/1000-1/50) durante 1h a 37°C. Estas mezclas de neutralización se utilizaron para infectar monocapas de células HEp-2 y el ensayo se realizó a las 48hs.

Los resultados obtenidos evidencian que los virus control VRSH-E2 y VRSH-E3 mostraron una marcada reducción en la absorbancia a 492nm a medida que aumentaba la concentración de anticuerpos anti-F, con una absorbancia prácticamente nula en la dilución 1/100 (inhibición completa de la infección viral). El virus control VRSH-E3 presentó desde el inicio una diferencia en absorbancia con respecto al otro virus control, VRSH-E2, en los pocillos sin anti-F (con una absorbancia de aprox. 0,8 vs 1,3 del VRSH-E2). Esto implicaba un nivel de infectividad más bajo del VRSH-E3 con respecto al VRSH-E2.

Por su parte en lo que respecta a los virus mutantes VRSH-E1/-2, VRSH-E1/-1 y VRSH-C10, se observa que los mismos no fueron neutralizados por el suero policlonal anti-F como ocurrió con los virus control. A nivel general estos virus presentaron perfiles de absorbancia similares entre sí con una caída gradual de entre 0,1 y 0,2 unidades de absorbancia a medida se incrementó la concentración de suero policlonal anti-F lo que demuestra que la infección viral de los virus mutantes se vio sólo parcialmente afectada por la presencia de anticuerpos específicos anti-F. En la dilución 1/50 de suero policlonal anti-F, la reducción en la absorbancia fue aproximadamente de un 75% lo que implica que aunque fueron parcialmente neutralizados se requirió una cantidad mucho mayor de anticuerpos para neutralizarlos que la empleada para los virus control.

Por tanto se observa que existe una clara diferencia en la absorbancia neta de los virus control y mutantes, donde la absorbancia neta es proporcional a la cantidad de antígeno presente en los cultivos como resultado de la replicación viral. Ello implica que mientras para los virus control VRSH-E2 y VRSH-E3 el suero policlonal anti-F neutraliza completamente la infección por estos virus, los virus mutantes efectivamente vencen la presión impuesta por el suero policlonal anti-F ingresando en las células y replicando.

5.1 F) CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE LOS VIRUS QUE ESCAPAN A LA NEUTRALIZACIÓN

5.1 f.1) ELISA

Con el fin de evaluar si VRSH-E1/-2, VRSH-E1/-1 y VRSH-C10/ presentaban cambios que podrían modificar epitopes en la proteína F, los extractos obtenidos a partir de estos virus mutantes se evaluaron por ELISA frente a un panel de siete anticuerpos monoclonales murinos dirigidos contra la proteína F y dos dirigidos contra la proteína G (Fig. 13). Los anticuerpos monoclonales anti-F utilizados reaccionan con epitopes correspondientes a distintas regiones antigénicas dentro de la glicoproteína F.

Proteína	Sitio antigénico	AcMos	Virus							
			Mon/3/88	Long	VRSH-E2	VRSH-E3	VRSH-E1	VRSH-E1/-2	VRSH-E1/-1	VRSH-C10
F	I	2F	■	■	■	■	■	■	■	■
		47F	■	■	■	■	■	■	■	■
		11	■	■	■	■	■	■	■	■
	II	13	■	■	■	■	■	■	■	■
		AK13A2	■	■	■	■	■	■	■	■
		7C2	■	■	■	■	■	■	■	■
	IV	19F	■	■	■	■	■	■	■	■
G		021/21G	■	■	■	■	■	■	■	■
		63G	■	■	■	■	■	■	■	■

Figura 13: Reactividad de los virus mutantes VRSH-E1 (sin purificar), VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 y VRSH-C10 (purificados) frente a un panel de anticuerpos monoclonales anti-F correspondientes a distintos sitios antigénicos. Dos anticuerpos monoclonales anti-G 63G y 021/21G fueron incluidos como control de los extractos celulares. El control de la reactividad de cada anticuerpo fue realizado con extractos de las cepas contra las cuales están dirigidos (Mon/3/88 para 021/21G y la cepa Long para 63G y los anticuerpos monoclonales anti-F). Se incluyeron en el ensayo los virus control VRSH-E2 y VRSH-E3. Los cuadrados negros indican una reactividad entre 75-100% (■), los grises oscuros (■) indican una reactividad entre 50-75%, los grises claros (■) una reactividad entre 25-50% y los cuadrados blancos (□) indican una reactividad menor al 25%.

Como se observa en la figura 13 los virus mutantes purificados VRSH-E1/-2, VRSH-E1/-1 y VRSH-C10 reaccionaron sólo con los AcMos 2F y 19F pertenecientes a los sitios antigénicos I y IV, respectivamente. Sin embargo estos mutantes no reaccionaron con ninguno de los AcMos pertenecientes al sitio antigénico II incluidos en el ensayo (47F, 11, 13, AK13A2 y 7C2), presentando una reactividad menor al 25% en comparación con los valores obtenidos para la cepa Long. En este ensayo a su vez se incluyó el virus mutante sin purificar VRSH-E1 el cual mostró el mismo patrón de reactividad que el observado para VRSH-E1/-2, VRSH-E1/-1 y VRSH-C10. Estos virus a su vez no perdieron reactividad con los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la glicoproteína G. Estos AcMos se incluyeron como control del estado de los extractos proteicos utilizados. Por tanto este panel muestra claramente la pérdida completa de reactividad de los virus mutantes VRSH-E1, VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 y VRSH-C10 con todos los anticuerpos monoclonales anti-F del sitio antigénico II incluidos en el ensayo.

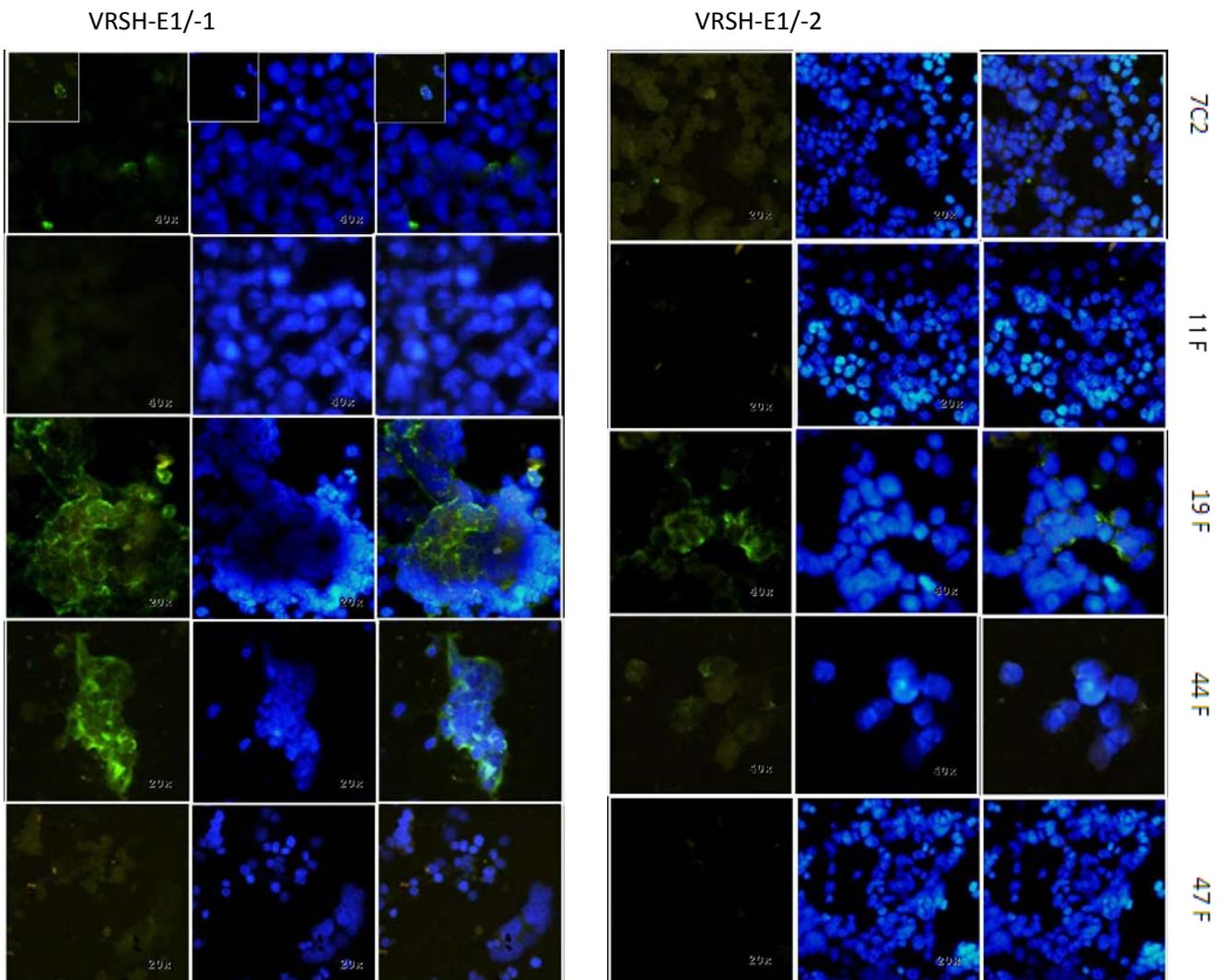
Por su parte los virus control VRSH-E2 y VRSH-E3 así como la cepa de referencia Long reaccionaron con todos los AcMos testeados. En este ensayo se incluyó además un extracto correspondiente a la cepa de referencia Mon/3/88 dado que el anticuerpo 021/21G fue producido en base a esta cepa. Por su parte el resto de los anticuerpos monoclonales utilizados, excepto el AK13A2, fueron producidos utilizando la cepa de referencia Long.

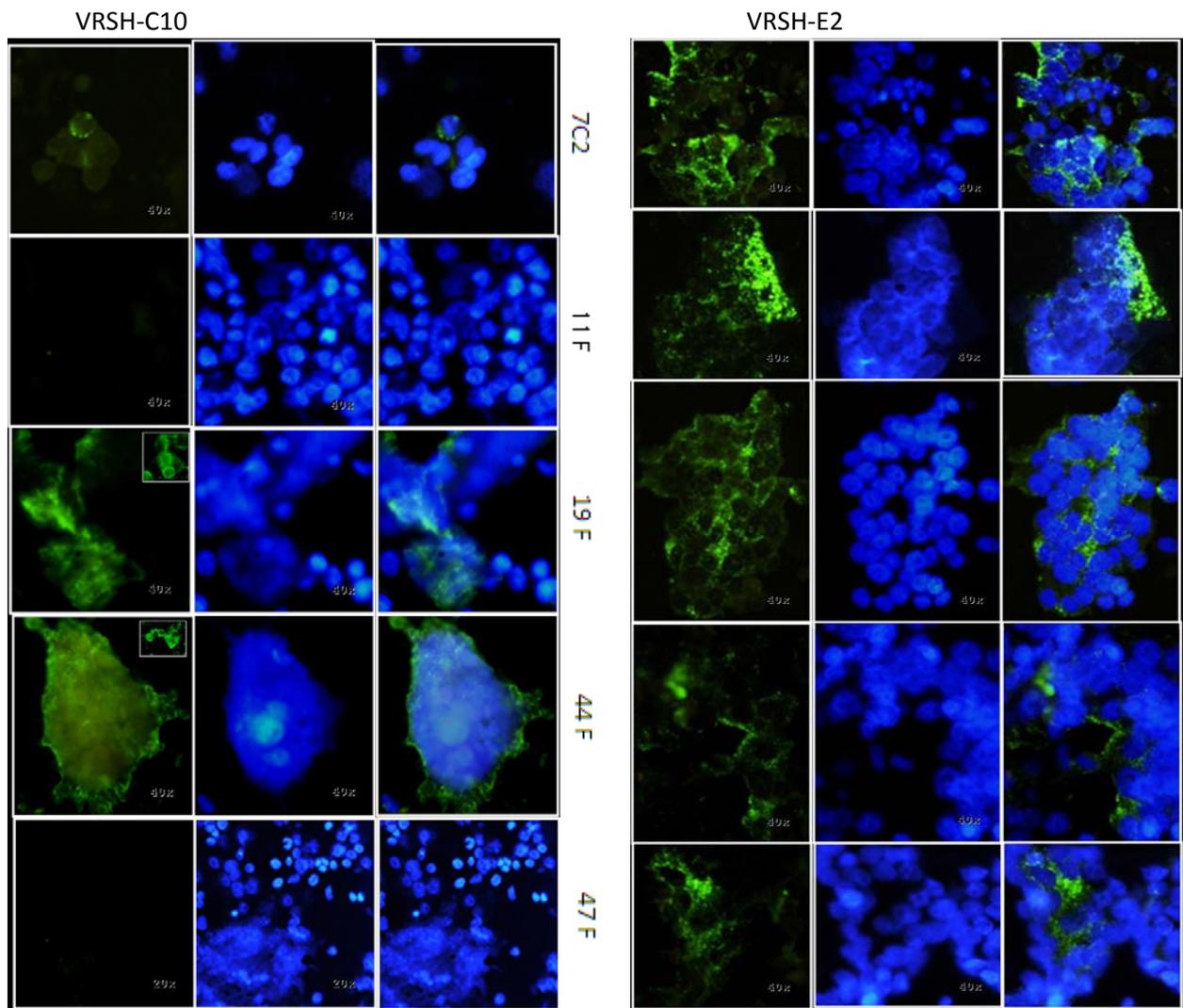
5.1 f.2) Inmunofluorescencia Indirecta

Otro de los abordajes realizados para la caracterización antigénica fue el empleo de la técnica de IFI para establecer la pérdida o no de reactividad por parte de AcMos dirigidos contra epítopes de la proteína F presentes en los virus VRSH-E1/-2, VRSH-E1/-1, VRSH-C10, confirmando los resultados obtenidos por ELISA.

Esta técnica es complementaria del ELISA y permite establecer si la pérdida de reactividad con los AcMos es total por parte de las proteínas F de los virus mutantes o si existen células infectadas que expresan la proteína F que es reconocida por los anticuerpos lo cual podría evidenciar que dentro de la población del virus mutante purificado aún hay virus salvaje. La técnica de IFI además confirma la formación de sincicios por parte de las proteínas F mutantes evaluando la actividad de estas proteínas.

Los virus control VRSH-E2 y VRSH-E3 así como la cepa de referencia Long también fueron enfrentados a los mismos anticuerpos monoclonales utilizados para poder establecer posibles diferencias. En este ensayo se observa pérdida de reactividad de los virus mutantes VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 y VRSH-C10 con los AcMos pertenecientes al sitio antigénico II, 11F, 47 F y 7C2, aunque con este último la pérdida de reactividad no fue completa. En este ensayo se emplearon prácticamente los mismos AcMos que los utilizados en el ensayo de ELISA excepto el AcMo 2F que fue sustituido por otro AcMo del sitio antigénico I, 44F (Fig. 14).





VRSH-E3 Long

VRSH-E3 Long

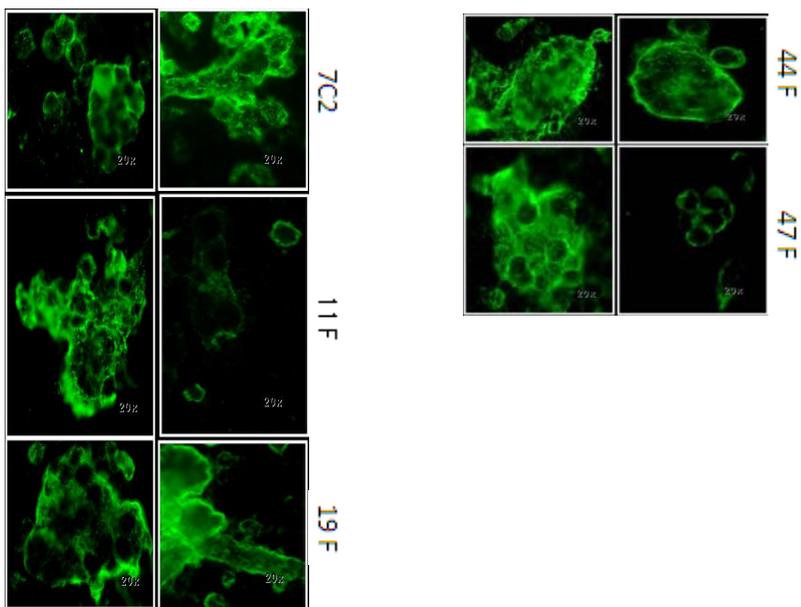


Figura 14: Reactividad de los virus mutantes VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 y VRSH-C10 frente a los AcMos anti-F: 44F (sitio antigénico I), 47F, 11F y 7C2 (sitio antigénico II) y 19F (sitio antigénico IV/V/VI) mediante ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Para cada uno de los virus mutantes se muestra una serie de 3 fotografías por cada AcMo: una correspondiente a la fluorescencia por FITC o Alexa 488 que representa la proteína F, una correspondiente

a la fluorescencia proveniente del fluorocromo DAPI y revela los núcleos celulares y por último se observa el resultado de la superposición de ambas fotografías que permite la localización de los núcleos y de la proteína F de forma simultánea. Se incluyeron en el ensayo los virus control VRSH-E2 y VRSH-E3 así como la cepa de referencia Long. En el caso del virus control VRSH-E3 y de la cepa Long no fue posible incluir el resultado de la fluorescencia por DAPI.

Con respecto a los virus mutantes VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 y VRSH-C10 se observa que para los AcMos 11F y 47F (pertenecientes al sitio antigénico II) la ausencia de fluorescencia es clara, lo cual implica que estos AcMos no reconocen sus epitopes presentes en la proteína F en estos virus. Si observamos que ocurre en estos virus con los AcMos 44F y 19F (sitios antigénicos I y IV respectivamente), la fluorescencia es marcada y por tanto ninguno de estos epitopes se ve afectado ya que son reconocidos por estos anticuerpos monoclonales. El AcMo 7C2 que pertenece al sitio antigénico II, presenta fluorescencia con los virus mutantes VRSH-E1/-1 y VRSH-C10. Este resultado aparentemente se contradice con lo obtenido en el ensayo de ELISA en el cual estos virus pierden reactividad con este AcMo.

Para el virus mutante VRSH-E1/-2 la fluorescencia observada con respecto a los AcMos 44F y 19F es más tenue si la comparamos con el resto de los virus mutantes, en particular en la que se empleó el AcMo 44F. De todos modos para los AcMos 11F y 47F la ausencia de fluorescencia es clara. Es probable que la razón para esta tenue fluorescencia presente en los pocillos incubados con 19F o 44F sea causada por problemas de la técnica en si misma más que por la infección viral.

Con respecto a los virus control VRSH-E3 y Long sólo se obtuvieron registros de fluorescencia empleando FITC solamente, por tanto las fotos que se muestran corresponden a la reactividad de los distintos AcMos con la proteína F presente en estos virus; se observó fluorescencia con todos los AcMos empleados. En el caso del virus control VRSH-E2 se observa también una clara fluorescencia con todos los AcMos utilizados.

La fluorescencia del virus VRSH-C10 con 19F y 44F así como el marcaje con DAPI presentó una imagen difusa que nuevamente adjudicamos a problemas de la técnica (por ej. preparación de las láminas a partir de los cultivos infectados).

5.1 G) ANÁLISIS POR WB DE LAS PROTEÍNAS CORRESPONDIENTES A LOS VIRUS MUTANTES Y CONTROL

En la figura 15 se observan los resultados de la inmunodetección (izquierda y centro) de las proteínas F de la cepa Long, VRSH-E3, VRSH-E2, VRSH-E1, VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 y VRSH-C10 utilizando los AcMos 18B2 y 19F. Como control de transferencia, la tinción con rojo Ponceau de la nitrocelulosa evidenció la presencia de proteínas en todos los extractos analizados (derecha). Con respecto a la inmunodetección se observa que las muestras correspondientes a los virus mutantes VRSH-E1, VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 y VRSH-C10 no presentaron reactividad al ser enfrentadas al AcMo 18B2 mientras que sí fueron reactivas frente al AcMo 19F. Los controles de virus, VRSH-E2 y VRSH-E3, por su parte reaccionaron con ambos anticuerpos. En todos los casos el peso molecular de las bandas obtenidas coincidió con el valor esperado para la subunidad F1 de la proteína de fusión (50kDa). Sólo en los virus control también se detectó la presencia del precursor F0 (sin el procesamiento proteolítico). Por su parte la idéntica movilidad de las subunidades F1 de los virus control y mutantes indican que tanto el procesamiento proteolítico en las subunidades correspondientes así como la glicosilación no se modifica en las proteínas mutantes.

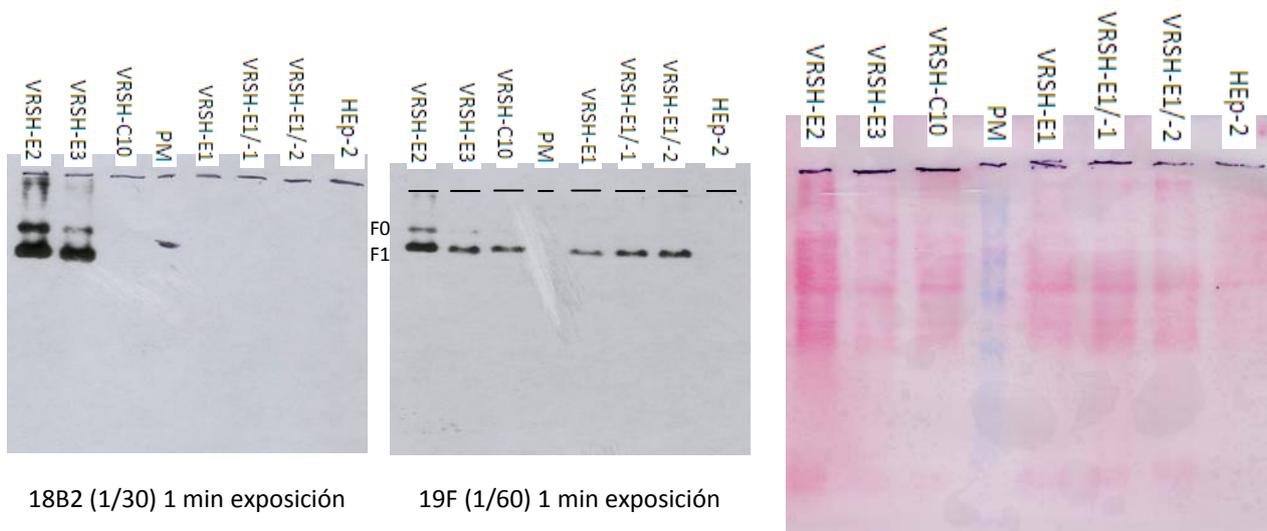


Figura 15: SDS-PAGE e Inmunodetección por WB de las proteínas F de los virus mutantes y control. (derecha) tinción con rojo Ponceau luego de la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, la presencia de bandas revela la presencia de proteínas. (izquierda) inmunodetección de las proteínas F por WB utilizando los AcMos 18B2 (que reconoce un epítipo lineal presente en el sitio antigénico II) y el 19F (que reconoce un epítipo conformacional presente en el sitio antigénico IV/V/VI); ambos AcMos reconocen epítipos en la subunidad F1 de la proteína. La localización en el gel de la subunidad F1 (50 kDa) así como el precursor F0 (70 kDa) se muestran en la figura. En los carriles se señalan las muestras sembradas: cepa Long, VRSH-E3, VRSH-E2, VRSH-E1, VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 y VRSH-C10.

Mientras que el 18B2 reconoce un epítipo lineal el otro anticuerpo utilizado, 19F, reconoce un epítipo conformacional. A pesar de que se trabajó en condiciones desnaturalizantes, el AcMo 19F logró reconocer la proteína F; es probable que al transferirse las proteínas, estas volvieron a adquirir su plegamiento original o podrían estar parcialmente plegadas y seguramente el epítipo que reconoce el AcMo 19F adquiera conformación a nivel local y con algo de plegamiento logre restituirse.

Este ensayo nuevamente confirma la pérdida de reactividad de un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo en el sitio antigénico II al ser enfrentado a extractos de proteína F derivada de virus mutantes.

5.1 H) CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS VIRUS MUTANTES VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 PURIFICADOS QUE ESCAPAN A LA PRESIÓN POR UN SUERO POLICLONAL

La figura 16 muestra los cromatogramas de los virus mutantes VRSH-E1/-2 y VRSH-E1/-1 obtenidos luego de la purificación por plaqueo viral del VRSH-E1, donde se observa la permanencia de las mutaciones halladas en el virus mutante VRSH-E1: el cambio nucleotídico de A x T en la posición 816 resultando en el cambio aminoacídico Asn268Ile en el sitio antigénico II y la mutación en la posición 1610 (transición de G a A) que da lugar a la sustitución Val533Met en el dominio transmembrana de la proteína F. El sentido de la secuencia para el cromatograma correspondiente al nucleótido 1610 es opuesto al del ARNm.

En la figura 16 se muestran sólo los cromatogramas pertenecientes a VRSH-E1/-1 (el cromatograma correspondiente a VRSH-E1/-2 es igual al de VRSH-E1/-1).

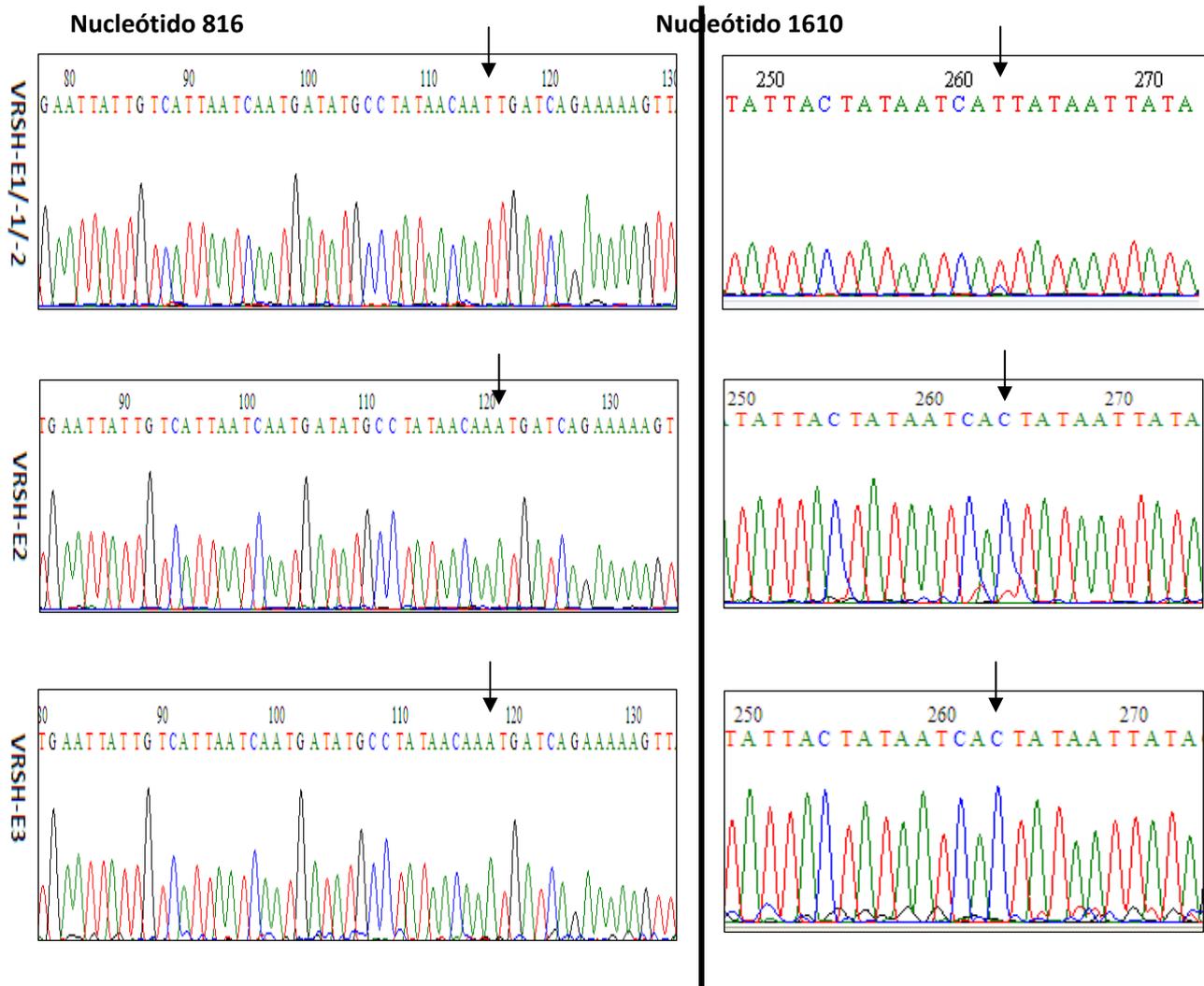


Figura 16: Cromatogramas donde se muestra parte de la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la proteína F del VRSH correspondiente a las posiciones 816 (a la izquierda de la línea negra) y 1610 (a la derecha de la línea negra); estas posiciones están marcadas con flechas negras. Se observan las mutaciones correspondientes a los virus mutantes purificados VRSH-E1/-1 y VRSH-E1/-2 para ambos nucleótidos. Sólo se muestra un cromatograma representativo de ambos virus mutantes ya que son idénticos. Arriba: virus mutantes purificados VRSH-E1/-1 y VRSH-E1/-2 (VRSH-E1/-1/-2). Centro: virus control con suero normal de conejo (VRSH-E2). Abajo: virus sin anticuerpos (VRSH-E3).

En la siguiente tabla se resumen las mutaciones obtenidas en los virus mutantes VRSH-E1, VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2, VRSH-C10, VRSH-E3, VRSH-E2 y la cepa de referencia Long.

Virus	Nucleótido en posición		Aminoácido en posición	
	816	1610	268	533
VRSH-Long	A	G	Asn	Val
VRSH-E3	A	G	Asn	Val
VRSH-E2	A	G	Asn	Val
VRSH-E1	T	A	Ile	Met
VRSH-E1/-1	T	A	Ile	Met
VRSH-E1/-2	T	A	Ile	Met
VRSH-C10	T	G	Ile	Val

Tabla 7: Cambios nucleotídicos y aminoácidos de los virus mutantes resistentes al suero policlonal anti-F.

VRSH-Long: cepa de referencia del grupo A; VRSH-E2: cepa Long crecida en presencia de suero normal de conejo; VRSH-E3: cepa Long crecida en ausencia de anticuerpos; VRSH-E1: virus doble mutante sin purificar; VRSH-E1/-1 y VRSH-E1/-2: virus dobles mutantes purificados por plaqueo viral y VRSH-C10 virus simple mutante purificado.

Los virus VRSH-E1, VRSH-E1/-1 y VRSH-E1/-2 presentan cambios en las posiciones nucleotídicas 816 y 1610 que dan lugar a cambios aminoacídicos en las posiciones 268 (Asn x Ile) y 533 (Val x Met) respectivamente. VRSH-C10 presenta sólo una mutación en el nucleótido 816 que da lugar a la sustitución de Asn por Ile en la posición 268.

5.2 PARTE 2: ANÁLISIS DE PROTEÍNAS F RECOMBINANTES

5.2 A) EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL PLÁSMIDO pTM1-FWT

Con el fin de expresar proteínas F recombinantes se partió del plásmido pTM1-Fwt el cual como se describe en el mapa 3 (Anexo 3 mapa 2) posee clonada la secuencia completa de la proteína F del VRSH cepa Long bajo el promotor procariota de la ARN polimerasa del fago T7 y fue el material de partida para las mutagénesis dirigidas que se realizaron *a posteriori*. Previo a las mutagénesis la secuencia codificante de la proteína F del VRSH clonada fue secuenciada completamente para corroborar que la misma estuviera intacta y que las mutaciones que se obtuvieran derivaran únicamente del proceso de mutagénesis. La secuencia completa del gen de la proteína F salvaje se muestra en el Anexo 6. En ella se observa que el comienzo de la secuencia no coincide con el del gen de la proteína F, sin embargo a partir del primer ATG (Met de inicio de la traducción) la secuencia es idéntica por lo que no conlleva problema alguno para ser empleada como secuencia de partida para la generación de mutantes. El resto de las mutaciones presentes correspondían a mutaciones sinónimas con excepción de un cambio presente en el nucleótido 1338 donde se encontró una transición de C x T que da lugar al cambio aminoacídico de alanina por valina en la posición 442.

Como se observa en la figura 17 la expresión de la proteína F salvaje se evidenció mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando el AcMo 2F que reconoce un epítipo en el sitio antigénico I de la proteína F. Con respecto a la determinación de la capacidad fusogénica si bien intentamos poner a punto 3 diseños experimentales diferentes para medir actividad fusogénica por conteo de núcleos no pudo llevarse a cabo. Sin embargo a los efectos de poder al menos establecer presencia o no de actividad fusogénica (formación de sincicios) consideramos una actividad fusogénica positiva cuando en el campo se observaran más del 50% de células multinucleadas fluorescentes con al menos 4 núcleos, al menos con alguno de los AcMos ensayados.

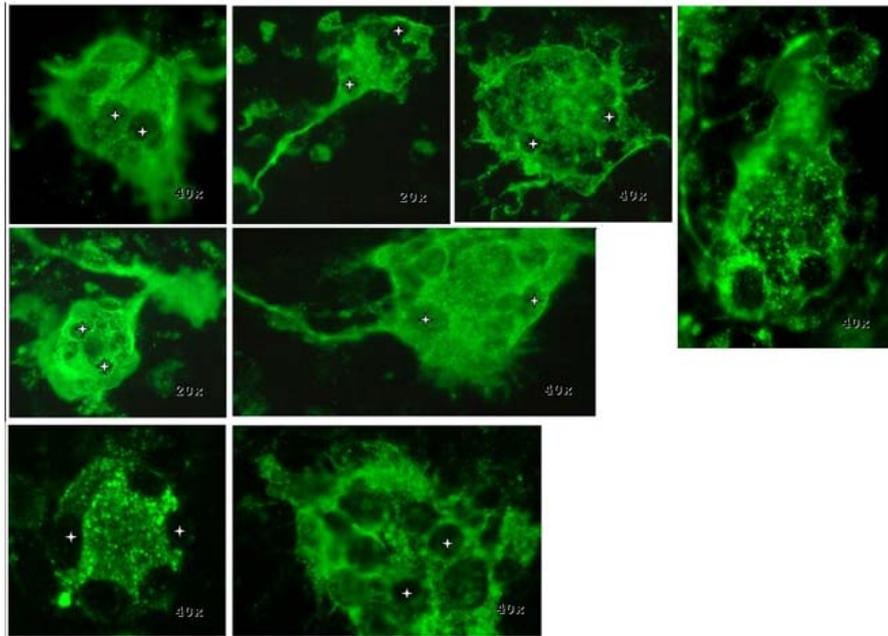


Figura 17: Expresión y formación de sincicios de la proteína F wt del VRSH. Células de la línea BSR-T7 fueron transfectadas con el plásmido pTM1 que lleva el inserto que codifica la proteína F completa salvaje. 48hs más tarde las células se fijaron y se realizó la inmunofluorescencia indirecta empleando el AcMo 2F. Con estrellitas blancas se marcan alguno de los núcleos que forman parte de los sincicios. Abajo a la derecha de cada imagen se muestra el objetivo utilizado en el microscopio de epifluorescencia (20x y 40x).

En la figura 17 se observan los resultados de las IFI correspondientes a diferentes pocillos de dos ensayos diferentes de la proteína F salvaje. En todos los casos se observa la formación de sincicios con al menos 5 núcleos por célula multinucleada (en la figura se señalan 2 núcleos por sincicio a modo de ejemplo). Con estos resultados de secuencia e IFI se continuó con la mutagénesis dirigida para la generación de las proteínas F mutantes propuestas.

5.2 B) MUTAGÉNESIS DIRIGIDA Y EXPRESIÓN TRANSITORIA DE LOS PLÁSMIDOS SIMPLES, DOBLES Y TRIPLES MUTANTES.

5.2 b1) Producción del mutante transmembrana Val533Met

La secuencia codificante de la proteína F del VRSH salvaje clonada en el plásmido pTM1-Fwt, fue blanco de mutagénesis dirigida para la generación del simple mutante Val533Met en la región transmembrana de la proteína F. Una vez realizada la mutagénesis, el 10% de la reacción fue analizada en un gel de agarosa al 1% para corroborar la presencia de un fragmento de ADN del tamaño esperado correspondiente al plásmido pTM1 (5357pb) + gen de la proteína F completo (1899pb), 7256 pb en total, antes de continuar con la transformación. En la figura 18 se muestra el gel de agarosa al 1% correspondiente a la mutagénesis realizada para la obtención de la variante Val533Met. Se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 7kb, cargado en los 2 carriles que se observan, correspondiente al plásmido pTM1 con el gen de la proteína F completo mutante. Las bandas migran menos de lo esperado y ello se debe a que el ADN plásmidico no está cerrado.

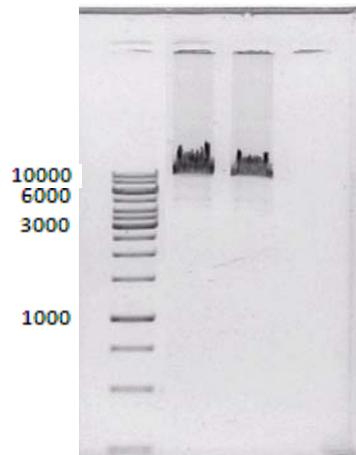


Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa al 1%. A partir de la reacción de mutagénesis dirigida utilizando como molde el pTM1-Fwt y los cebadores Val533Met y GCVal533Met. En el gel se señalan sólo los fragmentos del marcador de peso molecular (1kb Fermentas) con tamaños extremos y aquellos con mayor cantidad de ADN.

El gen completo de la proteína F clonado y mutagenizado fue secuenciado en su totalidad con los cebadores de la Tabla 2 para verificar la incorporación de la mutación Val x Met en el residuo 533 y el mantenimiento inalterado del resto de la secuencia. Este ADN plasmídico se utilizó para transfectar células de la línea BSR-T7. A las 48hs se realizó la inmunofluorescencia para evaluar expresión y presencia de actividad fusogénica. Como se observa en la figura 19 se comprobó que el cambio de aminoácido de valina por metionina en la posición 533 no altera la capacidad fusogénica de la proteína F dado que se observan células multinucleadas que presentan en la mayoría de los casos más de 4 núcleos por policarion. Asimismo la expresión de la proteína mutante F Val533Met se evidenció mediante ensayo de inmunofluorescencia indirecta utilizando los AcMos (11F, 47F y 2F) por lo tanto estos epitopes no se vieron alterados por la presencia de la mutación Val533Met respecto a la expresión de la proteína F de la cepa de referencia salvaje.

Val533Met

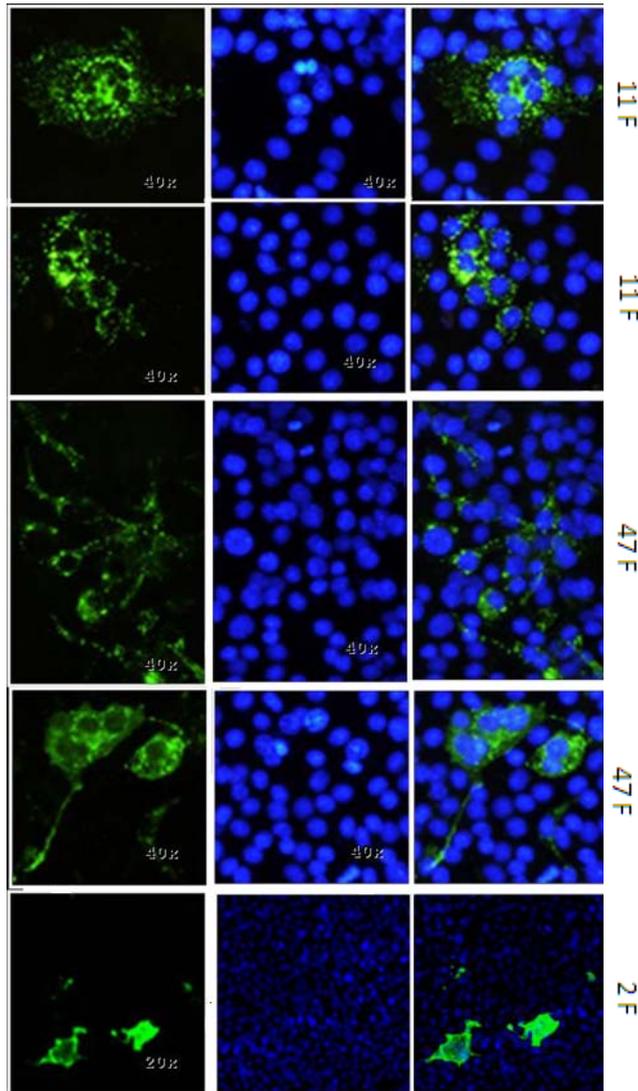


Figura 19: Análisis de expresión y formación de sincicios de la proteína F mutante Val533Met. Células de la línea BSR-T7 fueron transfectadas con el plásmido pTM1 que lleva el inserto que codifica la proteína F Val533Met mutante. 48hs más tarde las células se fijaron y se realizó la inmunofluorescencia indirecta empleando los AcMos 2F (sitio antigénico I), 47F y 11F (sitio antigénico II). Para estos últimos anticuerpos se muestran 2 imágenes diferentes de cada uno. En la figura se muestra una serie de 3 fotografías por cada AcMo: una correspondiente a la fluorescencia por Alexa 488 (verde) que representa la proteína F mutante, una correspondiente a la fluorescencia proveniente del fluorocromo DAPI y revela los núcleos celulares y por último se observa el resultado de la superposición de ambas fotografías que permite la localización de los núcleos y de la proteína F de forma simultánea. Abajo a la derecha de cada imagen se muestra el objetivo utilizado en el microscopio de epifluorescencia (20x y 40x)

5.2 b2) Producción de los mutantes Asn268Ile (simple mutante) y Asn268Ile/Val533Met (doble mutante)

Para la mutagénesis dirigida de las variantes F Asn268Ile y F Asn268Ile/Val533Met se empleó como material de partida el ADN plasmídico proveniente de pTM1-Fwt y pTM1-F Val533Met, respectivamente. La figura 20 muestra los resultados de la IFI de las variantes F Asn268Ile y F Asn268Ile/Val533Met como resultado de la expresión transitoria en células BSR-T7. Con respecto a la variante F Asn268Ile (izquierda) los resultados revelan en primer lugar que la proteína logró expresarse lo cual se manifiesta por la reactividad que presentó frente al AcMos 19F y paradójicamente también frente al AcMo 47F. Con este

último anticuerpo no esperábamos tener reactividad dado que la mutación 268 está ubicada en el sitio antigénico II. Sin embargo la proteína mutante F Asn268Ile no presentó reactividad al ser enfrentado al AcMo 11F (también perteneciente al sitio antigénico II) lo cual sugiere que este epítopo se ve afectado por la mutación.

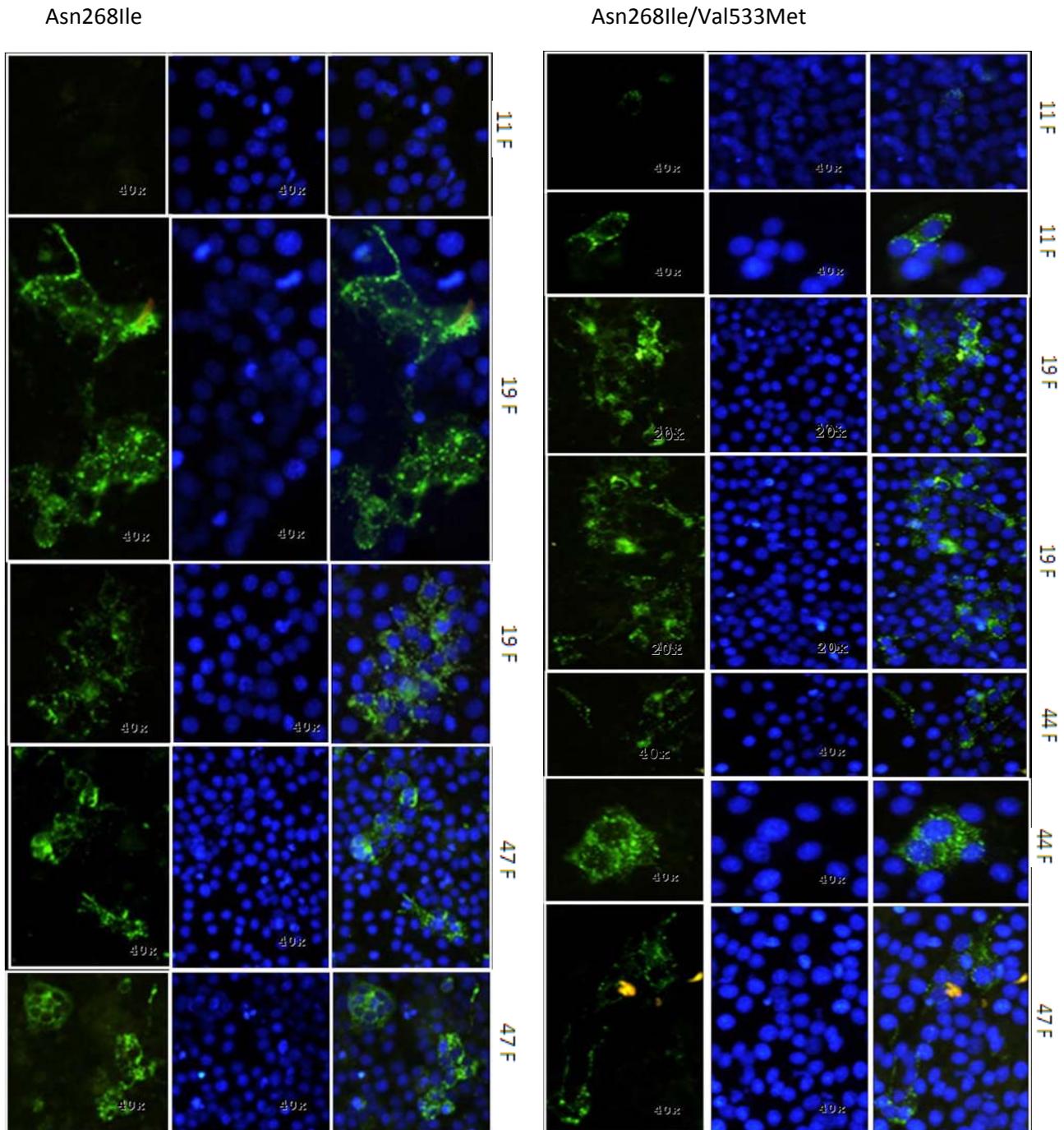


Figura 20: Análisis de expresión y formación de sincicios de las variantes de la proteína F Asn268Ile y Asn268Ile/Val533Met. Células de la línea BSR-T7 fueron transfectadas con los plásmidos pTM1-F Asn268Ile y pTM1-F Asn268Ile/Val533Met. 48hs más tarde las células se fijaron y se realizó la inmunofluorescencia indirecta empleando los AcMos, 47F y 11F (sitio antigénico II), 19F (sitio antigénico IV/V/VI) y 44F (sitio antigénico I); este último sólo utilizado para el doble mutante Asn268Ile/Val533Met. Abajo a la derecha de cada imagen se muestra el objetivo utilizado en el microscopio de epifluorescencia (20x y 40x)

Con respecto a la capacidad fusogénica de esta variante se observa que la misma se mantiene pese a la mutación introducida. En este sentido en las imágenes de fluorescencia de la proteína F de este mutante con todos los AcMos reactivos vemos que en todos los casos se evidencia la presencia de sincicios y en todos ellos el número de núcleos por sincicio supera los 4.

Por su parte para la proteína mutante F Asn268Ile/Val533Met se vio que la misma es expresada dado que los resultados que se muestran en la figura 20 (derecha) revelan que la misma reaccionó con los AcMos 11F, 19F, 44F y 47F. Nuevamente en este caso sorprende la fluorescencia observada al enfrentarse a los dos AcMos del sitio antigénico II: 11F y 47F. Con respecto a la actividad fusogénica esta variante también es fusogénicamente activa dado que se observan sincicios con al menos 4 núcleos.

5.2 b3) Producción de los simples mutantes transmembrana Val533Leu y Val533Cys

La mutagénesis dirigida para la obtención del simple mutante Val533Leu se realizó a partir del ADN plasmídico proveniente de pTM1-Fwt. Por su parte el simple mutante Val533Cys se generó utilizando como molde el ADN plasmídico de la variante F Val533Leu una vez que la secuencia de la misma fue confirmada.

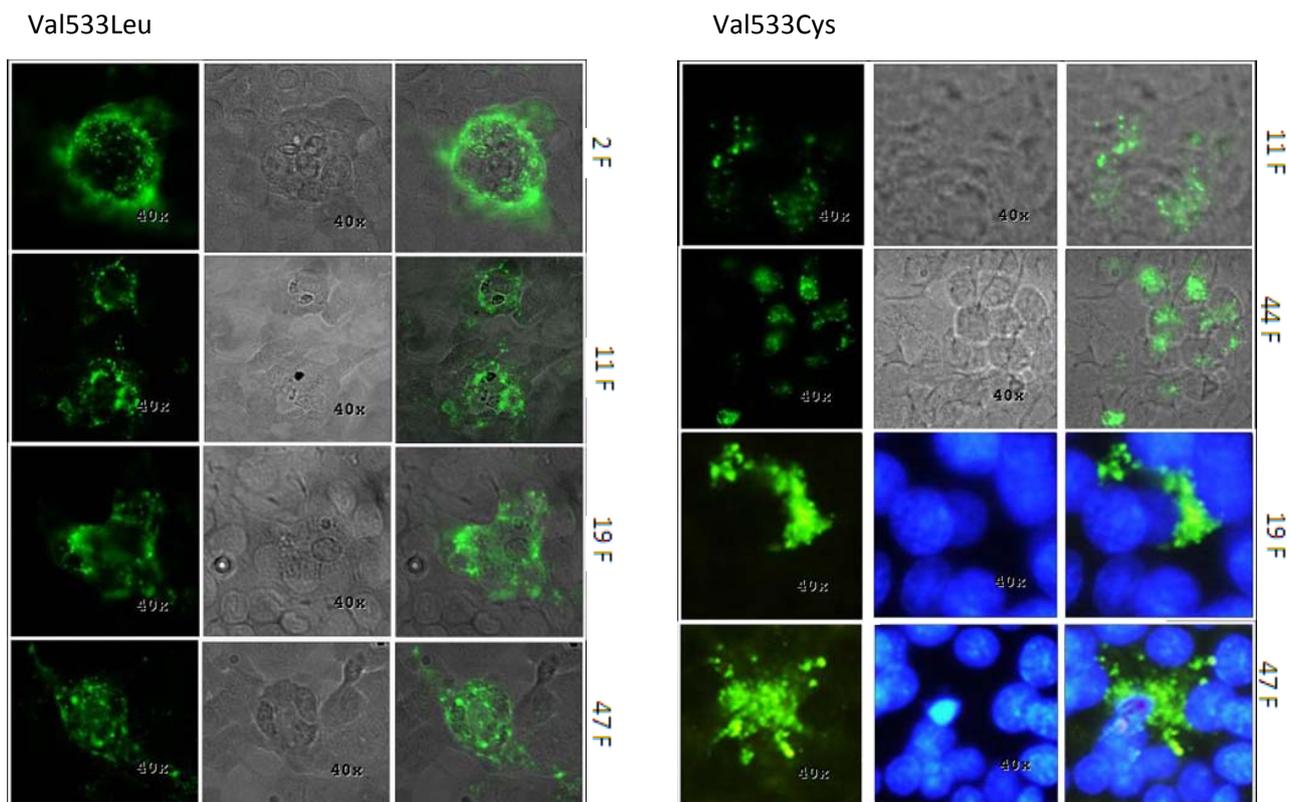


Figura 21: Análisis de expresión y formación de sincicios de los simples mutantes de la proteína F: Val533Leu y Val533Cys. 48hs luego de la transfección de células de la línea BSR-T7 con los plásmidos pTM1-F Val533Leu y pTM1-F Val533Cys las células se fijaron y se realizó la inmunofluorescencia indirecta empleando los AcMos, 47F y 11F (sitio antigénico II), 19F (sitio antigénico IV/V/VI) y 2F y 44F (sitio antigénico I). 2F y 44F fueron empleados para el mutante Val533Leu y Val533Cys respectivamente. Para la variante Val533Leu se muestran 3 fotografías correspondientes a la fluorescencia de la proteína F con Alexa 488 (verde), la misma imagen tomada con campo claro para visualizar las células y finalmente se muestra la superposición de ambas imágenes. Para el mutante Val533Cys se muestran imágenes de fluorescencia y campo claro con los AcMos 11F y 44F. Para este mismo mutante se muestra fluorescencia

por Alexa 488 (verde) y DAPI. Abajo a la derecha de cada imagen se muestra el objetivo utilizado en el microscopio de epifluorescencia (20x y 40x)

Como se observa en la figura 21 la transfección para el análisis posterior de expresión y actividad fusogénica por IFI de las proteínas mutantes F Val533Leu y F Val533Cys mostraron que las mismas reaccionaron con los AcMos 19F (sitio antigénico IV), 11F y 47F (sitio antigénico II) y 2F y 44F (sitio antigénico I). Los epitopes que reconocen estos anticuerpos no fueron alterados por la sustitución del aminoácido valina en la posición 533 por el residuo de leucina ni por el aminoácido cisteína. Con respecto a la presencia de actividad fusogénica, mientras que para la variante F Val533Leu la mutación presente no altera la capacidad de fusión de la proteína, para el mutante FVal533Cys la sustitución aminoacídica confina la fluorescencia a células individuales o a grupos de 3 células pero no permite discernir la presencia de sincicios.

5.2 b4) Producción de los mutantes transmembrana Val533/536Met (doble mutante) y Val533/536/544Met (triple mutante)

Para generar el mutante Val533/536Met se utilizó como molde el ADN plasmídico correspondiente al simple mutante Val533Met. Una vez confirmada la incorporación de la mutación en la posición 536 el ADN plasmídico correspondiente al doble mutante Val533/536Met se empleó como molde para generar el triple mutante Val533/536/544Met.

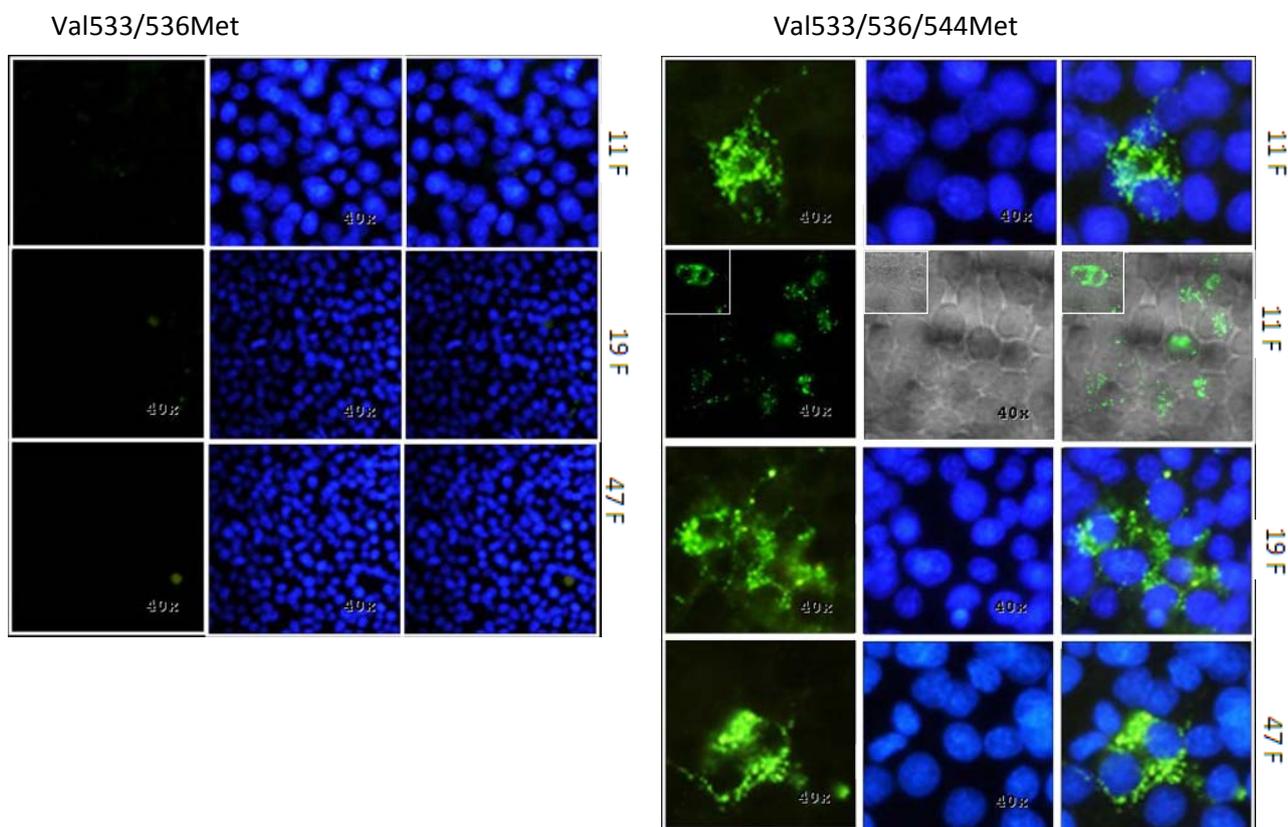


Figura 22: Análisis de expresión y formación de sincicios de las variantes de la proteína F Val533/536Met y Val533/536/544Met. Células de la línea BSR-T7 fueron transfectadas con los plásmidos pTM1-F Val533/536Met y pTM1-F Val533/536/544Met. 48hs más tarde las células se fijaron y se realizó la inmunofluorescencia indirecta

empleando los AcMos 11F (sitio antigénico II), 19F (sitio antigénico IV/V/VI) y 44F (sitio antigénico I). Se muestra una serie de 3 fotografías por cada AcMo: una correspondiente a la fluorescencia por Alexa 488 (verde) que representa la proteína F mutante, una correspondiente a la fluorescencia proveniente del fluorocromo DAPI y revela los núcleos celulares y la última que es el resultado de la superposición de ambas fotografías. Abajo a la derecha de cada imagen se muestra el objetivo utilizado en el microscopio de epifluorescencia (40x)

La figura 22 muestra los resultados de la IFI obtenida para las variantes F Val533/536Met y F Val533/536/544Met con los AcMos 11F, 47F y 19F. El triple mutante Val533/536/544Met reacciona con todos los anticuerpos descritos y la actividad de la proteína mutante permanece activa, al menos lo que refleja la IFI correspondiente al AcMo 19F donde se observa una célula multinucleada. Sin embargo el panorama observado para el doble mutante Val533/536 resultó completamente diferente debido a que esta variante de la proteína F no reaccionó con ninguno de los AcMos utilizados.

5.2 C) PRODUCCIÓN DEL PLÁSMIDO pAEUA2-FTM-

La secuencia de la proteína F de VRSH sin la región transmembrana fue clonada en este trabajo en el plásmido pAEUA2 (Anexo 3 mapa 3) bajo promotor eucariota de HCMV. En la figura 23 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa al luego de la digestión con la enzima PstI del plásmido pAEUA2 con el gen de la proteína F TM- clonado. Esta enzima corta en 3 sitios en el plásmido pAEUA2/F TM-; si la orientación es correcta los fragmentos que se generan son de 291, 586 y 8436pb.

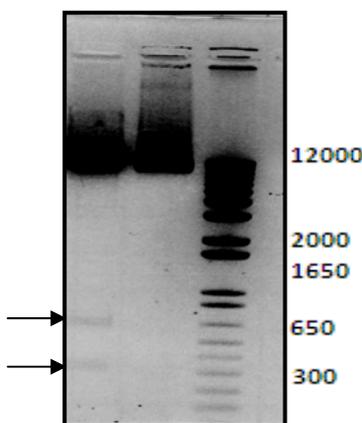


Figura 23: Digestión del plásmido pAEUA2 con el gen de la proteína F TM- clonado. Se señalan los pesos moleculares correspondientes a los fragmentos generados luego de la digestión (carril izquierdo). El peso molecular de las bandas fue comparado con el marcador de peso molecular, Ready-Load™ 1 Kb Plus DNA Ladder (sólo se señalan algunos peso moleculares). Con respecto al plásmido sin inserto, la enzima PstI corta en un solo sitio linearizándolo (carril derecho).

Se observa que la muestra señalada presenta bandas correspondientes a 291, 586 y 8436pb indicando la correcta inserción del inserto en el plásmido. Como control se muestra el plásmido pAEUA2 sin inserto. Posteriormente el gen de la proteína FTM- fue secuenciado nuevamente para producir este plásmido a gran escala para finalmente realizar los ensayos de expresión transitoria evaluados por IFI. El uso del pAEUA2 que expresa GFP junto con el fluorocromo Alexa 568 que reconoce el Ac primario anti-F permite determinar si la fluorescencia de la proteína F que se observa en rojo se corresponde con una célula que ha sido transfectada o si es un artefacto de la imagen a la vez que el empleo de DAPI permite la

localización de los núcleos. Se observa entonces una baja expresión de la proteína F TM- únicamente con el AcMo 47F por lo cual se incluyeron dos imágenes distintas.

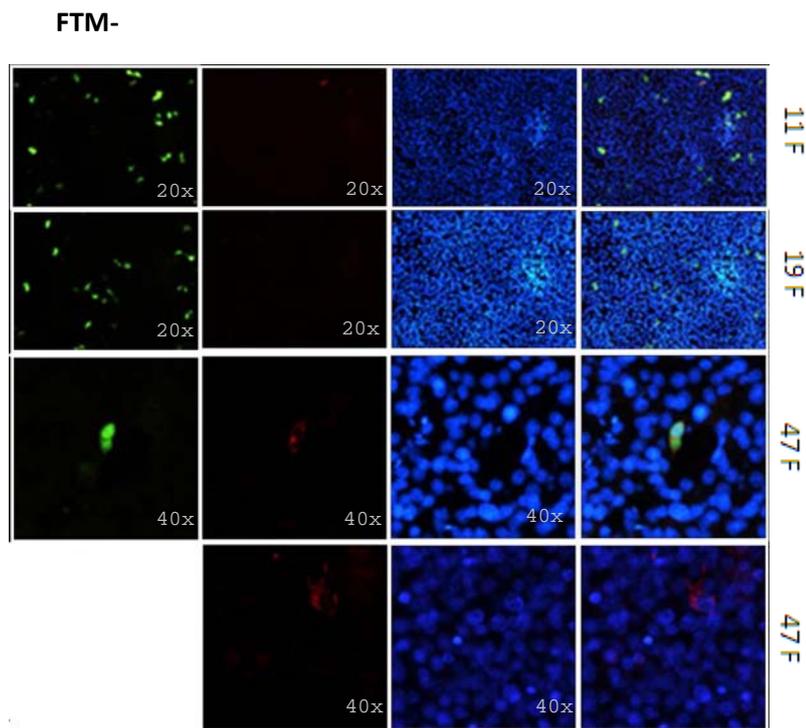


Figura 24: Análisis de expresión y formación de sincicios de la proteína F sin la región transmembrana clonada en el plásmido pAEUA2. Células de la línea BSR-T7 fueron transfectadas con el plásmido pAEUA2 que lleva el inserto que codifica la proteína F TM- del VRSH. 48hs más tarde las células se fijaron y se realizó la inmunofluorescencia indirecta empleando los AcMos: 47F y 11F (sitio antigénico II) y el AcMo 19F (sitio antigénico IV/V/VI). En la figura se muestra una serie de 4 fotografías (excepto la última) por cada AcMo: una correspondiente a la fluorescencia por Alexa 568 (rojo) que representa la proteína F mutante, una correspondiente a la fluorescencia proveniente del gen presente en el pAEUA2 que codifica para la GFP, una correspondiente al fluorocromo DAPI y en la última se observa el resultado de la superposición todas las fotografías. Abajo a la derecha de cada imagen se muestra el objetivo utilizado en el microscopio de epifluorescencia (20x y 40x)

Como se observa en la figura 24 los AcMos 11F y 19F no reaccionaron con la proteína FTM- quizá por una baja expresión de la misma o porque los epitopes de estos AcMos presentan modificaciones. Con el 47F, sin embargo, se observan una o dos células fluorescentes. Esto confirma la baja expresión de la proteína F TM- que por lo que se discute en la siguiente sección creemos no depende de la ausencia de la región transmembrana. A su vez la eficiencia de transfección fue baja.

6. DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis significó tanto la concreción de un trabajo realizado previamente, en lo que refiere a la selección y caracterización de virus mutantes del VRSH resistentes a un suero policlonal anti-F, así como el inicio de un estudio no realizado hasta el momento (en este modelo viral) como es el análisis de la región transmembrana de la proteína F presente en este virus.

6.1 PARTE 1: CARACTERIZACIÓN DE VIRUS MUTANTES RESISTENTES A LA PRESIÓN POR UN SUERO POLICLONAL ANTI-F Y ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD DE LAS MUTACIONES SELECCIONADAS.

Como material de partida para realizar la primera parte de la tesis se utilizó el doble mutante VRSH-E1 seleccionado luego de 56 pasajes en presencia de un suero policlonal anti-F. Como resultado de esta selección dos mutaciones puntuales fueron descritas: la mutación Asn268Ile (resultado de la transversión A x T en nucleótido 816) localizada en la porción extra citoplasmática de la proteína (concretamente en el sitio antigénico II) y la mutación Val533Met, localizada en la región transmembrana de la proteína F que aparece por la sustitución de G x A en el nucleótido 1610. Sin embargo el análisis de secuencia en la posición 1610 reveló la presencia simultánea tanto del nucleótido mutante como del nucleótido presente en el virus salvaje lo cual evidenció la existencia de una población heterogénea que componía a este virus denominado VRSH-E1 (Fig. 7) que no había sido purificado.

Por esta razón nos planteamos: i) analizar la estabilidad de las mutaciones previamente seleccionadas con particular énfasis en la mutación Val533Met por pasaje del doble mutante en ausencia de presión inmune, y ii) purificar el virus mediante ensayo de plaqueo viral.

En primera instancia se analizó de forma preliminar la composición de las secuencias halladas en el doble mutante por análisis de colonias del mutante VRSH-E1 clonado en el plásmido pJet1.2/blunt. La mutación Asn268Ile estuvo presente en todas las colonias analizadas. Sin embargo para la mutación Val533Met, si bien la mayoría de las colonias (5 de 7) presentaban la mutación, había algunas que poseían el nucleótido salvaje (2 de 7) (tabla 4). Con estos datos se procedió al pasaje seriado del virus VRSH-E1 en ausencia de presión inmune (6 pasajes en total). A los 3 pasajes sin presión se analizó la secuencia consenso presente en este virus (denominado VRSH-E1 3P s/p) a partir del producto de PCR el cual también se clonó para analizar distintas colonias de modo de evaluar la presencia o ausencia de las mutaciones en cada una de ellas. Interesantemente, mientras que la mutación Asn268Ile se mantenía presente, la mutación Val533Met sólo se hallaba en una fracción pequeña de colonias analizadas (2 de 7). De este modo la población viral con el nucleótido salvaje en la posición 1610 se encontró más representada en la población de genomas que compone al virus. Finalmente luego de 3 pasajes más en ausencia de presión inmune la mutación en la posición 1610 (Val533Met) revirtió por completo al nucleótido salvaje a la vez que la mutación Asn268Ile permanecía inalterada. De este modo se logró seleccionar un simple mutante por

pasajes seriados del virus mutante VRSH-E1 en ausencia de presión inmune; este virus fue denominado VRSH-C10.

Cabe aclarar que nuestro tamizaje de colonias para cada situación analizada se realizó con un número escaso de las mismas y por tanto no presenta significancia estadística. De todos modos si tomamos como ejemplo lo ocurrido para los clones de VRSH-E1 observamos que la diferencia de colonias positivas vs negativas para la mutación Val533Met es elevada, dado que un 70% de las mismas eran positivas frente a un 30% que tenía el nucleótido salvaje, una diferencia suficiente para establecer cuál es la población mayoritaria.

A partir de estos datos se confirma entonces que: i) la población mayoritaria en el virus que denominamos VRSH-E1, posee las mutaciones Asn268Ile y Val533Met, y ii) una vez que este virus es crecido en ausencia de suero policlonal anti-F, la mutación transmembrana rápidamente revierte al nucleótido salvaje siendo ésta la nueva población mayoritaria. En este caso, para VRSH-C10, se confirmó que no existe otra modificación excepto la mutación A x T en la posición nucleotídica 816 (Asn268Ile) mientras que el resto de la secuencia de la proteína F permanece inalterada. La aparición de revertantes ya ha sido descrita en la proteína F del VRSH en dobles mutantes resistentes a AcMos pertenecientes a los sitios antigénicos II y IV/V/VI^[201]. En este trabajo que fue realizado en el laboratorio se demostró que la mutación presente en el sitio antigénico IV/V/VI revertía luego de 20 pasajes sin presión inmune mientras que la mutación presente en el sitio antigénico II permanecía inalterada. La reversión en este caso se dio por una mutación compensatoria en el mismo codón pero no en la misma posición nucleotídica como ocurrió en nuestro trabajo (Parra, G y cols datos no publicados). Con respecto a la reversión de mutaciones presentes en la región transmembrana de proteínas de fusión de virus resistentes a la neutralización, en VIH-1 se ha demostrado que luego de extensivos pasajes en ausencia de presión inmune fue posible obtener revertantes que presentaron en su mayoría una mutación compensatoria en un sitio distante^[202].

Para la purificación de los virus VRSH-E1, VRSH-C10, VRSH-E3 y VRSH-E2 se adaptó y optimizó el ensayo de plaqueo viral desarrollado por la Dra. Jennifer McKimm-Breschlin en el año 2004^[203] (sumado a comunicaciones personales con esta investigadora). Cabe destacar la importancia de esta puesta a punto dada la dificultad que representa la purificación de este virus. Para el virus VRSH-E1 se recuperaron dos placas diferentes a partir de la purificación; los virus purificados, denominados VRSH-E1/-1 y VRSH-E1/-2, fueron posteriormente caracterizados. .

Observamos que todos los virus mutantes presentan un efecto citopático marcado evidenciado por la presencia de sincicios, no existiendo diferencias sustantivas en el tamaño de los mismos entre los distintos mutantes y respecto a los virus control. Las mutaciones presentes en los virus mutantes por tanto no impiden la formación de sincicios lo que implica que: a) la proteína F sigue siendo fusogénicamente activa a pesar de las mutaciones generadas y b) que estos virus son competentes a nivel replicativo.

La resistencia a la neutralización de los virus mutantes se evaluó mediante un ensayo cuantitativo de microneutralización^[179] en el cual la eficiencia de replicación viral se estima a partir de la cantidad de glicoproteína G presente mediante un AcMo anti-G . Para ello se enfrentó un número definido de partículas virales para cada virus mutante y control (1000UFP) a diferentes diluciones de suero policlonal anti-F. Estas diluciones se eligieron debido a que son las mismas que las empleadas durante el proceso de selección del

doble mutante VRSH-E1^[189]. Los virus mutantes se confirmaron como resistentes a la neutralización por este ensayo ya que se requiere una cantidad muy elevada de anticuerpos para poder neutralizarlos parcialmente (Fig.12), mientras que los virus control son completamente inhibidos por el suero policlonal anti-F. En este ensayo el comportamiento de VRSH-E1/-2, VRSH-E1/-1 y VRSH-C10 fue básicamente el mismo demostrando que si bien existe una reducción de la absorbancia a medida que se incrementa la concentración de anti-F (llegando incluso a una reducción del 75% en la dilución 1/50) igualmente los virus mutantes replican activamente a diferencia de lo que ocurre en los virus control. Esta reducción acentuada en la dilución 1/50 podría estar relacionada con el hecho que en el suero policlonal existan anticuerpos capaces de reconocer algún(algunos) epitope(s) cercano(s) al sitio de neutralización, de manera que si bien no son evadidos por las mutaciones, sí logran neutralizar al virus. Presumiblemente, su efecto sea más notorio a concentraciones más elevadas de suero debido a que posean una afinidad mucho menor que la de los anticuerpos específicos para el sitio neutralizante.

Con respecto a la diferencia observada para los virus controles en ausencia de anti-F (VRSH-E3 con una absorbancia mucho menor que VRSH-E2), este comportamiento podría estar relacionado con la generación de partículas defectivas interferentes por parte del virus VRSH-E3 en estas condiciones. En este sentido el virus VRSH-E3 podría generar muchas partículas defectivas interferentes con respecto al resto de los virus que haga que la infectividad sea menor^[203]. La ocurrencia de este evento es probable si consideramos que VRSH-E3 ha sido sometido a sucesivos pasajes (56 pasajes seriados) en ausencia de anticuerpos.

Por su parte la caracterización genética de los mutantes purificados VRSH-E1/-1 y VRSH-E1/-2 resultó idéntica al virus original VRSH-E1 sin purificar, dado que presentaron la transversión A x T en el nucleótido 816, que se traduce en el cambio aminoacídico Asn268Ile y la transición en la posición nucleotídica 1610 que modifica el residuo de valina por el de metionina en la posición 533.

Con respecto al virus VRSH-C10 es de interés señalar que sólo alcanzaron 6 pasajes para que la mutación presente en el dominio transmembrana revirtiera al nucleótido salvaje permaneciendo únicamente la mutación Asn268Ile. Esto implica que la estabilidad de ambas mutaciones, Asn268Ile y Val533Met es prácticamente opuesta. Mientras la mutación Val533Met revierte de inmediato una vez que se retira el suero de selección, la mutación presente en el sitio antigénico II, Asn268Ile, permanece inalterada. Si bien es cierto que el número de pasajes en ausencia de presión inmune fue relativamente bajo para afirmar la estabilidad de la mutación Asn268Ile, tenemos argumentos para plantear que es una mutación estable. En primer lugar la secuencia nucleotídica que deriva del mutante VRSH-C10 es una secuencia que en el cromatograma aparece como única por tanto para la posición 816 no se constata la presencia de otro nucleótido que no sea el que se corresponde con la mutación señalada. Por otro lado existen datos previos provenientes del trabajo realizado por Parra en nuestro laboratorio (mencionado anteriormente) en el cual virus mutantes resistentes a la neutralización por el AcMo 47F que presentaban la mutación 816 (Asn268Ile), al ser crecidos en ausencia de presión inmune no revertían esta mutación por lo cual la misma no genera una disminución de la eficacia biológica ("fitness") de la población viral^[201]. Finalmente este resultado concuerda además con lo observado por Zhao y cols^[180] en el que el mutante F212 (mutante que escapa a la neutralización por el Palivizumab) que posee la mutación A x T en el

nucleótido 816, luego de 15 pasajes en ausencia de presión inmune no mostró cambios en su secuencia nucleotídica.

La mutación 268 ha sido seleccionada previamente en virus resistentes a los AcMos 47F (mutante 47F/7), 11F (mutante C4389/1)^[18, 165, 168] y Palivizumab^[180] y, en este trabajo de tesis, la misma mutación ha sido confirmada en un doble mutante empleando un suero policlonal anti-F y seleccionada luego del pasaje del mismo en ausencia de presión inmune. De este modo nuestros resultados reafirman el concepto de que un suero policlonal contendría una población de anticuerpos en los cuales las especificidades de los AcMos estarían representados como se observó en estudios previos en los cuales sueros de pacientes post-infección y AcMos competían por la unión a epitopes en la proteína F^{[159] [204]}. Todos los anticuerpos monoclonales mencionados que seleccionaron la mutación 268 mapean en el sitio antigénico II que está compuesto esencialmente por epitopes de carácter conformacional^{[159] [166] [160]} de modo que la modificación de alguno de los residuos aminoacídicos que conforman este sitio puede afectar la unión de AcMos que reconocen epitopes diferentes en esta región antigénica^[159, 166]. Esta mutación provoca la pérdida completa de la reactividad de la mayoría de los AcMos del sitio antigénico II como se demostró en los ensayos de ELISA, IFI y WB. A partir de estos ensayos se observó que los virus mutantes VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2, VRSH-C10 perdieron reactividad con la mayoría de los anticuerpos monoclonales que reconocen epitopes en el sitio antigénico II de la proteína F, en particular el 47F y 11F como era de esperarse. Este hecho está relacionado concretamente con la presencia de la mutación Asn268Ile ya que el resultado fue el mismo para los dobles como para el simple mutante. Es interesante destacar que con respecto al AcMo 7C2 los resultados obtenidos por ELISA e IFI presentan algunas discrepancias dado que mientras que por ELISA los virus mutantes no son reconocidos por este AcMo, en la IFI se observan algunas células fluorescentes. Una de las explicaciones posibles para este resultado es que el epitope que reconoce este anticuerpo monoclonal no se vea completamente alterado por las mutaciones presentes y pueda ser reconocido (aunque en menor medida) por el AcMo 7C2. Otra explicación posible a este comportamiento es que si bien estos virus han sido purificados quizá necesiten una ronda más de purificación para tener certeza de que no exista población de virus salvaje en estos virus. Una baja reactividad en el ELISA (menor al 25%) refleja lo que ocurre en el total de células que componen el extracto proteico, sin embargo en la IFI se observa lo que ocurre en cada célula en particular y de haber virus salvaje todavía presente, aunque sea escaso, podría dar lugar a la fluorescencia observada.

Con respecto al WB los dos AcMos empleados, 18B2 y 19F, que reconocen epitopes en el sitio antigénico II y IV/V/VI respectivamente, se encuentran ubicados en la subunidad F1 de la proteína F procesada proteolíticamente (Fig. 5). En el WB la inmunodetección revela la presencia de bandas correspondientes a esta subunidad; la idéntica migración de los extractos de virus mutantes con respecto a los controles podría sugerir que no existen grandes cambios en la glicosilación o procesamiento proteolítico de la proteína. Sin embargo en los controles VRSH-E2 y VRSH-E3 se observa también una banda que se corresponde con la proteína sin procesar (precursor F0). El hecho de que sólo se observe en los controles no tiene que ver con el origen de la muestra sino que creemos se trata o de un problema de concentración de proteínas o que tiene que ver con el tiempo de infección transcurrido antes de levantar la infección para

preparar el extracto. Esto último podría ocasionar que todavía hubiera proteína sin procesar. De todos modos es claro que la reactividad de los virus mutantes se pierde frente al AcMo 18B2.

Por tanto evaluando los resultados globales de la caracterización antigénica observamos que la presencia de la mutación Asn268Ile modifica la unión, no sólo de los AcMos 47F y 11F sino además la del resto de los AcMos de este sitio antigénico que también se vieron afectados lo cual concuerda con datos previos^[159, 166]. Sin embargo los virus mutantes VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 y VRSH-C10 permanecieron reactivos con AcMos dirigidos contra epitopes pertenecientes a otros dos sitios antigénicos estudiados en este trabajo (I y IV/V/VI)^[166].

Luego de analizar cómo fue el proceso de selección de los dobles mutantes con respecto al del simple mutante, VRSH-C10, observamos que este último surge por reversión de la mutación hallada en el nucleótido 1610 localizada en la región TM como se mencionó anteriormente. Sin embargo continúa evadiendo la presión por el suero policlonal anti-F según lo visto en los ensayos de microneutralización y aislamiento en presencia de este suero policlonal. ¿Cómo se explica entonces la presencia de la mutación Val533Met en los dobles mutantes seleccionados cuando la mutación Asn268Ile *per se* parece ser responsable de la resistencia, es más estable, y ya había sido seleccionada en simples mutantes confirmando resistencia al AcMo utilizado para la selección^[18, 165, 168, 180]? La mutación transmembrana Val533Met podría tener un papel –no conocido aún- en el virus mutante, en particular en la proteína F, en cuanto a la evasión inmune pero no ser responsable de la resistencia. Sin embargo, es una mutación muy lábil, que se pierde rápidamente.

Otra pregunta que surge a partir de nuestros datos y estudios previos es ¿por qué el aminoácido 268 es el que más cambia bajo presión inmune con AcMos pertenecientes al sitio antigénico II (incluido el Palivizumab) y suero policlonal contra la proteína F? Actualmente no existen datos estructurales que permitan establecer cómo estas mutaciones podrían alterar la estructura y funcionalidad de esta proteína. De todos modos si se considera que son muy escasos los cambios generados por selección inmune en esta proteína^[159, 166], la selección de esta mutación y su permanencia una vez removida la presión (como se ha visto también otros trabajos^[180, 201]), implica que este sitio posee cierta plasticidad para soportar cambios. De hecho, la información disponible en literatura muestra que el aminoácido 268 es de los pocos residuos que presenta cambios en relación al resto de los aminoácidos que conforman la proteína F^[159, 180]. Es posible que el cambio de Asn a Ile modifique espacialmente esta región de la proteína, normalmente expuesta a la interacción con anticuerpos, provocando que varios AcMos específicos del sitio antigénico II no presenten reactividad con los virus mutantes.

Con respecto a la mutación presente en los dobles mutantes VRSH-E1/-1 y VRSH-E1/-2 hallada en el aminoácido 533 correspondiente a la región transmembrana sólo se ha reportado un número reducido de mutaciones localizadas en la región de anclaje de la proteína de fusión en otros virus siendo por tanto un evento poco frecuente^[205]. Así por ejemplo se han reportado mutaciones en la región transmembrana de gp-41 de VIH-1, como consecuencia de la selección de mutantes empleando anticuerpos neutralizantes^[191]. Una pregunta que surge es si el residuo 533 modificado podría estar directamente involucrado en el contacto con los anticuerpos^[206, 207] o si esta mutación podría generar efectos más distantes en la

conformación de la proteína que interfieran con la unión de anticuerpos^[208, 209]. En este sentido una posibilidad es que la presión generada por los Acs presentes en el suero genere la aparición de mutaciones en la porción citoplasmática que requieran de otra(s) mutación(es) en otro(s) sitio(s) de la proteína para evitar posibles consecuencias negativas en la estructura de la proteína^[191]. Otra posibilidad es que esta región hidrofóbica de la proteína quede expuesta durante el proceso de fusión de membranas, accesible a los anticuerpos. Al desconocer el mecanismo de fusión de la proteína F del VRSH y al no poseer datos estructurales sólo es posible especular sobre estas posibilidades. Por un lado, en el trabajo de Reitz y cols donde se seleccionaron mutantes resistentes a un suero policlonal humano contra la gp41 de HIV la localización de una mutación localizada en la región TM se consideró que podría colaborar de alguna manera en la evasión de la neutralización^[191]. Se demostró además que sólo el cambio de Ala x Thr en la posición 582 de la región TM hallado en este mutante era responsable de la resistencia. Por su parte, el trabajo de Bissonnette y cols sugirió que la región TM de la proteína F de PIV5 podría ser más extensa que la predicha, quedando una porción expuesta al acceso de Acs, y que luego penetraría en la membrana durante el proceso de fusión^[148]. De ocurrir esto en la F de VRSH, podría entonces ser posible que esta mutación apareciera y fuera independiente de la seleccionada en el sitio antigénico II, lo cual permitiría explicar además su labilidad.

Como se mencionó en la introducción cambios en la región transmembrana revisten particular interés debido a que esta región se demostró que es crítica para la función de la proteína F en otros Paramyxovirus^[148, 192]. Interesantemente, hasta el momento no hay estudios específicos realizados en esta región de la proteína F del VRSH. Sólo se ha estudiado la implicancia del péptido de fusión y de la cola citoplasmática en la actividad fusogénica de esta proteína^[96, 210].

Con respecto a la aparición en la naturaleza de mutantes resistentes a la neutralización ya sea por AcMos o por un suero policlonal dirigido contra la proteína de fusión, el único dato reportado al momento surge del trabajo de Beeler y cols donde se observó que el AcMo 1129 era incapaz de neutralizar uno de los aislados naturales contra el cual había sido testado indicando que el VRSH salvaje circulante podría ser intrínsecamente resistente a este AcMo y por ende al PZ^[158]. De acuerdo a la teoría de cuasiespecies^[153] es posible que estos mutantes existan de hecho en la naturaleza pero en una proporción muy baja. Posiblemente estos mutantes se encuentren representados en muy baja proporción en las cepas salvajes circulantes; de hecho se ha observado *in vitro* que alguno de estos mutantes disminuyen la eficacia biológica y/o adaptabilidad de las poblaciones virales^[201] lo cual justificaría por qué no son halladas en la naturaleza. De todos modos no podemos descartar la posibilidad que la cepa adaptada a cultivos Long utilizada en este trabajo, pueda ser más susceptible a la neutralización por anticuerpos monoclonales anti-F que los aislados naturales, en su proceso de adaptación a la replicación en cultivos celulares^[211].

6.2 PARTE 2: IMPLICANCIAS DE LA MODIFICACIÓN DE RESIDUOS AMINOACÍDICOS EN LA PROTEÍNA F, EN PARTICULAR EN LA REGIÓN TM - DEL VRSH.

Con respecto a la incorporación de mutaciones en la región transmembrana de la proteína F del VRSH a fin de evaluar su efecto en la expresión y capacidad fusogénica en proteínas F recombinantes, cabe señalar que lo presentado en este trabajo representa una aproximación al estudio de la región transmembrana de una glicoproteína de superficie viral. En este sentido, el hecho de haber seleccionado un doble mutante resistente a un suero policlonal anti-F en el que una de las mutaciones se hallaba en esta región hidrofóbica y la ausencia de trabajos previos realizados en esta región de la proteína de fusión del VRSH representa un primer estudio interesante que puede aportar al conocimiento existente de esta proteína viral. La mímesis de las mutaciones obtenidas *in vitro* en los virus simple (Asn268Ile) y dobles (Asn268Ile/Val533Met) mutantes en proteínas F recombinantes expresadas en sistema eucariota, permitió comparar la expresión y actividad de las proteínas de fusión mutantes en el marco de una infección viral con respecto a proteínas F recombinantes con las mismas mutaciones pero expresadas de forma aislada. De esta forma se evaluó el efecto de estas mutaciones seleccionadas, directamente en la expresión y actividad de la proteína F.

La expresión transitoria de proteínas recombinantes F Val 533Met buscó responder si esta mutación era capaz por si misma de alterar la funcionalidad de la proteína. Intentamos con esto explicar la razón de la selección espontánea de esta mutación en cultivos celulares por presión inmune con un suero policlonal anti-F. Observamos que la proteína F mutante Val533Met es expresada correctamente dado que reaccionó con los AcMos pertenecientes a los sitios antigénicos I, II y IV/V/VI y a su vez podemos afirmar que la mutación Val533Met *per se* no parece alterar notoriamente la capacidad fusogénica de la proteína, si bien no fue posible evaluar cuantitativamente la actividad fusogénica. Inferimos que es expresada en la membrana de forma correcta dado que para formar sincicios es necesaria la expresión de dicha proteína en la membrana.

Por su parte cuando mimetizamos lo obtenido en cultivo para los virus VRSH-E1/-1, VRSH-E1/-2 y VRSH-C10 generando las mutaciones Asn268Ile y Asn268Ile/Val533Met, sorprendentemente, si bien se observa que las proteínas mutantes se expresan, llama la atención el reconocimiento de los AcMos pertenecientes al sitio antigénico II 11F y 47F, en particular en el caso del AcMo 47F en el cual la fluorescencia fue muy marcada. La fluorescencia observada para estos anticuerpos (figura 15) se contrapone con lo visto previamente para los virus mutantes que presentaban las mismas mutaciones en los cuales la pérdida de reactividad era total con la mayoría de los AcMos del sitio antigénico II pero en particular con estos dos anticuerpos (figura 8). Una posible explicación es que en ausencia de otras proteínas virales presentes en la partícula viral, presumiblemente otras proteínas localizadas en la membrana, la proteína F sobre-expresada podría adquirir una conformación más desplegada que de algún modo pueda restituir (al menos parcialmente) regiones conteniendo los epítopes reconocidos por los AcMos.

Con respecto a la capacidad fusogénica de estas variantes, observamos en la figura 15 que las mismas forman sincicios, aunque al igual que en el caso del mutante Val533Met no podemos establecer si

en menor o mayor medida que la salvaje. Este resultado sí concuerda con lo obtenido *in vitro* para los virus mutantes. Por su parte la modificación de un residuo de valina por uno de leucina no hace suponer un cambio drástico para la proteína dado que ambos poseen carácter hidrofóbico. Ello se vio reflejado en los datos obtenidos por IFI (Figura 16) para esta variante tanto en términos de expresión como en la capacidad de esta proteína para fusionar membranas. Por el contrario para la modificación en la posición 533 del residuo de valina por cisteína (aminoácido no polar vs aminoácido polar) no se observó un cambio en el nivel de expresión mientras que la capacidad fusogénica parece estar alterada. Si bien se esperaba una alteración en la capacidad fusogénica de la F debido al cambio en la naturaleza del aminoácido los resultados no fueron concluyentes y no permiten confirmar la presencia de sincicios. Es en estos casos donde un ensayo de medida de capacidad fusogénica se vuelve indispensable (ver perspectivas).

Con respecto al doble mutante Val533/536Met, la ausencia de expresión revelada por la IFI (figura 17), con los anticuerpos ensayados podría suponer que la incorporación de estas dos mutaciones estarían alterando la expresión de esta proteína, evitando por ejemplo que se exprese o que su transporte sea ineficiente. Este sería un posible escenario aunque es importante señalar que sólo se emplearon AcMos correspondientes a los sitios antigénicos II y IV/V/VI es decir que la proteína no fue mapeada completamente. A su vez esto podría ser un problema de la transfección lo cual no podemos probarlo ya que no poseemos un control interno de transfección. Podría ocurrir que la presencia de estas dos mutaciones que sustituyeron los residuos de valina en las posiciones 533 y 536 de forma simultánea alteraran los epitopes presentes en la proteína de forma tal que evitaran el reconocimiento por los AcMos. Si esta última hipótesis es correcta la incorporación de la tercer mutación en la posición 544, Val544Met, restituiría los epitopes lo cual explica la reactividad que presentó al ser enfrentado a los AcMos. Con los resultados obtenidos no podemos inferir si esta proteína se expresa y si la mutación afecta o no la capacidad de fusión que presenta la proteína.

Si pensamos que la proteína no se expresa y que esto es resultado de la acumulación de mutaciones esto no se corresponde con lo obtenido al analizar la fluorescencia del triple mutante Val533/536/544Met, ya que la misma no solo reacciona con todos los AcMos ensayados sino que además al parecer por lo observado en la imagen correspondiente al AcMo 19F estaría formando sincicios (Fig. 22).

A diferencia de las variantes mencionadas anteriormente que fueron expresadas en células que expresan constitutivamente la polimerasa T7, la proteína F mutante TM- fue clonada en un plásmido diferente utilizado en el laboratorio (pAEUA2). A pesar de que los resultados obtenidos en este trabajo no fueron los esperados en el sentido que sólo un par de células presentaron fluorescencia y únicamente con el AcMo 47F como lo muestra la figura 19. Dos precisiones hay que realizar al respecto; en primer lugar la eficiencia de transfección fue baja dado que el número de células fluorescentes por GFP en ningún caso superó el 50% y por último, lo más importante la proteína F fue clonada sin modificaciones en este vector bajo promotor eucariota lo cual implica que la transcripción, a diferencia del sistema T7, se realizó en el núcleo. ¿Cuál es la importancia de este hecho? El VRSH al igual que la mayoría de los virus ARN, con excepción de algunos como los retrovirus e influenza, realiza su ciclo de multiplicación viral enteramente en el citoplasma de la célula huésped. En este sentido poseen su propia maquinaria transcripcional que involucra la ARN polimerasa ARN dependiente la cual permite la síntesis de ARNm citoplasmáticos a partir

del ARN genómico viral. Por este motivo este ARNm no es susceptible de sufrir procesamiento ni maduración como ocurre con los ARNm sintetizados en el núcleo por la ARN pol II. Por este motivo varios investigadores han realizado construcciones para expresar la proteína de interés mediante la optimización del uso de codones de modo de adaptarse al uso presente en el sistema a expresar (células eucariotas, células de insecto, levaduras, etc). A su vez en el caso de la secuencia codificante de la proteína F del VRSH se observan no sólo sitios aceptores de splicing sino que además presenta cuatro sitios potenciales de poliadenilación; en particular el segundo sitio genera poliadenilación prematura del ARNm llevando este producto a su degradación por ausencia de un codón de terminación de la transcripción. Por este motivo se ha optimizado la secuencia codificante de la proteína F del VRSH para su expresión bajo promotor eucariota^[104, 212] evaluando a su vez cuáles son las etapas críticas para la expresión de esta proteína mediada por la ARN pol II^[213].

Lamentablemente en nuestro caso particular nosotros empleamos la secuencia intacta del gen que codifica para la proteína F del VRSH (cepa Long) al clonarla bajo promotor eucariota siendo ésta la explicación más lógica para la prácticamente nula expresión de esta variante. Incluso al no poseer clonado el gen de la F completa no podemos realizar comparaciones (se intentó pero no se logró clonar) al menos en estas condiciones con respecto a la expresión y la actividad fusogénica de esta proteína.

Por lo expuesto anteriormente con respecto las variantes de la proteína F mutantes expresadas en sistema eucariota es necesario realizar 4 precisiones:

i) por un lado el sistema de expresión empleado para generar las variantes derivadas del pTM1 (pTM1-Fwt, pTM1-F Val533Met, pTM1-F Asn268Ile, pTM1-F Asn268Ile/Val533Met, pTM1-F Val533Leu, pTM1-F Val533Cys, pTM1-F Val533/536Met y pTM1-F Val533/536/544Met), emplea un promotor procarionta, promotor de T7, la cual se expresa en las células BSR-T7. Por lo tanto los resultados de expresión obtenidos a partir de estas variantes reflejan el efecto de las mutaciones en las proteínas F expresadas.

ii) por otro lado en ningún caso es posible establecer la localización de las proteínas en la membrana celular, sólo podemos inferir expresión en membrana en aquellos casos en los que la formación de sincicios resultó evidente (Val533Met, Asn268Ile, Asn268Ile/Val533Met y Val533/536/544Met dado que las células siempre fueron permeabilizadas para la IFI (se intentó pero no fue posible poner a punto un protocolo eficiente para IFI en células sin permeabilizar).

iii) dado que el índice de fusión no fue posible establecerlo mediante un ensayo cuantitativo, sólo si la fusión se ve seriamente alterada (o si es nula) es que nosotros podíamos afirmar si la mutación afectaba o no la actividad de la proteína. Aparentemente sólo las proteínas mutantes F Val533Cys y Val533/536Met no presentan actividad fusogénica aunque en el caso de la proteína F doble mutante Val533/536Met ni siquiera hay expresión.

iv) Con respecto a la expresión de la proteína F TM-, la expresión de la misma se realizó bajo promotor eucariota (HCMV) pero al no haber sido optimizada la secuencia codificante de esta proteína para su correcta expresión en el núcleo de células eucariotas los resultados no son concluyentes.

En términos generales los resultados obtenidos de las variantes de la proteína F recombinantes permiten establecer que el aminoácido 533 permite la incorporación de otros aminoácidos lo cual hace suponer que estos cambios no alteran drásticamente la estructura de la proteína. En la caso de la sustitución de valina por leucina era esperable que no generara cambios evidentes ya que ambos aminoácidos poseen las mismas propiedades químicas.

Como se mencionó en la introducción, la proteína F del VRSH muestra un alto grado de conservación tanto dentro como entre los grupos antigénicos A y B, así como también con el VRS bovino. Dado este alto grado de conservación es sorprendente, al menos en nuestras condiciones de trabajo, que las variantes Val533Met, Val533Leu, Val533/536/544Met no seleccionadas en virus mutantes presenten actividad fusogénica que denote que esta proteína es tolerante a cambios que tienen lugar en su región transmembrana. Estos resultados podrían sugerir que otros aspectos además de la actividad fusogénica estarían limitando el espectro de cambios tolerados dentro de la proteína F como ser alguna función especial en el crecimiento del virus. En este sentido es interesante pensar que los anticuerpos presentes en el suero policlonal podrían actuar no solamente por inhibición de la fusión^[214].

Este es el primer trabajo exploratorio realizado en la región transmembrana de la proteína de fusión del VRSH reportado hasta el momento. Este diseño experimental fue inspirado en los resultados previos obtenidos a partir de los virus mutantes en particular la mutación lo cual motivó este estudio preliminar en la región TM comenzando con los residuos de valina presentes en esta porción hidrofóbica de la proteína. Si bien el análisis de la expresión y actividad fusogénica de las variantes mutadas de la proteína F del VRSH fue realizado únicamente por ensayos de inmunofluorescencia indirecta esto permite continuar el estudio del efecto de estas mutaciones empleando nuevos abordajes experimentales. La región transmembrana de la proteína F del VRSH comparte características similares con respecto a la naturaleza de los aminoácidos que la componen y el largo del dominio a la del resto de los Paramyxovirus. Hoy en día se sabe que la región transmembrana de las proteínas de fusión no es meramente una región que ancla a la proteína de fusión en la membrana sino que participa activamente en las diferentes etapas del proceso que lleva a la fusión de membranas. Este trabajo deja planteadas algunas preguntas para continuar analizando esta región hidrofóbica.

7. CONCLUSIONES

- Las mutaciones Asn268Ile y Val533Met presentes en la proteína F del virus VRSH-E1 no poseen la misma estabilidad en ausencia de presión inmune siendo la mutación Val533Met menos estable. Específicamente la mutación Val533Met revirtió luego de 6 pasajes en ausencia de presión inmune mientras que la mutación Asn268Ile permaneció inalterada. De este modo logramos seleccionar el mutante VRSH-C10: este virus es resistente a la presión por un suero policlonal anti-F según demostramos mediante ensayo de microneutralización, y la caracterización genética reveló que la única mutación presente fue Asn268Ile. La caracterización antigénica de este simple mutante mostró una pérdida completa de la reactividad frente a los AcMos del sitio antigénico II. Además de nuestros resultados, la permanencia de la mutación Asn268Ile en ausencia de presión inmune fue también reportada en trabajos previos, por lo que la mutación 268 podría ser considerada una mutación estable.

- Se logró caracterizar antigénicamente del doble mutante VRSH-E1 resistente a la presión por un suero policlonal anti-F previamente seleccionado. Este mutante perdió reactividad con todos los anticuerpos del sitio antigénico II.

- La purificación por plaqueo viral del VRSH-E1 fue exitosa. Los virus obtenidos de la purificación: VRSH-E1/-1 y VRSH-E1-2 fueron caracterizados antigénica y genéticamente. Por ensayo de microneutralización se confirmó la resistencia de estos virus purificados frente a la presión por un suero policlonal anti-F. VRSH-E1/-1 y VRSH-E1/-2 presentan las mismas mutaciones que el virus parental VRSH-E1 en la proteína de fusión: una transversión en el nucleótido 816 de A x T que da lugar al cambio Asn268Ile (en el ectodominio de la proteína F, en el sitio antigénico II) y una transición de G x A en el nucleótido 1610 que genera el cambio de Val por Met en el residuo 533 (en el dominio transmembrana). A nivel antigénico ambos también pierden reactividad por los AcMos del sitio antigénico II.

- Con respecto al estudio del efecto de mutaciones puntuales en la expresión y actividad fusogénica de proteínas F recombinantes esto se pudo realizar para la mayoría de las variantes analizadas aunque en todos los casos la capacidad fusogénica no logró determinarse cuantitativamente.

- Los ensayos de expresión de los simples mutantes Val533Met y Val533Leu reveló que estos cambios no alteran la expresión de la proteína F recombinante y son capaces de formar sincicios. Estas mutaciones por tanto no alterarían su funcionalidad al menos en nuestras condiciones de trabajo. Se establece una diferencia de estos mutantes con respecto al simple mutante Val533Cys ya que si bien se observó expresión de esta proteína mutante, el resultado obtenido de la formación de sincicios no fue concluyente. Al parecer entonces en primer lugar la mutación Val533Met *per se* no genera cambios en la expresión o actividad de la proteína F. En segundo lugar según estos resultados la naturaleza del aminoácido que ocupa el residuo 533 podría influir en la actividad de la proteína. Es interesante destacar

que la región transmembrana de la proteína de fusión no posee cisteínas en la proteína F salvaje y por tanto la presencia de este residuo es probable que altere su funcionalidad.

Las variantes de la proteína F Asn268Ile y Asn268Ile/Val533Leu correspondientes al simple mutante (VRSH-C10) y al doble mutante (VRSH-E1), respectivamente presentaron altos niveles de expresión y reaccionaron con todos los AcMos ensayados. Este resultado fue inesperado dado que los virus mutantes que presentaron estas mutaciones no presentan reactividad con ninguno de los AcMos del sitio antigénico II, dado que al parecer la mutación 268 alteraría los epitopes en esta región. El hecho de que estas variantes presenten reactividad puede deberse al sistema de expresión utilizado, a un plegamiento diferente de la proteína nativa o a la ausencia de otras proteínas virales.

La acumulación de mutaciones reveló que la incorporación de tres residuos de metionina en lugar de valina no altera ni la expresión ni la formación de sincicios. Sin embargo para la variante de la proteína F con dos residuos de metionina (Val533/536Met) esto no logró determinarse. Esto podría implicar que la proteína no se expresa por causa de las mutaciones incorporadas o este resultado es producto de una transfección no exitosa. De todos modos este dominio TM es capaz de soportar tres cambios consecutivos y seguir siendo funcional.

La proteína mutante FTM- expresada bajo promotor eucariota presentó bajos niveles de expresión por causa del sistema de expresión elegido dado que para expresarla bajo promotor eucariota es indispensable el uso de una secuencia optimizada del gen de la proteína F para evitar problemas durante su transcripción en el núcleo.

8. PERSPECTIVAS

Virus mutantes

1- Para poder evaluar si la mutación transmembrana Val533Met podría ser también responsable de la resistencia o evidenciar su contribución a la evasión de la respuesta inmune, podría diseñarse un ensayo con virus recombinantes que presenten esta única mutación en la región transmembrana de modo de evaluar su resistencia frente al suero policlonal anti-F.

2- Dado que en algunos casos se utilizan anticuerpos policlonales como terapia de inmunidad pasiva contra el VRSH, una de las aproximaciones para investigar si ello podría contribuir a la selección de mutantes del VRSH *in vivo* sería seleccionar mutantes resistentes a este suero policlonal o a un suero policlonal anti-F por pasaje del virus en ratas algodóneras (modelos animales disponible para el VRSH).

3- Para evaluar si es posible encontrar las mutaciones seleccionadas en este trabajo en muestras clínicas podrían analizarse muestras provenientes de pacientes re infectados que hayan sido tratados con anticuerpos policlonales.

4- Para evaluar la estabilidad de las mutaciones presente en los virus purificados en nuestro trabajo, en primer lugar se realizaría una ronda o dos rondas más de purificación y luego se analizaría la estabilidad de dichas mutaciones *in vitro* mediante pasajes seriados en ausencia de anticuerpos: ensayos de competencia replicativa con la cepa salvaje y análisis de genomas virales. A su vez para analizar la estabilidad de dichas mutaciones *in vivo* se infectarían ratas alodóneras con estos virus purificados (con una o dos rondas más de purificación) y se las trataría con suero policlonal anti-F o el preparado de anticuerpos policlonales usado en el tratamiento.

Proteínas F recombinantes

1- En primer lugar es indispensable poner a punto un ensayo eficiente de determinación de la capacidad fusogénica, ya sea por conteo de núcleos con microscopio óptico luego de la tinción de células con colorantes no vitales para determinar el índice de fusión. El índice de fusión permitirá comparar las distintas variantes ensayadas, normalizadas con respecto a la proteína F salvaje que será la referencia. A su vez se podría medir actividad fusogénica por acción de la luciferasa ya que existen plásmidos conteniendo el gen de la luciferasa bajo promotor inducible y sólo si existe fusión entre células con este plásmido junto con las que son transfectadas con un plásmido conteniendo el factor de inducción es que es posible medir luminiscencia.

2- Sería de sumo interés, aprovechando el mutante generado Val533Cys, realizar estudios de entrecruzamiento ("cross-linking") oxidativo para evaluar mediante la formación de puentes disulfuro entre los dominios TM monoméricos si los mismos pueden interactuar entre sí (formando una estructura helicoidal) o si por el contrario se posicionan en la membrana como las "patas" separadas de un trípode. De interactuar entre sí, estas regiones TM serían capaces de formar puentes disulfuro debido a la corta distancia que habría entre ellos: el uso de este enfoque ha sido valioso en otro modelo viral (PIV5)^[148].

3- Dado que los estudios de análisis de mutaciones puntuales en la región TM en este trabajo sólo se realizaron mediante expresión de proteínas recombinantes, sería de suma importancia evaluar el efecto de las mismas mutaciones en el marco de una infección viral, esto es, utilizando virus recombinantes.

4- Optimizar el gen que codifica para la proteína F completo y TM- para su expresión bajo promotor eucariota lo cual permitirá realizar estudios de expresión en distintas líneas celulares.

8. REFERENCIAS

1. P. L. Collins, R. Chanock y B. R. Murphy, *Respiratory syncytial virus*. En: *Fields Virology* (eds D. M. Knipe y P. M. Howley), pp. 1443-1485. 4ta ed. Fields Virology. 2001, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 1443-1485.
2. P. S. Gardner, *Respiratory syncytial virus infections*. *Postgrad Med J*, 1973. **49**: p. 788-791.
3. Prince GA Murphy BR, Collins PL, et al., *Current approaches to the development of vaccines effective against parainfluenza and respiratory syncytial viruses*. *Virus Res*, 1988. **11**: p. 1-15.
4. Kim HW Parrott RH, Arrobio JO, et al., *Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, DC. II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex*. *Am J Epidemiol*, 1973. **98**: p. 289-300.
5. P. A. Cane, *Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus*. *Rev Med Virol*, 2001. **11**(2): p. 103-16.
6. P. L. Collins, K. McIntosh y B. R. Chanock, *Respiratory syncytial virus, p. 1313-1351*. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*. 3rd ed. Vol. 1. 1996, Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven.
7. Alexander JP Han LL, Anderson LJ., *Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: An assessment of disease burden*. *J Infect Dis*, 1999. **179**: p. 25-30.
8. Englund, *Prophylaxis and therapy of RSV and other community respiratory virus infections in immunocompromised hosts*. *Cancer Res Ther Control*, 1999. **9**: p. 141-145.
9. Dowell SF. Murry AR, *Respiratory syncytial virus: Not just for kids*. *Hosp Pract*, 1997. **32**: p. 87-88,91-84, 98 passim.
10. Hertz MI. Wendt CH, *Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus infections in the immunocompromised host*. *Semin Respir Infect*, 1995. **10**: p. 224-231.
11. R. C. Welliver, *RSV and chronic asthma*. *Lancet*, 1995. **346**(8978): p. 789-90.
12. P. J. Openshaw, G. S. Dean y F. J. Culley, *Links between respiratory syncytial virus bronchiolitis and childhood asthma: clinical and research approaches*. *Pediatr Infect Dis J*, 2003. **22**(2 Suppl): p. S58-64; discussion S64-5.
13. L. J. Anderson, J. C. Hierholzer, C. Tsou, R. M. Hendry, y cols, *Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies*. *J Infect Dis*, 1985. **151**(4): p. 626-33.
14. M. A. Mufson, C. Orvell, B. Rafnar y E. Norrby, *Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus*. *J Gen Virol*, 1985. **66 (Pt 10)**: p. 2111-24.
15. H. B. Gimenez, P. Cash y W. T. Melson, *Monoclonal antibodies to human respiratory syncytial virus and their use in comparison of different virus isolates*. *J Gen Virol*, 1984. **65**: p. 963-971.
16. E. Norrby, M. A. Mufson y H. Sheshberadaran, *Structural differences between subtype A and B strains of respiratory syncytial virus*. *J Gen Virol*, 1986. **67 (Pt 12)**: p. 2721-9.
17. C. Orvell, E. Norrby y M. A. Mufson, *Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against five structural components of human respiratory syncytial virus subgroup B*. *J Gen Virol*, 1987. **68 (Pt 12)**: p. 3125-35.
18. B. Garcia-Barreno, C. Palomo, C. Penas, T. Delgado, y cols, *Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins*. *J Virol*, 1989. **63**(2): p. 925-32.
19. O. Garcia, M. Martin, J. Dopazo, J. Arbiza, y cols, *Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenic changes in the G glycoprotein*. *J Virol*, 1994. **68**(9): p. 5448-59.
20. P. A. Cane y C. R. Pringle, *Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus: rapid identification of subgroup A lineages*. *J Virol Methods*, 1992. **40**(3): p. 297-306.
21. J. A. Melero, B. Garcia-Barreno, I. Martinez, C. R. Pringle, y cols, *Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein*. *J Gen Virol*, 1997. **78 (Pt 10)**: p. 2411-8.
22. I. Martinez, O. Valdes, A. Delfraro, J. Arbiza, y cols, *Evolutionary pattern of the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses from antigenic group B: the use of alternative termination codons and lineage diversification*. *J Gen Virol*, 1999. **80 (Pt 1)**: p. 125-30.
23. W. M. Sullender, *Respiratory syncytial virus genetic and antigenic diversity*. *Clin Microbiol Rev*, 2000. **13**(1): p. 1-15, table of contents.
24. T. C. Peret, C. B. Hall, K. C. Schnabel, J. A. Golub, y cols, *Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community*. *J Gen Virol*, 1998. **79 (Pt 9)**: p. 2221-9.
25. C. B. Hall, E. E. Walsh, K. C. Schnabel, C. E. Long, y cols, *Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children*. *J Infect Dis*, 1990. **162**: p. 1283-90.
26. J. Arbiza, A. Delfraro y S. Frabasile, *Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001--a review*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005. **100**(3): p. 221-30.
27. H. W. Kim, J. G. Canchola, C. D. Brandt, G. Pyles, y cols, *Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine*. *Am J Epidemiol*, 1969. **89**(4): p. 422-34.
28. A. Z. Kapikian, R. H. Mitchell, R. M. Chanock, R. A. Shvedoff, y cols, *An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine*. *Am J Epidemiol*, 1969. **89**(4): p. 405-21.

29. V. A. Fulginiti, J. J. Eller, O. F. Sieber, J. W. Joyner, y cols, *Respiratory virus immunization. I. A field trial of two inactivated respiratory virus vaccines; an aqueous trivalent parainfluenza virus vaccine and an alum-precipitated respiratory syncytial virus vaccine*. Am J Epidemiol, 1969. **89**(4): p. 435-48.
30. X. Saez-Llorens, E. Castano, D. Null, J. Steichen, y cols, *Safety and pharmacokinetics of an intramuscular humanized monoclonal antibody to respiratory syncytial virus in premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia. The MEDI-493 Study Group*. Pediatr Infect Dis J, 1998. **17**(9): p. 787-91.
31. B. S. Carter, *Palivizumab (synagis): counting "costs" and values*. Pediatrics, 2000. **106**(5): p. 1168-9.
32. S. Cardenas, A. Auais yG. Piedimonte, *Palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus infection*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2005. **3**(5): p. 719-26.
33. B. K. Thakur, L. R. Wu yJ. F. Schaeufele, *RSV-IGIV therapy: a cost/benefit analysis*. Pediatrics, 1997. **100**(3 Pt 1): p. 417-8.
34. *Respiratory syncytial virus immune globulin intravenous: indications for use. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases, Committee on Fetus and Newborn*. Pediatrics, 1997. **99**(4): p. 645-50.
35. *Reduction of respiratory syncytial virus hospitalization among premature infants and infants with bronchopulmonary dysplasia using respiratory syncytial virus immune globulin prophylaxis. The PREVENT Study Group*. Pediatrics, 1997. **99**(1): p. 93-9.
36. *Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The IMpact-RSV Study Group*. Pediatrics, 1998. **102**(3 Pt 1): p. 531-7.
37. L. L. Barton, K. L. Grant yR. J. Lemen, *Respiratory syncytial virus immune globulin: decisions and costs*. Pediatr Pulmonol, 2001. **32**(1): p. 20-8.
38. S. Johnson, C. Oliver, G. A. Prince, V. G. Hemming, y cols, *Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus*. J Infect Dis, 1997. **176**(5): p. 1215-24.
39. M. Boeckh, M. M. Berrey, R. A. Bowden, S. W. Crawford, y cols, *Phase 1 evaluation of the respiratory syncytial virus-specific monoclonal antibody palivizumab in recipients of hematopoietic stem cell transplants*. J Infect Dis, 2001. **184**(3): p. 350-4.
40. A. Mejias, S. Chavez-Bueno, M. B. Raynor, J. Connolly, y cols, *Motavizumab, a neutralizing anti-Respiratory Syncytial Virus (Rsv) monoclonal antibody significantly modifies the local and systemic cytokine responses induced by Rsv in the mouse model*. Virol J, 2007. **4**: p. 109.
41. H. Wu, D. S. Pfarr, S. Johnson, Y. A. Brewah, y cols, *Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract*. J Mol Biol, 2007. **368**(3): p. 652-65.
42. H. Wu, D. S. Pfarr, Y. Tang, L. L. An, y cols, *Ultra-potent antibodies against respiratory syncytial virus: effects of binding kinetics and binding valence on viral neutralization*. J Mol Biol, 2005. **350**(1): p. 126-44.
43. A. Mejias, S. Chavez-Bueno, A. M. Rios, M. F. Aten, y cols, *Comparative effects of two neutralizing anti-respiratory syncytial virus (RSV) monoclonal antibodies in the RSV murine model: time versus potency*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(11): p. 4700-7.
44. A. S. Yunus, T. P. Jackson, K. Crisafi, I. Burimski, y cols, *Elevated temperature triggers human respiratory syncytial virus F protein six-helix bundle formation*. Virology. **396**(2): p. 226-37.
45. R. W. Sidwell yD. L. Barnard, *Respiratory syncytial virus infections: recent prospects for control*. Antiviral Res, 2006. **71**(2-3): p. 379-90.
46. R. W. Sidwell, R. K. Robins yl. W. Hillyard, *Ribavirin: an antiviral agent*. Pharmacol Ther, 1979. **6**(1): p. 123-46.
47. J. T. McBride yK. M. McConnochie, *RSV, recurrent wheezing, and ribavirin*. Pediatr Pulmonol, 1998. **25**(3): p. 145-6.
48. A. G. Randolph yE. E. Wang, *Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract*. Cochrane Database Syst Rev, 2000(2): p. CD000181.
49. R. C. Welliver, *Respiratory syncytial virus infection: therapy and prevention*. Paediatr Respir Rev, 2004. **5 Suppl A**: p. S127-33.
50. M. Zamorski, *Ribavirin for RSV lower respiratory tract infection*. J Fam Pract, 1996. **43**(6): p. 536-7.
51. O. Ramilo, *Evolution of prophylaxis: MoAb, siRNA, vaccine, and small molecules*. Paediatr Respir Rev, 2009. **10 Suppl 1**: p. 23-5.
52. K. Vig, N. Lewis, E. G. Moore, S. Pillai, y cols, *Secondary RNA structure and its role in RNA interference to silence the respiratory syncytial virus fusion protein gene*. Mol Biotechnol, 2009. **43**(3): p. 200-11.
53. R. A. Dudas yR. A. Karron, *Respiratory syncytial virus vaccines*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**: p. 430-439.
54. H. Wu, V. A. Dennis, S. R. Pillai yS. R. Singh, *RSV fusion (F) protein DNA vaccine provides partial protection against viral infection*. Virus Res, 2009. **145**(1): p. 39-47.
55. R. Kohlmann, S. Schwannecke, B. Tippler, N. Ternette, y cols, *Protective efficacy and immunogenicity of an adenoviral vector vaccine encoding the codon-optimized F protein of respiratory syncytial virus*. J Virol, 2009. **83**(23): p. 12601-10.
56. S. Nallet, M. Amacker, N. Westerfeld, L. Baldi, y cols, *Respiratory syncytial virus subunit vaccine based on a recombinant fusion protein expressed transiently in mammalian cells*. Vaccine, 2009. **27**(46): p. 6415-9.
57. C. Luongo, L. Yang, C. C. Winter, K. M. Spann, y cols, *Codon stabilization analysis of the "248" temperature sensitive mutation for increased phenotypic stability of respiratory syncytial virus vaccine candidates*. Vaccine, 2009. **27**(41): p. 5667-76.
58. L. Kuo, H. Grosfeld, J. Cristina, M. G. Hill, y cols, *Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus*. J Virol, 1996. **70**(10): p. 6892-901.
59. L. Kuo, R. Fearn yP. L. Collins, *The structurally diverse intergenic regions of respiratory syncytial virus do not modulate sequential transcription by a dicistronic minigenome*. J Virol, 1996. **70**(9): p. 6143-50.

60. R. W. Hardy yG. W. Wertz, *The product of the respiratory syncytial virus M2 gene ORF1 enhances readthrough of intergenic junctions during viral transcription.* J Virol, 1998. **72**(1): p. 520-6.
61. C. Kreml, B. R. Murphy yP. L. Collins, *Recombinant respiratory syncytial virus with the G and F genes shifted to the promoter-proximal positions.* J Virol, 2002. **76**(23): p. 11931-42.
62. X. Cheng, H. Park, H. Zhou yH. Jin, *Overexpression of the M2-2 protein of respiratory syncytial virus inhibits viral replication.* J Virol, 2005. **79**(22): p. 13943-52.
63. Peter L. Collins yJames E. Crowe Jr, *Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus .Title: Fields Virology, 5th Edition.*Editors: Knipe, David M.; Howley, Peter M. 2007: p. 1601-1646.
64. R. A. Lamb yD. Kolakofsky, *Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In Fields Virology, Fourth Edition, B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley.* 2001.
65. J. Schlender, B. Bossert, U. Buchholz yK. K. Conzelmann, *Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response.* J Virol, 2000. **74**(18): p. 8234-42.
66. P. R. Johnson, Jr., R. A. Olmsted, G. A. Prince, B. R. Murphy, y cols, *Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity.* J Virol, 1987. **61**(10): p. 3163-6.
67. R. A. Olmsted, N. Elango, G. A. Prince, B. R. Murphy, y cols, *Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(19): p. 7462-6.
68. G. W. Wertz, E. J. Stott, K. K. Young, K. Anderson, y cols, *Expression of the fusion protein of human respiratory syncytial virus from recombinant vaccinia virus vectors and protection of vaccinated mice.* J Virol, 1987. **61**(2): p. 293-301.
69. N. Elango, G. A. Prince, B. R. Murphy, S. Venkatesan, y cols, *Resistance to human respiratory syncytial virus (RSV) infection induced by immunization of cotton rats with a recombinant vaccinia virus expressing the RSV G glycoprotein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**: p. 1906-1910.
70. E. E. Walsh, M. W. Brandriss yJ. J. Schlesinger, *Immunological differences between the envelope glycoproteins of two strains of human respiratory syncytial virus.* J Gen Virol, 1987. **68**: p. 2169-2176.
71. E. C. Smith, A. Popa, A. Chang, C. Masante, y cols, *Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry.* Febs J, 2009. **276**(24): p. 7217-27.
72. E. Escribano-Romero, J. Rawling, B. Garcia-Barreno yJ. A. Melero, *The soluble form of human respiratory syncytial virus attachment protein differs from the membrane-bound form in its oligomeric state but is still capable of binding to cell surface proteoglycans.* J Virol, 2004. **78**(7): p. 3524-32.
73. R. A. Karron, D. A. Buonagurio, A. F. Georgiu, S. S. Whitehead, y cols, *Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13961-6.
74. A. Karger, U. Schmidt yU. J. Buchholz, *Recombinant bovine respiratory syncytial virus with deletions of the G or SH genes: G and F proteins bind heparin.* J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 3): p. 631-40.
75. S. Techaarpornkul, N. Barretto yM. E. Peebles, *Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene.* J Virol, 2001. **75**(15): p. 6825-34.
76. S. A. Feldman, S. Audet yJ. A. Beeler, *The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus facilitates virus attachment and infectivity via an interaction with cellular heparan sulfate.* J Virol, 2000. **74**(14): p. 6442-7.
77. S. Techaarpornkul, P. L. Collins yM. E. Peebles, *Respiratory syncytial virus with the fusion protein as its only viral glycoprotein is less dependent on cellular glycosaminoglycans for attachment than complete virus.* Virology, 2002. **294**(2): p. 296-304.
78. G. Cseke, M. S. Maginnis, R. G. Cox, S. J. Tollefson, y cols, *Integrin alphavbeta1 promotes infection by human metapneumovirus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(5): p. 1566-71.
79. L. H. McCurdy yB. S. Graham, *Role of plasma membrane lipid microdomains in respiratory syncytial virus filament formation.* J Virol, 2003. **77**(3): p. 1747-56.
80. T. P. McDonald, A. R. Pitt, G. Brown, H. W. Rixon, y cols, *Evidence that the respiratory syncytial virus polymerase complex associates with lipid rafts in virus-infected cells: a proteomic analysis.* Virology, 2004. **330**(1): p. 147-57.
81. T. Bachi, *Direct observation of the budding and fusion of an enveloped virus by video microscopy of viable cells.* J Cell Biol, 1988. **107**(5): p. 1689-95.
82. G. Brown, H. W. Rixon, J. Steel, T. P. McDonald, y cols, *Evidence for an association between heat shock protein 70 and the respiratory syncytial virus polymerase complex within lipid-raft membranes during virus infection.* Virology, 2005. **338**(1): p. 69-80.
83. E. Burke, N. M. Mahoney, S. C. Almo yS. Barik, *Profilin is required for optimal actin-dependent transcription of respiratory syncytial virus genome RNA.* J Virol, 2000. **74**(2): p. 669-75.
84. E. Burke, L. Dupuy, C. Wall yS. Barik, *Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus.* Virology, 1998. **252**(1): p. 137-48.
85. N. L. Kallewaard, A. L. Bowen yJ. E. Crowe, Jr., *Cooperativity of actin and microtubule elements during replication of respiratory syncytial virus.* Virology, 2005. **331**(1): p. 73-81.
86. A. Scheid yP. W. Choppin, *Two disulfide-linked polypeptide chains constitute the active F protein of paramyxoviruses.* Virology, 1977. **80**(1): p. 54-66.
87. E. E. Walsh yJ. Hruska, *Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein.* J Virol, 1983. **47**(1): p. 171-7.
88. R. M. Chanock, B. Roizman yR. Myers, *Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent. I. Isolation, properties and characterization.* Am J Hyg, 1957. **66**: p. 281-290.

89. C. Gruber yS. Levine, *Respiratory syncytial virus polypeptides. III. The envelope-associated proteins*. J Gen Virol, 1983. **64 (Pt 4)**: p. 825-32.
90. P. L. Collins yG. Mottet, *Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus*. J Gen Virol, 1991. **72 (Pt 12)**: p. 3095-101.
91. G. Zimmer, I. Trotz yG. Herrler, *N-glycans of F protein differentially affect fusion activity of human respiratory syncytial virus*. J Virol, 2001. **75(10)**: p. 4744-51.
92. N. D. Day, P. J. Branigan, C. Liu, L. L. Gutshall, y cols, *Contribution of cysteine residues in the extracellular domain of the F protein of human respiratory syncytial virus to its function*. Virol J, 2006. **3**: p. 34.
93. M. B. Ruiz-Arguello, D. Martin, S. A. Wharton, L. J. Calder, y cols, *Thermostability of the human respiratory syncytial virus fusion protein before and after activation: implications for the membrane-fusion mechanism*. J Gen Virol, 2004. **85(Pt 12)**: p. 3677-87.
94. L. Gonzalez-Reyes, M. B. Ruiz-Arguello, B. Garcia-Barreno, L. Calder, y cols, *Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98(17)**: p. 9859-64.
95. G. Zimmer, L. Budz yG. Herrler, *Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences*. J Biol Chem, 2001. **276**: p. 31642-31650.
96. D. Martin, L. J. Calder, B. Garcia-Barreno, J. J. Skehel, y cols, *Sequence elements of the fusion peptide of human respiratory syncytial virus fusion protein required for activity*. J Gen Virol, 2006. **87(Pt 6)**: p. 1649-58.
97. M. B. Ruiz-Argüello, D. Martín, S. A. Wharton, L. J. Calder, y cols, *Thermostability of the human respiratory syncytial virus fusion protein before and after activation: implications for the membrane-fusion mechanism*. J Gen Virol, 2004. **85**: p. 3677-3687.
98. P. Chambers, C.R. Pringle yA. J. Easton, *Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins*. J Gen Virol, 1990. **71**: p. 3075-3080.
99. P. Chambers, C. R. Pringle yA. J. Easton, *Sequence analysis of the gene encoding the fusion glycoprotein of pneumonia virus of mice suggests possible conserved secondary structure elements in paramyxovirus fusion glycoproteins*. J Gen Virol, 1992. **73**: p. 1717-1724.
100. M. Singh, B. Berger yP. S. Kim, *LearnCoil-VMF: computational evidence for coiled-coil-like motifs in many viral membrane-fusion proteins*. J Mol Biol, 1999. **290**: p. 1031-41.
101. R. Buckland yF. Wild, *Leucine zipper motif extends*. Nature, 1989. **338(6216)**: p. 547.
102. X. Zhao, M. Singh, V. N. Malashkevich yP. S. Kim, *Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97(26)**: p. 14172-7.
103. B. R. Lentz, V. Malinin, M. E. Haque yK. Evans, *Protein machines and lipid assemblies: current views of cell membrane fusion*. Curr Opin Struct Biol, 2000. **10**: p. 607-615.
104. C. J. Morton, R. Cameron, L. J. Lawrence, B. Lin, y cols, *Structural characterization of respiratory syncytial virus fusion inhibitor escape mutants: homology model of the F protein and a syncytium formation assay*. Virology, 2003. **311(2)**: p. 275-88.
105. D. M. Lambert, S. Barney, A. L. Lambert, K. Guthrie, y cols, *Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93(5)**: p. 2186-91.
106. R. E. Dutch, T. S. Jardetzky yR. A. Lamb, *Virus membrane fusion proteins: biological machines that undergo a metamorphosis*. Biosci Rep, 2000. **20(6)**: p. 597-612.
107. L. J. Calder, L. Gonzalez-Reyes, B. Garcia-Barreno, S. A. Wharton, y cols, *Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies*. Virology, 2000. **271(1)**: p. 122-31.
108. J. M. Matthews, T. F. Young, S. P. Tucker yJ. P. Mackay, *The core of the respiratory syncytial virus fusion protein is a trimeric coiled coil*. J Virol, 2000. **74(13)**: p. 5911-20.
109. L. Chen, P. M. Colman, L. J. Cosgrove, M. C. Lawrence, y cols, *Cloning, expression, and crystallization of the fusion protein of Newcastle disease virus*. Virology, 2001. **290(2)**: p. 290-9.
110. L. Chen, J. J. Gorman, J. McKimm-Breschkin, L. J. Lawrence, y cols, *The structure of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus suggests a novel paradigm for the molecular mechanism of membrane fusion*. Structure (Camb), 2001. **9(3)**: p. 255-66.
111. B. J. Smith, M. C. Lawrence yP. M. Colman, *Modelling the structure of the fusion protein from human respiratory syncytial virus*. Protein Eng, 2002. **15**: p. 365-371.
112. L. Chen, J. J. Gorman, J. McKimm-Breschkin, L. J. Lawrence, y cols, *The structure of the fusion glycoprotein of newcastle disease virus suggests a novel paradigm for the molecular mechanism of membrane fusion*. Structure, 2001. **9**: p. 255-266.
113. H. S. Yin, R. G. Paterson, X. Wen, R. A. Lamb, y cols, *Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102(26)**: p. 9288-93.
114. H. S. Yin, X. Wen, R. G. Paterson, R. A. Lamb, y cols, *Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation*. Nature, 2006. **439(7072)**: p. 38-44.
115. R. A. Lamb yT. S. Jardetzky, *Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F*. Curr Opin Struct Biol, 2007. **17(4)**: p. 427-36.
116. P. A. Bullough, F. M. Hughson, A. C. Trehanne, R. W. Ruigrok, y cols, *Crystals of a fragment of influenza haemagglutinin in the low pH induced conformation*. J Mol Biol, 1994. **236(4)**: p. 1262-5.
117. M. Singh, B. Berger yP. S. Kim, *LearnCoil-VMF: computational evidence for coiled-coil-like motifs in many viral membrane-fusion proteins*. J Mol Biol, 1999. **290**: p. 1031-1041.
118. J. Chen, J. J. Skehel yD. C. Wiley, *N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA(2) subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**: p. 8967-8972.

152. S. C. Brock, J. M. Heck, P. A. McGraw y J. E. Crowe, Jr., *The transmembrane domain of the respiratory syncytial virus F protein is an orientation-independent apical plasma membrane sorting sequence*. J Virol, 2005. **79**(19): p. 12528-35.
153. E. Domingo, C. Escarmís, L. Menéndez-Arias y J. J. Holland, *Viral quasispecies and fitness variations*. En: *Origin and evolution of viruses* (eds Domingo, E., Webster, R. y Holland, J. J.), pp. 141-161. 1999: Academic Press.
154. M. Eigen y Schuster, *The hypercycle. A principle of natural self-organization*. 1979, Berlin: Springer-Verlag.
155. M. Eigen y C. Biebricher, *Sequence space and quasispecies distribution*. En: *RNA Genetics*, vol.3 (eds Domingo, E., Holland, J. J. y Ahlquist, P.), pp. 211-245. 1988, FL: CRC Press, Boca Ratón.
156. I. S. Novella, D. L. Gilbertson, B. Borrego, E. Domingo, y cols, *Adaptability costs in immune escape variants of vesicular stomatitis virus*. Virus Res, 2005. **107**: p. 27-34.
157. L. J. Anderson, P. Bingham y J. C. Heirholzer, *Neutralization of respiratory syncytial virus by individual and mixtures of F and G protein monoclonal antibodies*. J Virol, 1988. **62**(4235-4238).
158. J. A. Beeler y K. van Wyke Coelingh, *Neutralization epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus: effect of mutation upon fusion function*. J Virol, 1989. **63**(7): p. 2941-50.
159. J. Arbiza, G. Taylor, J. A. Lopez, J. Furze, y cols, *Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus*. J Gen Virol, 1992. **73** (Pt 9): p. 2225-34.
160. J. A. Lopez, D. Andreu, C. Carreno, P. Whyte, y cols, *Conformational constraints of conserved neutralizing epitopes from a major antigenic area of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein*. J Gen Virol, 1993. **74** (Pt 12): p. 2567-77.
161. J. A. Lopez, R. Bustos, C. Orvell, M. Berois, y cols, *Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6922-6928.
162. C. Candia, *Selección y caracterización de mutantes del Virus Respiratorio Sincicial resistentes a la neutralización por un suero policlonal contra la glicoproteína F*, in *Sección Virología*. 2003, Facultad de Ciencias, Universidad de la República: Montevideo, Uruguay. p. 70.
163. J. A. Lopez, C. Penas, B. Garcia-Barreno, J. A. Melero, y cols, *Location of a highly conserved neutralizing epitope in the F glycoprotein of human respiratory syncytial virus*. J Virol, 1990. **64**(2): p. 927-930.
164. J. A. Lopez, D. Andreu, C. Carreno, P. Whyte, y cols, *Conformational constraints of conserved neutralizing epitopes from a major antigenic area of human respiratory syncytial virus fusion protein*. J Gen Virol, 1996. **77**: p. 649-660.
165. J. A. Lopez, C. Penas, B. Garcia-Barreno, J. A. Melero, y cols, *Location of a highly conserved neutralizing epitope in the F glycoprotein of human respiratory syncytial virus*. J Virol, 1990. **64**(2): p. 927-30.
166. J. A. Lopez, R. Bustos, C. Orvell, M. Berois, y cols, *Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6922-8.
167. S. J. Wu, A. Schmidt, E. J. Beil, N. D. Day, y cols, *Characterization of the epitope for anti-human respiratory syncytial virus F protein monoclonal antibody 101F using synthetic peptides and genetic approaches*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 10): p. 2719-23.
168. G. Taylor, E. J. Stott, J. Furze, J. Ford, y cols, *Protective epitopes on the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine monoclonal antibodies*. J Gen Virol, 1992. **73** (Pt 9): p. 2217-23.
169. L. J. Anderson, J. C. Hierholzer, Y. O. Stone, C. Tsou, y cols, *Identification of epitopes on respiratory syncytial virus proteins by competitive binding immunoassay*. J Clin Microbiol, 1986. **23**(3): p. 475-80.
170. C. Bourgeois, C. Corvaisier, J. B. Bour, E. Kohli, y cols, *Use of synthetic peptides to locate neutralizing antigenic domains on the fusion protein of respiratory syncytial virus*. J Gen Virol, 1991. **72** (Pt 5): p. 1051-8.
171. J. E. Crowe, C. Y. Firestone, R. Crim, J. A. Beeler, y cols, *Monoclonal antibody-resistant mutants selected with a respiratory syncytial virus-neutralizing human antibody fab fragment (Fab 19) define a unique epitope on the fusion (F) glycoprotein*. Virology, 1998. **252**(2): p. 373-5.
172. J. P. Langedijk, R. H. Melen y J. T. van Oirschot, *Identification of a conserved neutralization site in the first heptad repeat of the fusion protein of respiratory syncytial virus*. Arch Virol, 1998. **143**(2): p. 313-20.
173. G. R. Lounsbach, C. Bourgeois, W. H. West, J. W. Robinson, y cols, *Binding of neutralizing monoclonal antibodies to regions of the fusion protein of respiratory syncytial virus expressed in Escherichia coli*. J Gen Virol, 1993. **74**: p. 2559-2565.
174. A. Martin-Gallardo, K. A. Fien, B. T. Hu, J. F. Farley, y cols, *Expression of the F glycoprotein gene from human respiratory syncytial virus in Escherichia coli: mapping of a fusion inhibiting epitope*. Virology, 1991. **184**(1): p. 428-32.
175. G. E. Scopes, P. J. Watt y P. R. Lambden, *Identification of a linear epitope on the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus*. J Gen Virol, 1990. **71** (Pt 1): p. 53-9.
176. M. Trudel, F. Nadon, C. Seguin, G. Dionne, y cols, *Identification of a synthetic peptide as part of a major neutralization epitope of respiratory syncytial virus*. J Gen Virol, 1987. **68** (Pt 9): p. 2273-2280.
177. W. H. West, G. R. Lounsbach, C. Bourgeois, J. W. Robinson, y cols, *Biological activity, binding site and affinity of monoclonal antibodies to the fusion protein of respiratory syncytial virus*. J Gen Virol, 1994. **75**: p. 2813-2819.
178. X. Zhao y W. M. Sullender, *In vivo selection of respiratory syncytial viruses resistant to palivizumab*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 3962-8.
179. X. Zhao, F. P. Chen y W. M. Sullender, *Respiratory syncytial virus escape mutant derived in vitro resists palivizumab prophylaxis in cotton rats*. Virology, 2004. **318**(2): p. 608-12.
180. X. Zhao, F. P. Chen, A. G. Megaw y W. M. Sullender, *Variable resistance to palivizumab in cotton rats by respiratory syncytial virus mutants*. J Infect Dis, 2004. **190**(11): p. 1941-6.
181. E. E. Walsh, P. J. Cote, B. F. Fernie, J. J. Schlesinger, y cols, *Analysis of the respiratory syncytial virus fusion protein using monoclonal and polyclonal antibodies*. J Gen Virol, 1986. **67** (Pt 3): p. 505-13.
182. H. E. Kennedy, B. V. Jones, E. M. Tucker, N. J. Ford, y cols, *Production and characterization of bovine monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus*. J Gen Virol, 1988. **69** (Pt 12): p. 3023-3032.

183. G. Taylor, E. J. Stott, M. Bew, B. F. Fernie, y cols, *Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus infection in mice*. Immunology, 1984. **52**(1): p. 137-42.
184. M. Trudel, F. Nadon, C. Seguin, P. Payment, y cols, *Respiratory syncytial virus fusion glycoprotein: further characterization of a major epitope involved in virus neutralization*. Can J Microbiol, 1987. **33**(10): p. 933-8.
185. M. Trudel, F. Nadon, C. Seguin, G. Dionne, y cols, *Identification of a synthetic peptide as part of a major neutralization epitope of respiratory syncytial virus*. J Gen Virol, 1987. **68** (Pt 9): p. 2273-80.
186. C. Palomo, J. P. Albar, B. Garcia-Barreno yJ. A. Melero, *Induction of a neutralizing immune response to human respiratory syncytial virus with anti-idiotypic antibodies*. J Virol, 1990. **64**(9): p. 4199-206.
187. B. Garcia-Barreno, A. Portela, T. Delgado, J. A. Lopez, y cols, *Frame shift mutations as a novel mechanism for the generation of neutralization resistant mutants of human respiratory syncytial virus*. Embo J, 1990. **9**: p. 4181-4187.
188. F. E. Moura, A. Blanc, S. Frabasile, A. Delfraro, y cols, *Genetic diversity of respiratory syncytial virus isolated during an epidemic period from children of northeastern Brazil*. J Med Virol, 2004. **74**(1): p. 156-60.
189. L. Tomé, *Caracterización de un mutante del Virus Respiratorio Sincicial Humano resistente a un suero policlonal contra la glicoproteína de fusión*, in *Sección Virología*. 2005, Universidad de la República: Montevideo. p. 43.
190. W. M. Sullender yK. G. Edwards, *Mutations of respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G associated with resistance to neutralization by primate polyclonal antibodies*. Virology, 1999. **264**(1): p. 230-6.
191. M. S. Reitz, C. Wilson, C. Naugle, R. C. Gallo, y cols, *Generation of a neutralization-resistant variant of HIV-1 is due to selection for a point mutation in the envelope gene*. Cell, 1988. **54**: p. 57-63.
192. M. D. Muhlebach, V. H. Leonard yR. Cattaneo, *The measles virus fusion protein transmembrane region modulates availability of an active glycoprotein complex and fusion efficiency*. J Virol, 2008. **82**(22): p. 11437-45.
193. S. Seth, A. L. Goodman yR. W. Compans, *Mutations in multiple domains activate paramyxovirus F protein-induced fusion*. J Virol, 2004. **78**(16): p. 8513-23.
194. U. J. Buchholz, S. Finke yK. K. Conzelmann, *Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter*. J Virol, 1999. **73**(1): p. 251-9.
195. J. L. McKimm-Breschkin, *A simplified plaque assay for respiratory syncytial virus—direct visualization of plaques without immunostaining*. J. Virol. Meth., 2004. **120**: p. 113-117.
196. I. Martinez, J. Dopazo yJ.A. Melero, *Antigenic structure of the human respiratory syncytial virus G glycoprotein and relevance of hypermutation events for the generation of antigenic variants*. J Gen Virol, 1997. **78**: p. 2419–2429.
197. B. Moss, O. Elroy-Stein, T. Mizukami, W. A. Alexander, y cols, *Product review. New mammalian expression vectors*. Nature, 1990. **348**(6296): p. 91-2.
198. A. Bukreyev, S. S. Whitehead, B. R. Murphy yP. L. Collins, *Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse*. J Virol, 1997. **71**(12): p. 8973-82.
199. U. F. Power, H. Plotnicky-Gilquin, T. Huss, A. Robert, y cols, *Induction of protective immunity in rodents by vaccination with a prokaryotically expressed recombinant fusion protein containing a respiratory syncytial virus G protein fragment*. Virology, 1997. **230**(2): p. 155-66.
200. S. A. Feldman, R. L. Crim, S. A. Audet yJ. A. Beeler, *Human respiratory syncytial virus surface glycoproteins F, G and SH form an oligomeric complex*. Arch Virol, 2001. **146**(12): p. 2369-83.
201. G. Parra, *Estabilidad de las mutaciones de mutantes del Virus Respiratorio Sincicial que escapan a la neutralización de anticuerpos monoclonales anti-F*, in *Sección Virología*. 2005, Facultad de Ciencias, Universidad de la República: Montevideo, Uruguay. p. 58.
202. T. L. Stern, M. Reitz yM. Robert-Guroff, *Spontaneous reversion of Human Immunodeficiency Virus type-1 neutralization-resistant variant HXB2thr582: in vitro selection against cytopathicity highlights gp120-gp41 interactive regions*. J Virol, 1995. **69**: p. 1860-1867.
203. J. L. McKimm-Breschkin, *A simplified plaque assay for respiratory syncytial virus--direct visualization of plaques without immunostaining*. J Virol Methods, 2004. **120**(1): p. 113-7.
204. C. Palomo, B. Garcia-Barreno, C. Penas yJ. A. Melero, *The G protein of human respiratory syncytial virus: significance of carbohydrate side-chains and the C-terminal end to its antigenicity*. J Gen Virol, 1991. **72** (Pt 3): p. 669-75.
205. R. Lambkin, L. McLain, S. E. Jones, S. L. Aldridge, y cols, *Neutralization escape mutants of type A influenza virus are readily selected by antisera from mice immunized with whole virus: A possible mechanism for antigenic drift*. J Gen Virol, 1994. **75**: p. 3493-3502.
206. W. G. Laver, G. M. Air, R. G. Webster yS. J. Smith-Gill, *Epitopes on protein antigens: Misconceptions and realities*. Cell, 1990. **61**: p. 553-556.
207. G. M. Air, W. G. Laver yR. G. Webster, *Mechanism of antigenic variation in an individual epitope on influenza virus N9 neuraminidase*. J Virol, 1990. **64**: p. 5797-5803.
208. J. W. Yewdell, A. Taylor, A. Yellen, A. Caton, y cols, *Mutations in or near the fusion peptide of the influenza virus hemagglutinin affect an antigenic site in the globular region*. J Virol, 1993. **67**(2): p. 933-42.
209. D. C. Diamond, B. A. Jameson, J. Bonin, M. Kohara, y cols, *Antigenic variation and resistance to neutralization in poliovirus type 1*. Science, 1985. **229**: p. 1090-1093.
210. P. J. Branigan, N. D. Day, C. Liu, L. L. Gutshall, y cols, *The cytoplasmic domain of the F protein of Human respiratory syncytial virus is not required for cell fusion*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 2): p. 395-8.
211. R. Marsh, A. Connor, E. Gias yG. L. Toms, *Increased susceptibility of human respiratory syncytial virus to neutralization by anti-fusion protein antibodies on adaptation to replication in cell culture*. J Med Virol, 2007. **79**(6): p. 829-37.
212. A. Mason, P. R. Young yS. P. Tucker, *Method of expression and agents identified thereby*. 2000: U.S. Patent 60/262, 767.

213. N. Ternette, D. Stefanou, S. Kuate, K. Uberla, y cols, *Expression of RNA virus proteins by RNA polymerase II dependent expression plasmids is hindered at multiple steps*. Virol J, 2007. **4**: p. 51.
214. C. Liu, N. D. Day, P. J. Branigan, L. L. Gutshall, y cols, *Relationship between the loss of neutralizing antibody binding and fusion activity of the F protein of human respiratory syncytial virus*. Virol J, 2007. **4**: p. 71.

9. ANEXOS

ANEXO 1: Selección y aislamiento de mutantes resistentes por pasajes sucesivos en presencia de suero policlonal contra la glicoproteína F

Brevemente la cepa de referencia Long, perteneciente al grupo A, se creció en cultivo de células HEp-2 semi-confluentes en presencia de un suero policlonal contra la proteína F (producido en conejo) durante 56 pases seriados. El suero policlonal anti-F se obtuvo mediante la inmunización de un conejo con la proteína F purificada del VRSh (cepa Long).

La selección de mutantes se realizó a partir de una concentración subneutralizante del suero policlonal anti-F. A medida que el virus lograba crecer en presencia de concentraciones mayores del suero policlonal anti-F se incrementó la concentración del mismo.

Se utilizó una dilución de 1/500 de suero policlonal anti-F como dilución de partida. Los pases se realizaron en placas de cultivo de 96 pocillos (M96) cada 96 horas. La neutralización se realizó enfrentando el virus con una dilución determinada de suero policlonal (1h, 37°C). Las células se infectaron luego con el producto de la neutralización y se incubaron 1h a 37°C. Posteriormente se agregó medio de infección (DMEM suplementado con SFB 2%) + suero policlonal anti-F (empleando la dilución utilizada durante la neutralización) y se incubó en estufa de CO₂ a 37°C durante 72 a 96 hs luego de los cuales se realizó un nuevo pasaje. A las 24 hs de realizada la infección se realizó un cambio de medio agregando medio de infección + suero policlonal anti-F (a la misma dilución que la utilizada durante la neutralización). A medida que el efecto citopático (ECP) fue evidente (formación de sincicios) se fue incrementando la concentración de anticuerpos policlonales presente durante las etapas de neutralización e infección. De este modo se realizaron 56 pases seriados del virus con diluciones del suero anti-F a partir de una dilución 1/500 hasta llegar a una dilución final de 1/50. Los virus que presentaron ECP en esta dilución de suero policlonal anti-F los virus se cosecharon y crecieron en presencia de 2% anti-F (previa neutralización) para su posterior almacenamiento en N₂ líquido.

Como controles del ensayo la cepa Long se propagó durante el mismo número de pases en presencia de suero normal de conejo (SNC) obtenido de conejos (cedido por el Instituto de Higiene) que no fueron inoculados con el VRSH o con proteínas del virus y en ausencia de anticuerpos -sin Acs, los cuales también fueron cosechados y almacenados (1,2).

ANEXO 2: Diseño de cebadores para mutagénesis dirigida

A continuación se describen las secuencias correspondientes a la proteína F del VRSH, nucleótidos 789 a 841 (región antigénica II, aa 259 al 276) y nucleótidos 1593 a 1627 (región transmembrana, aa 527 al 538). Las letras en rojo indican las variantes nucleotídicas y en amarillo se resaltan los sitios específicos donde se modificara el aminoácido 268 o 533. Los nombres de las secuencias corresponden a los aminoácidos 268 y 533 que figuran en negrita:

Aminoácido 268

Asparragina (salvaje)

5'- CA TTA ATC AAT GAT ATG CCT ATA ACA **AAT** GAT CAG AAA AAG TTA ATG TCC AAC-3'
3'- GT AAT TAG TTA CTA TAC GGA TAT TGT **TAA** CTA GTC TTT TTC AAT TAC AGG TTG-3'

Isoleucina (mutante)

5'- CA TTA ATC AAT GAT ATG CCT ATA ACA **ATT** GAT CAG AAA AAG TTA ATG TCC AAC-3'
3'- GT AAT TAG TTA CTA TAC GGA TAT TGT **TAA** CTA GTC TTT TTC AAT TAC AGG TTG-3'

Aminoácido 533

Valina (salvaje)

5'- TA ACT ACT ATA ATT ATA **GTG** ATT ATA GTA ATA TTG- 3'
3'- AT TGA TGA TAT TAA TAT **CAC** TAA TAT CAT TAT AAC- 5'

Metionina (mutante)

5'- TA ACT ACT ATA ATT ATA **ATG** ATT ATA GTA ATA TTG- 3'
3'- AT TGA TGA TAT TAA TAT **TAC** TAA TAT CAT TAT AAC- 5'

Leucina (mutante)

5'- TA ACT ACT ATA ATT ATA **TTG** ATT ATA GTA ATA TTG- 3'
3'- AT TGA TGA TAT TAA TAT **AAC** TAA TAT CAT TAT AAC- 5'

Cisteína (mutante)

5'- TA ACT ACT ATA ATT ATA **TGC** ATT ATA GTA ATA TTG- 3'
3'- AT TGA TGA TAT TAA TAT **ACG** TAA TAT CAT TAT AAC- 5'

b- Dobles mutantes

Para generar el doble mutante de la proteína F recombinante que mimetice las mutaciones obtenidas por pasajes sucesivos del virus en presencia de suero policlonal anti-F se modificaron los aminoácidos correspondientes a las posiciones 268 y 533, (asparragina y valina respectivamente) en la proteína salvaje por aquellos que fueron identificados en los mutantes seleccionados: isoleucina en la posición 268 y metionina en la posición 533. En este caso para la generación del doble mutante pTM1-F Asn268Ile/Val533Met, se utilizó como molde el simple mutante ya sintetizado pTM1-F Val533Met

En verde figura el cambio previamente introducido al generar el simple mutante Val533Met. Las letras en rojo indican las variantes nucleotídicas y en amarillo se resaltan los sitios específicos donde se modificó el aminoácido 268. Los nombres de la secuencia corresponden a los aminoácidos 268 y 533 que figura en negrita y en verde respectivamente:

Aminoácidos 268 y 533

Asparragina (aa 268) y Valina (aa 533)

5'- CA TTA ATC AAT GAT ATG CCT ATA ACA **ATT** GAT CAG AAA AAG TTA ATG TCC AAC/...../TA ACT
3'- GT AAT TAG TTA CTA TAC GGA TAT TGT **TAA** CTA GTC TTT TTC AAT TAC AGG TTG/...../AT TGA

ACT ATA ATT ATA **ATG** ATT ATA GTA ATA TTG- 3'
TGA TAT TAA TAT **TAC** TAA TAT CAT TAT AAC- 5'

Para generar los dobles mutantes en la región transmembrana se modificaron los aminoácidos correspondientes a valina, en la secuencia de la proteína F salvaje, por metionina en aminoácidos 533 y 536. Para la modificación del aa 536 de la proteína F del VRSH cepa Long, se utilizó la secuencia que abarca nucleótidos 1601 al 1639 (aa 530 al 542). El doble mutante Val533Met/Val536Met tuvo como molde el simple mutante Val533Met, como material de partida para la mutagenesis. A su vez para obtener la mutación Val536Met fue necesario realizar dos cambios puntuales para la obtención de la mutación deseada en el codon 536. En verde figuran los cambios previamente introducidos al generar los simples mutantes y que deben ser incluidos en el diseño de los primers. Las letras en rojo indican las variantes nucleotídicas y en amarillo se resaltan los sitios específicos donde se modificó el aminoácido 536. Los nombres de las secuencias corresponden al aminoácido 536 que figura en negrita:

Valina (salvaje):

5'-ATA ATT ATA GTG ATT ATA **GTA** ATA TTG TTA TCA TTA ATT-3'
3'-TAT TAA TAT CAC TAA TAT **CAT** TAT AAC AAT AGT AAT TAA-5'

Metionina (molde para la síntesis del doble mutante Val533Met/Val536Met):

5'-ATA ATT ATA **ATG** ATT ATA **ATG** ATA TTG TTA TCA TTA ATT-3'
3'-TAT TAA TAT **TAC** TAA TAT **TAC** TAT AAC AAT AGT AAT TAA-5'

c- Triples mutantes

Finalmente se mandaron diseñar cebadores para generar el triple mutante en la región transmembrana: Val533/536/544Met.

La secuencia de los cebadores abarca nucleótidos 1625 al 1663 (aa 538 al 550) para la obtención del triple mutante Val533Met/Val536Met/Val544Met. En este caso el molde utilizado para las mutagenesis fue el doble mutante obtenido previamente. En verde figuran los cambios previamente introducidos al generar el doble mutante. Las letras en rojo indican las variantes nucleotídicas y en amarillo se resaltan los sitios específicos donde se modificó el aminoácido 544. Los nombres de las secuencias corresponden al aminoácido 544 que figura en negrita:

Valina (salvaje):

5'- ATA ATT ATA GTG ATT ATA GTA ATA TTG TTA TCA TTA ATT GCT **GTT** GGA CTG CTC CTA TAC
3'- TAT TAA TAT CAC TAA TAT CAT TAT AAC AAT AGT AAT TAA CGA **CAA** CCT GAC GAG GAT ATG

TGT-3'

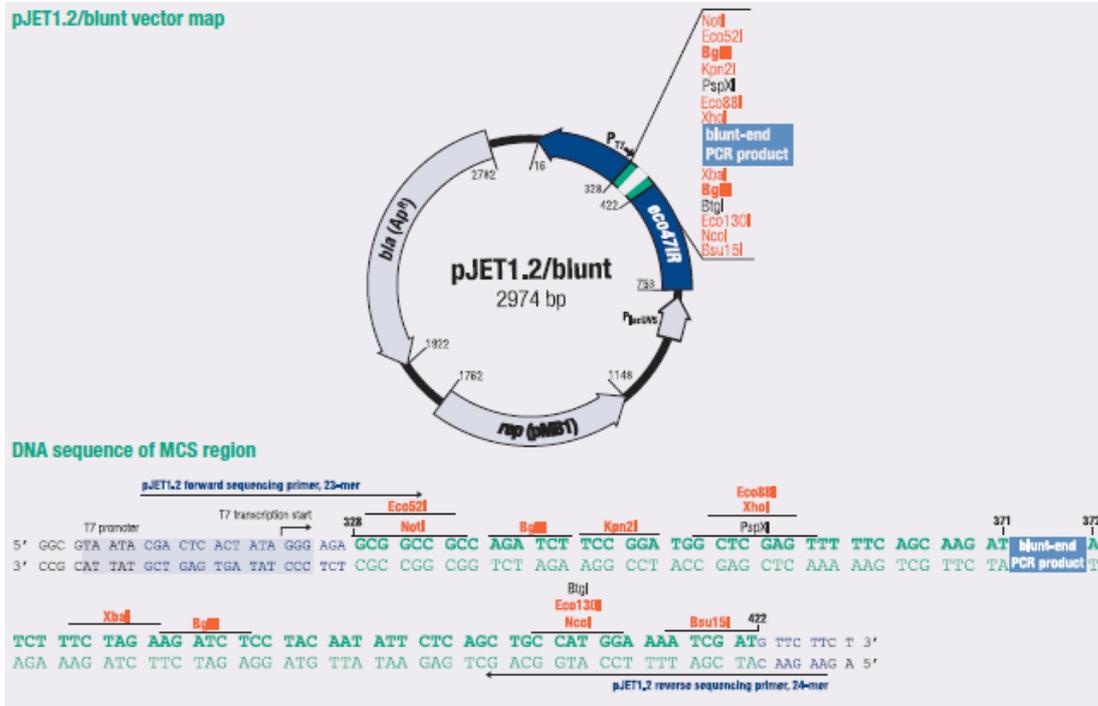
ACA-5'

Metionina (molde para la síntesis del triple mutante Val533Met/Val536Met/Val544Met):

5'-ATA ATT ATA **ATG** ATT ATA **ATG** ATA TTG TTA TCA TTA ATT GCT **ATG** GGA CTG CTC CTA TAC
3'-TAT TAA TAT **TAC** TAA TAT **TAC** TAT AAC AAT AGT AAT TAA CGA **TAC** CCT GAC GAG GAT ATG

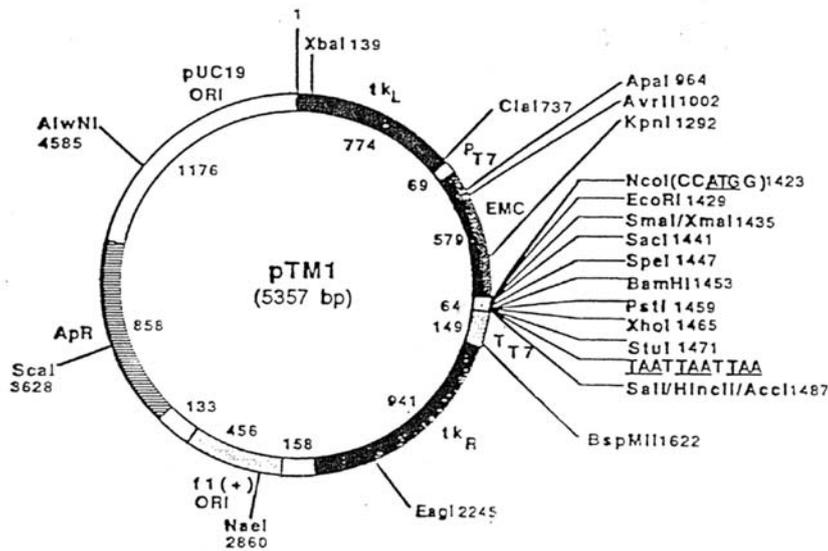
TGT-3'

ANEXO 3: 1) Mapa plasmídico 1 pJET1.2/Blunt vector map



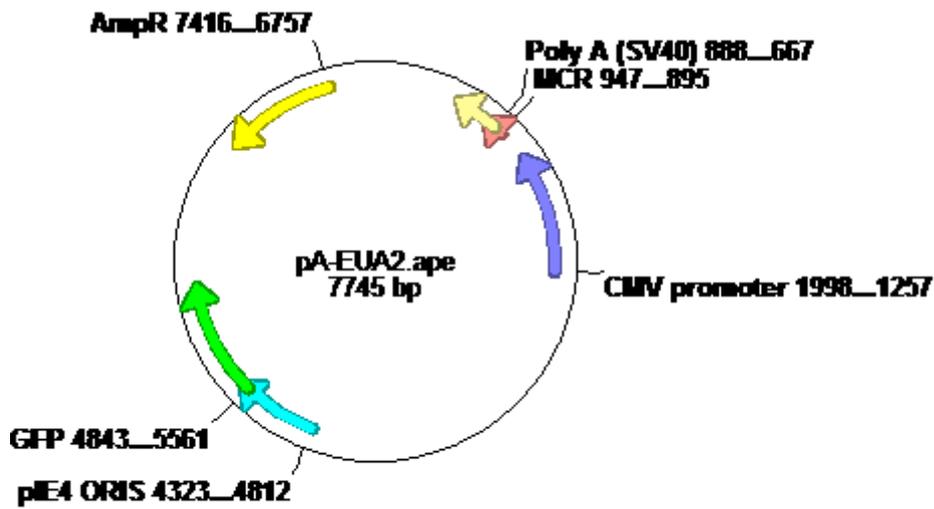
Esquema del vector pJET1.2/blunt (2974pb). Se especifican algunas características del plásmido: *bla* (ApR): gen de la beta lactamasa que confiere resistencia a ampicilina (entre 2782-1922 pb), *eco47IR*: gen letal *eco47IR* que permite la selección positiva de los recombinantes (entre 753-16 pb), P_{T7}: promotor de la ARN polimerasa del fago T7 para transcripción *in vitro* del inserto clonado (entre 305-324pb), MCS: Sitio de clonaje múltiple para clonar el fragmento deseado (entre 422-328 pb). Abajo se especifica la secuencia del MCS.

2) Mapa plasmídico 2: pTM1



Esquema del vector pTM1 (5357pb). En este esquema sólo se representa el plásmido sólo sin la proteína F la cual ya está clonada en el plásmido utilizado en este trabajo (pTM1-Fwt). El gen que codifica para la proteína F fue clonado utilizando los sitios de restricción que figuran en el sitio de clonaje múltiple ubicado junto al promotor PT7 de la ARN polimerasa del fago T7. la resistencia a este plásmido la otorga el gen ApR que genera resistencia al antibiótico ampicilina.

3) Mapa plasmídico 3 pAEUA2



Esquema del vector pA-EUA2 (7745pb). En el esquema se señala el promotor eucariota proveniente del citomegalovirus humano (CMV), el sitio de clonaje múltiple donde se clonó el gen de la proteína F TM-, el poli A del SV40, el gen que confiere resistencia a la ampicilina AmpR y el gen que codifica para la GFP con su promotor eucariota correspondiente (pIE4 ORIS) de origen viral (HSV-1.)

ANEXO 4: Reactivos y materiales

AB: mezcla de antibióticos-antimicóticos (penicilina, estreptomina y anfotericina B) - Gibco-Invitrogen Corporation.

Acetona (Dorwil)

Acetona 80% en PBS

Agarosa (ICN Biomedicals, ICN)

Agarosa de inmunodifusión (ICN) 0,6%: 0,6g agarosa llevar a 100mL con H₂O de cultivos, esterilizar por autoclave.

Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes)

Alexa Fluor® 568 (Molecular Probes)

Ampicilina stock 100mg/mL

Anticuerpo Anti-IgG conjugado con biotina (Amersham Life Science, Arlington, IL).

Anti-fade con DAPI

BM1:

Bromuro de etidio (10mg/mL, ICN Biomedicals, ICN)

BSA 10x: seroalbúmina bovina

Buffer de carga reductor (6x): 0,375M Tris-HCl pH 6.8, 12% SDS, 60% glicerol, 0.06% azul de bromofenol, 5% β -mercaptoetanol, llevar a 10mL con H₂O destilada

Buffer de corrida Tris-Glicina pH 8,3 para 10L: 0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1% SDS, H₂O destilada hasta 10L

Buffer fosfato-citrato: pH 5,0

Buffer de lisis: 10mM Tris-HCl pH 7.6, 5mM EDTA, 140mM NaCl al que se le adicionó 1% de octil-glucósido

Buffer de transferencia de proteínas (1L): 100mL buffer Tris-Glicina 10x, 100mL Metanol, llevar con H₂O destilada hasta 1L.

Buffer TBE 1x: 0.89M Tris-Borato, 0.002 EDTA, pH 8.0

CaCl₂ 0,1M: diluir 1/10 el stock de CaCl₂ 1M en H₂O destilada estéril, filtrar y colocar en frasco estéril a 4°C hasta su utilización (esta solución debe prepararse en el momento)

CaCl₂ 1M para 250mL: 27,7g CaCl₂ llevar a 250mL con H₂O destilada. Esterilizar por autoclave y guardar a -20°C.

CiP: fosfatasa alcalina intestinal? de cabra (Invitrogen) Calf Intestinal Phosphatase

Cloroformo (Dorwil®)

DMEM: Medio Basal de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco-Invitrogen Corporation).

DMEM-F12 (Invitrogen)

DMSO: dimetilsulfóxido (Applichem).

dNTPs (10mM cada uno-Gibco BRL)

Estreptavidina-peroxidasa (Amersham Life Science, Arlington, IL)

Formaldehído

Fungizona

Gel de poliacrilamida al 12% (separador) para 20mL: 6,6mL H₂O destilada filtrada, 8mL acrilamida/bis-acrilamida (29,2:0,8)(SIGMA), 5mL Tris 1,5M pH 8,8, 0,2mL SDS 10%, 0,2mL persulfato de amonio 10% y 0,008mL TEMED

Gel de poliacrilamida al 6,4% (concentrador) para 8mL: 5,5mL H₂O destilada filtrada, 1,7mL acrilamida/bis-acrilamida (29,2:0,8)(SIGMA), 1,25mL Tris 1M pH 6,8, 0,1mL SDS 10%, 0,1mL persulfato de amonio 10% y 0,01mL TEMED

Gentamicina:

Glicerol (Applichem)

Glutamina

G418: geneticina (Gibco-Invitrogen Corporation).

HEPES 1M, pH= 7.0: 119.15 g HEPES + 400mL H₂O destilada, ajustar pH con NaOH o KOH, llevar volume a 500mL, filtrar y guardar a 4°C.

H₂O estéril comercial, libre de nucleasas (Gibco BRL)

Isotiocianato de fluoresceína (ITCF) (Biocientífica S.A.)

Kit GeneJet PCR cloning (Fermentas)

Kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel)

Kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel)

kit QIAGEN Plasmid Maxi Prep

Marcador de peso molecular de ADN, 1kb Ready Load (Invitrogen)

Marcador de peso molecular de 1kb GeneRuler (Fermentas)

Marcador de peso molecular Ready-Load™ 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)

Marcador de peso molecular de proteínas pre-teñido (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen)

MBS Mammalian Transfection kit (Stratagene®, La Jolla, CA)

Medio de plaqueo viral: medio semisólido que consiste en: DMEM-F12 suplementado (2% HEPES, 2% NaHCO₃, 2% glutamina, 0,6% gentamicina, 0,1% fungizona, 0,4% BM1) + agarosa de inmunodifusión al 0.6% en una proporción 1:1 quedando la agarosa en una concentración final de 0.3%.

Medio LB (Luria Bertani) para 500mL: 5g Bacto-triptona (Difco) + 2,5g Extracto de levadura + 5g NaCl, llevar a 500mL con H₂O destilada. Esterilizar por autoclave.

MEM-E: Medio Esencial Mínimo con sales de Earle (Gibco-Invitrogen Corporation).

NEB 5-alpha Competent *E. coli*, High Efficiency (New England Biolabs) Nhel (New England Biolabs)

NH₄CL 50mM en PBS

OPD: clorhidrato de o-fenilen-N-diamina 0.4 mg/mL (SIGMA).

PAF 4%: paraformaldehído al 4% en PBS

PBS 1 x: Buffer Fosfato Salino pH 7,4 (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 1.47mM KH₂PO₄).

PBS-SAB 0.1%

PBS-BSA 3%:

PBS-BSA 3%-Tween 20 0,3%

PBS- suero de cerdo al 5%- Tween 20, 0.05%

PBS-Tween 20 (0.05%)

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes)

Placas LB agar-ampicilina (para 500mL): base medio LB + 7,5g Bacto-agar (Difco) llevar a 500mL con H₂O estéril. Esterilizar por autoclave. Dejar enfriar un poco y agregar 500uL ampicilina (100mg/mL). Colocar 15-20mL en placas de Petri, dejar solidificar y colocar en estufa durante la noche. Verificar ausencia de crecimiento bacteriano antes de guardarlas a 4°C para su conservación.

PstI 20U/uL (NEB)

Reactivo de Bradford (SIGMA-Aldrich)

SFB: suero fetal bovino (Gibco-Invitrogen Corporation).

Solución de cristal violeta al 1% en EtOH al 20%: 1g cristal violeta (Applichem) llevar a 100mL con EtOH 20%.

Solución de tripsina: 0.05% tripsina (Gibco-Invitrogen Corporation) + 0.02% EDTA (Fluka) en PBS.

Sustrato quimioluminiscente ECL, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce)

Taq DNA polimerasa (5U/μL-Invitrogen)

Transcriptasa reversa Superscript II RNase H⁻ (200U/μL-Invitrogen)

Trizol® (Invitrogen)

Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

T4 ADN ligasa (Fermentas)

Xbal (New England Biolabs)

ANEXO 5: Ensayo de Microneutralización

Los valores de las tablas corresponden a la absorbancia neta para cada réplica, es decir que estos valores ya son el resultado de la resta: absorbancia 492nm virus- la absorbancia del control de células, que figura al pie de cada tabla. Asimismo se muestran los valores de desvío estándar para set de datos de cada uno de los virus en cada dilución de anti-F para el cálculo del error que se incluyen en el gráfico de la figura 12.

VRSH-E1/-1		Desv Est.	
1,19	1,268	1,15	0,060011
1,034	1,15	1,07	0,059375
0,956	1,039	0,945	0,051391
0,878	0,866	0,836	0,021633
0,846	0,788	0,788	0,033486
0,767	0,788	0,784	0,011115
0,332	0,338	0,364	0,01701

Absorbancia control células: 0,264

VRSHE3		Desv Est.	
0,901	0,821	0,801	0,052915
0,576	0,571	0,56	0,008185
0,404	0,351	0,325	0,040262
0,276	0,307	0,256	0,025697
0,18	0,179	0,157	0,013
0,019	0,007	0,009	0,006429
-0,076	-0,067	-0,089	0,01106

Absorbancia control células: 0,300

VRSH-E2		Desv Est.	
1,315	1,284	1,254	0,030501
0,862	0,68	0,67	0,10808
0,635	0,59	0,576	0,030827
0,393	0,313	0,274	0,060666
0,243	0,114	0,192	0,064969
0,044	-0,008	0,03	0,026907
-0,073	-0,05	-0,04	0,016921

Absorbancia control células: 0,282

VRSH-E1/-2		Desv Est.	
1,242	1,322	1,218	0,054455
1,124	1,111	1,029	0,051507
0,91	0,948	0,944	0,020881
0,843	0,899	0,809	0,045446
0,874	0,861	0,796	0,041789
0,885	0,871	0,814	0,037608
0,506	0,415	0,376	0,066711

Absorbancia control células: 0,259

Absorbancia control células: 0,280

VRSH-C10		Desv Est.	
1,219	1,289	1,158	0,065552
0,906	1,062	0,932	0,083578
0,87	0,893	0,903	0,016921
0,798	0,781	0,73	0,035388
0,652	0,711	0,62	0,046163
0,62	0,605	0,623	0,009644
0,329	0,307	0,321	0,011136

Dilución anti-F	VRSH-E2 (promedio)	VRSH-E3 (promedio)	VRSH-E1/-2 (promedio)	VRSH-E1/-1 (promedio)	VRSH-C10 (promedio)
0	1,284	0,841	1,203	1,261	1,222
1/1000	0,736	0,569	1,085	1,088	0,967
1/500	0,6	0,36	0,98	0,934	0,889
1/250	0,326	0,279	0,86	0,85	0,77
1/150	0,181	0,172	0,807	0,844	0,661
1/100	0,021	0,011	0,78	0,857	0,616
1/50			0,345	0,432	0,319

En esta tabla se muestran los datos utilizados para generar la gráfica que se muestra en la figura 12.

ANEXO 6: Secuencia completa de la proteína F salvaje del VRSH clonada en el plásmido pTM1 (LT2-08-1). Se incluye la secuencia de la proteína F salvaje de la cepa Long del GenBank (F Long completa) para compararlas. Si bien al inicio no hay homología de secuencia, ésta comienza en el codón de inicio ATG correspondiente al nucleótido 14. A su vez el nucleótido 1338 presenta un cambio que da lugar a una sustitución aminoacídica de Ala x Val en el residuo 442.

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      10      20      30      40      50
LT2-08-1-F CGAACCACGG GGACGTGGTT TTCCTTTGAA AAACACGATA ATACCAATGGA
F Long com -----
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      60      70      80      90     100
LT2-08-1-F GTTGCCAATC CTCAAAGCAA ATGCAATTAC CACAATCCTC GCTGCAGTCA
F Long com gttgccaatc ctcaaagcaa atgcaattac cacaatcctc gctgcagtca
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      110     120     130     140     150
LT2-08-1-F CATTTTGCTT TGCTTCTAGT CAAAACATCA CTGAAGAATT TTATCAATCA
F Long com cattttgctt tgcttctagt caaaacatca ctgaagaatt ttatcaatca
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      160     170     180     190     200
LT2-08-1-F ACATGCAGTG CAGTTAGCAA AGGCTATCTT AGTGCTCTAA GGACTGGTTG
F Long com acatgcagtg cagttagcaa aggctatctt agtgctctaa gaactggttg
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      210     220     230     240     250
LT2-08-1-F GTATACTAGT GTTATAACTA TAGAATTAAG TAATATCAAG GAAAATAAGT
F Long com gtatactagt gttataacta tagaattaag taatatcaag gaaaataagt
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      260     270     280     290     300
LT2-08-1-F GTAATGGAAC AGATGCCAAG GTAAAACCTGA TAAAACAAGA ATTAGATAAA
F Long com gtaatggaac agatgccaa gtaaaactga taaaacaaga attagataaa
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      310     320     330     340     350
LT2-08-1-F TATAAAAATG CTGTAACAGA ATTGCAGTTG CTCATGCAAA GCACACCAGC
F Long com tataaaaatg ctgtaacaga attgcagttg ctcatgcaaa gcacaccagc
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      360     370     380     390     400
LT2-08-1-F AGCAAACAAT CGAGCCAGAA GAGAACTACC AAGGTTTATG AATTATACAC
F Long com agcaacaat  cgagccagaa  gagaactacc  aaggtttatg  aattatacac
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      410     420     430     440     450
LT2-08-1-F TCAACAATAC CAAAAAACC AATGTAACAT TAAGCAAGAA AAGGAAAAGA
F Long com tcaacaatac caaaaaacc aatgtaacat taagcaagaa aaggaaaaga
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      460     470     480     490     500
LT2-08-1-F AGATTCTTGG GTTTTTTGTG AGGTGTTGGA TCTGCAATCG CCAGTGGCAC
F Long com agattcttgg gtttttgtg aggtgttgg tctgcaatcg ccagtggcac
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      510     520     530     540     550
LT2-08-1-F TGCTGTATCT AAGGTCTCTG ACTTAGAAGG AGAAGTGAAC AAGATCAAAA
F Long com tgctgtatct aaggtctctg acttagaagg agaagtgaac aagatcaaaa
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|

```

```

                    560      570      580      590      600
LT2-08-1-F  GTGCTCTACT ATCCACAAAC AAGGCCGTAG TCAGCTTATC AAATGGAGTT
F Long com  gtgctctact atccacaaac aaggccgtag tcagcttata aatggagtt

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    610      620      630      640      650
LT2-08-1-F  AGTGTCTTAA CCAGCAAAGT GTTAGACCTC AAAAACTATA TAGATAAAACA
F Long com  agtgtcttaa ccagcaaagt gttagacctc aaaaactata tagataaaca

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    660      670      680      690      700
LT2-08-1-F  ATTGTTACCT ATTGTGAATA AGCAAAGCTG CAGAATATCA AATATAGAAA
F Long com  attgttacct attgtgaata agcaaagctg cagaatatca aatatagaaa

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    710      720      730      740      750
LT2-08-1-F  CTGTGATAGA GTTCCAACAA AAGAACAACA GACTACTAGA GATTACCAGG
F Long com  ctgtgataga gttccaacaa aagaacaaca gactactaga gattaccagg

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    760      770      780      790      800
LT2-08-1-F  GAATTTAGTG TTAATGCAGG TGTAACTACA CCTGTAAGCA CTTACATGTT
F Long com  gaatttagtg ttaatgcagg tgtaactaca cctgtaagca cttacatgtt

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    810      820      830      840      850
LT2-08-1-F  AACTAATAGT GAATTATTGT CATTAAATCAA TGATATGCCT ATAACAAATG
F Long com  aactaatagt gaattattgt cattaatcaa tgatatgcct ataacaatg

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    860      870      880      890      900
LT2-08-1-F  ATCAGAAAAA GTTAATGTCC AACAATGTTC AAATAGTTAG ACAGCAAAGT
F Long com  atcagaaaaa gttaatgtcc aacaatgttc aaatagttag acagcaaagt

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    910      920      930      940      950
LT2-08-1-F  TACTCTATCA TGTCCATAAT AAAAGAGGAA GTCTTAGCAT ATGTAGTACA
F Long com  tactctatca tgtccataat aaaagaggaa gtcttagcat atgtagtaca

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    960      970      980      990      1000
LT2-08-1-F  ATTACCACTA TATGGTGTGA TAGATACACC TTGTGGAAA TTACACACAT
F Long com  attaccacta tatggtgtga tagatacacc ttgtggaaa ttacacacat

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1010     1020     1030     1040     1050
LT2-08-1-F  CCCCTCTATG TACAACCAAC ACAAAGAAG GGTCAAACAT CTGTTTAAAC
F Long com  cccctctatg tacaaccaac acaaagaag ggtcaaacat ctgtttaaca

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1060     1070     1080     1090     1100
LT2-08-1-F  AGAACTGACA GAGGATGGTA CTGTGACAAT GCAGGATCAG TATCTTTCTT
F Long com  agaactgaca gaggatggta ctgtgacaat gcaggatcag tatctttctt

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1110     1120     1130     1140     1150
LT2-08-1-F  CCCACAAGCT GAAACATGTA AAGTTCAATC GAATCGAGTA TTTTGTGACA
F Long com  cccacaagct gaaacatgta aagttcaatc gaatcgagta ttttgtgaca

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1160     1170     1180     1190     1200
LT2-08-1-F  CAATGAACAG TTTAACATTA CCAAGTGAAG TAAATCTCTG CAATGTTGAC
F Long com  caatgaacag tttaacatta ccaagtgaag taaatctctg caatgttgac

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1210     1220     1230     1240     1250
LT2-08-1-F  ATATTCAATC CCAAATATGA TTGTAAAATT ATGACTTCAA AAACAGATGT
F Long com  atattcaatc ccaaatatga ttgtaaaatt atgacttcaa aaacagatgt

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1260     1270     1280     1290     1300
LT2-08-1-F  AAGCAGCTCC GTTATCACAT CTCTAGGAGC CATGTGTGCA TGCTATGGCA
F Long com  aagcagctcc gttatcacat ctctaggagc catttgtgca tgctatggca

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    1310     1320     1330     1340     1350
LT2-08-1-F  AAACATAAATG TACAGCATCC AATAAAAATC GTGGAATCAT AAAGACATTT
F Long com  aaacataatg tacagcatcc aataaaaatc gtggaatcat aaagacatTT

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1360      1370      1380      1390      1400
LT2-08-1-F TCTAACGGGT GTGATTATGT ATCAAATAAA GGGGTGGACA CTGTGTCTGT
F Long com tctaacgggt gtgattatgg atcaaataaa ggggtagaca ctgtgtctgt

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1410      1420      1430      1440      1450
LT2-08-1-F AGGTAACACA TTATATTATG TAAATAAGCA AGAAGGCAAA AGTCTCTATG
F Long com aggtaacaca ttatattatg taaataagca agaaggcaaa agtctctatg

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1460      1470      1480      1490      1500
LT2-08-1-F TAAAAGGTGA ACCAATAATA AATTCTATG ACCCATTAGT ATTCCCCTCT
F Long com taaaaggtga accaataata aattctatg acccattagt attcccctct

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1510      1520      1530      1540      1550
LT2-08-1-F GATGAATTTG ATGCATCAAT ATCTCAAGTC AATGAGAAGA TTAACCAGAG
F Long com gatgaatttg atgcatcaat atctcaagtc aatgagaaga ttaaccagag

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1560      1570      1580      1590      1600
LT2-08-1-F TTTAGCATTT ATTCGTAAT CCGATGAATT ATTACATCAT GTAAATGCTG
F Long com tttagcattt attcgtaaat ccgatgaatt attacatcat gtaaattgctg

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1610      1620      1630      1640      1650
LT2-08-1-F GTAATCAAC CACAAATATC ATGATAACTA CTATAATTAT AGTGATTATA
F Long com gtaaatcaac cacaaatatc atgataacta ctataattat agtgattata

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1660      1670      1680      1690      1700
LT2-08-1-F GTAATATTGT TATCATTAAAT TGCTGTTGGA CTGCTCCTAT ACTGTAAGGC
F Long com gtaatattgt tatcattaat tgctgttggga ctgctcctat actgtaaggc

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1710      1720      1730      1740      1750
LT2-08-1-F CAGAAGCACA CCAGTCACAC TAAGCAAGGA TCAACTGAGT GGTATAAATA
F Long com cagaagcaca ccagtcacac taagcaagga tcaactgagt ggtataaata

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1760      1770      1780      1790      1800
LT2-08-1-F ATATTGCATT TAGTAACTGA ATAAAAATAG CACCTAATCA TGTCTTACA
F Long com atattgcatt tagtaactga ataaaaatag cacctaatca tgtcttaca

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1810      1820      1830      1840      1850
LT2-08-1-F ATGGTTTACT ATCTGCTCAT AGACAACCCA TCTATCATTG GATTTTCTTA
F Long com atggtttact atctgctcat agacaaccca tctatcattg gattttctta

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1860      1870      1880      1890      1900
LT2-08-1-F AAATCTGAAC TTCATCGAAA CTCTTATCTA TAAACCATCT CACTTACACT
F Long com aaatctgaac ttcatcgaaa ctcttatcta taaaccatct cacttacact

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      1910      1920      1930      1940      1950
LT2-08-1-F ATTTAAGTAG ATTCCTAGTT TATAGTTATA TAAAAGGATC CCTGCAGCTC
F Long com atttaagtag attcctagtt tatagttata taaaaggatc cctgcagctc
at
```