



RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes



Universidad
Nacional
de Quilmes

Borio, Cristina Silvia

Estudio de la función y actividad de la proteína Z del virus Junín



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Borio, C. S. (2016). *Estudio de la función y actividad de la proteína Z del virus Junín. (Tesis de doctorado).* Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/197>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Estudio de la función y actividad de la proteína Z del virus Junín

Cristina Silvia Borio

cborio@unq.edu.ar

Resumen

El trabajo de tesis "Estudio de la función y actividad de la proteína Z" fue desarrollado bajo la dirección del Dr. Mario Lozano y la Codirección del Dr. Marcos Bilen, en el Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular, área de virosis emergentes y zoonóticos (LIGBCM-AVEZ), en el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes, para optar por el título de Doctor de la Universidad Nacional de Quilmes con Mención en Ciencias Básicas y Aplicadas.

La estructura del documento cuenta con cinco secciones centrales, las cuales están subdivididas en capítulos.

En la sección I de este trabajo se describe el estado del arte correspondiente a los arenavirus, específicamente al virus Junín. El capítulo 1 contiene la información básica sobre la familia Arenaviridae, mientras que el capítulo 2 resume las características principales de la enfermedad provocada por el virus Junín. En el capítulo 3 se realizó una actualización sobre la biología del virus Junín, donde se describe en detalle la morfología del virión, el genoma viral y cada una de las cuatro proteínas codificadas por el mismo. Por último en el capítulo 4 se realizó un resumen sobre la tecnología de partículas tipo virales, como estrategia de vehiculización de antígenos con fines vacunales. Esta sección, correspondiente a la introducción, fue realizada de manera minuciosa y detallada para brindar al lector información actualizada, tal que facilite el entendimiento de las discusiones incluidas en este trabajo. La sección II, se encuentra subdividida en el capítulo 6 y 7 donde se detallan los resultados obtenidos a partir del análisis bioinformático de la secuencia de la proteína Z, y el desarrollo de herramientas que luego serán utilizadas a lo largo del trabajo, respectivamente.

La sección III, describe los resultados obtenidos a partir de los estudios de funcionalidad de la proteína Z in vitro.

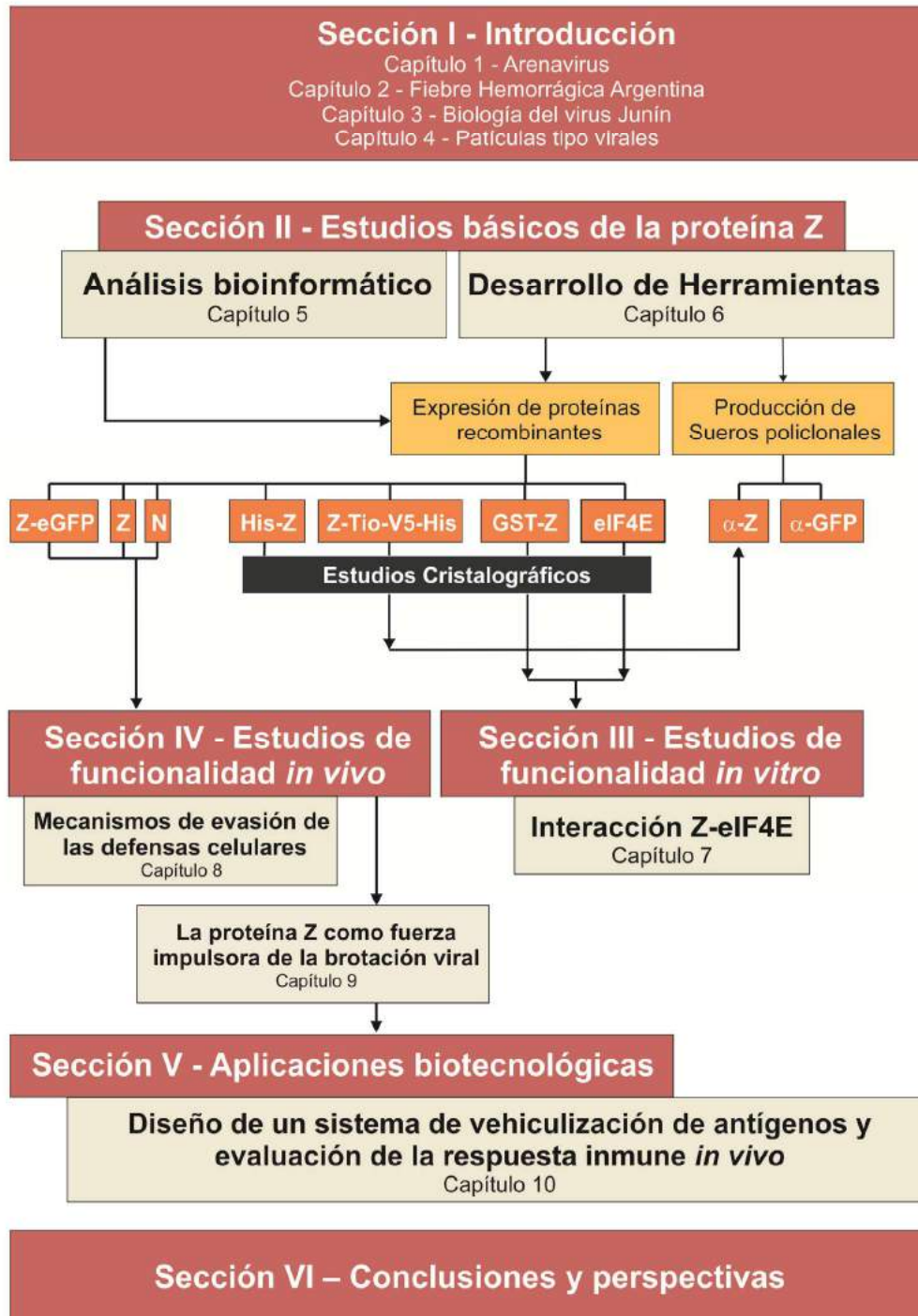
En la sección IV, comprendida por los capítulos 8 y 9, se detallan los estudios de funcionalidad in vivo de la proteína Z y N, e incluyen los resultados obtenidos a partir del estudio de los mecanismos de evasión de las defensas celulares asociados a la actividad de dichas proteínas. Mientras que en el capítulo 9 se incluyen los ensayos que describen a la proteína describen el análisis de la actividad de la proteína Z asociada a la brotación viral, en células de mamífero y de insecto.

La sección V, la cual contiene el capítulo 10, describe las aplicaciones biotecnológicas propuestas a partir de los resultados obtenidos en este trabajo. Por último, en la sección VI se presenta la discusión integral de los resultados obtenidos, junto con las conclusiones y perspectivas a futuro.

Director: Dr. Mario Enrique Lozano

Co-Director: Dr. Marcos Fabián Bilen

-DIAGRAMA ORGANIZATIVO-



Glosario

α DG: Receptor de **α -dystroglicano**

AcMNPV: *Autographa californica multiple nuclear polyedrosis virus*

ADN: Ácido desoxiribonucleico

ADNc: ADN complementario

Ago: Proteínas **Argonautas**

ANM: Arnavirus del Nuevo Mundo

APC: Células presentadoras de antígenos

APH: Afidicolina

APL: *Acute Promyelocytic Leukemia*

ARN L: Segmento L o *Large*

ARN S: Segmento S o *Small*

ARN: Ácido ribonucleico

ARNi: ARN de interferencia

ARNm: ARN mensajero

ARNsi: *Small interference ARN*

AVM: Arnavirus del Viejo Mundo

BSA: *Bovine Serum Albumin* o Albúmina de suero bovino

CAP o **m⁷GTP**: 7-metil guanosina-trifosfato

DC: Células dendríticas

DTT: Dithiothreitol

EIE: Enzimo Inmuno Ensayo

EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ENK: Enterokinasa

ESCRT: *Endosomal sorting complexes required for transport*

FDA: *U.S. Food and Drug Administration*

FHA: Fiebre Hemorrágica Argentina

FHB: Fiebre Hemorrágica Boliviana

FHBr: Fiebre Hemorrágica Brasileira

FHV: Fiebre Hemorrágica Venezolana

GFP: *Green Fluorescent Protein* o Proteína fluorescente verde

GP1 o **G1**: Glicoproteína 1

GP2 o **G2**: Glicoproteína 2

GPC: Precursor de las glicoproteínas

GST: Glutathión-S-Transferasa

HEX: *Hematopoietically Expressed homeobox*

His: Poli Histidina

HIV: Virus de la inmunodeficiencia humana

Hrs: *Mammalian hepatocyte receptor tyrosine kinase substrate*

IC: Dominio Intracelular

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía Viral

IgG: Inmunoglobulinas de tipo **G**

ILVs: *Intraluminal vesicles* o vesículas intraluminales

INEVH: Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas

INF: Interferón

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

IRF-3: Factor de regulación de Interferón **3**

IRF-7: Factor de regulación de Interferón **7**

L: ARN polimerasa

LBPA: Ácido lisobifosfatídico

MAVS: *Mitochondrial antiviral signaling proteins*

MDA-5: Melanoma differentiation-associated protein **5**

miARNs: Micro **ARNs**

MOI: *Multiplicity of infection* o Multiplicidad de infección

MVBs: *Multivesicular Bodies* o cuerpos multivesiculares

NMT: *N-miristoil transferase*

NP o N: Nucleoproteína

ORF: *Open Read Frame* (Marco de lectura abierto)

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: *Buffer* Fosfato Salino

PI3P: Fosfatidil inositol 3-fosfato

PML: Proteína de la leucemia promielocítica o *Promyelocytic Leukemia Protein*

PMSF: Fenil-metil-sulfonyl fluoruro

PRH: *Proline-rich Homeodomain Protein*

PRRs: Receptores celulares de reconocimiento de patrones

RAR α : Receptor alfa del ácido retinóico

RdRP: ARN polimerasa ARN dependiente

RF: Región Fusogénica

RIG-I: *Retinoic-acid inducible gene-I*

RING: *Really interesting new gene*

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RNP: Ribonucleoproteínas

RSS: Supresor de la maquinaria de ARNi

RT-PCR: *Reverse Transcriptase-PCR*

SSP: Péptido señal

TEM: *Transmission electron microscopy* o Microscopía electrónica de transmisión

TfR1: Receptor de Transferrina **1**

Tio: Tio redoxina

TM: Dominio Transmembrana

TSG101: *Tumor susceptibility gene 101*

UC: Ultracentrifugación

USAMRIID: *United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases*

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VLPs: *Virus Like Particles* o partículas tipo virales

-ÍNDICE-

Sección I – Introducción

Capítulo 1 – Arenavirus

<i>La familia Arenaviridae</i>	1
<i>Historia y Taxonomía</i>	2
<i>Ecología y Epidemiología</i>	3
<i>Distribución geográfica: arenavirus del Viejo y Nuevo Mundo</i>	5
<i>Clasificación filogenética</i>	6

Capítulo 2 - Fiebre Hemorrágica Argentina

<i>Fiebre Hemorrágicas Arenavirales</i>	9
<i>Fiebre Hemorrágica Argentina</i>	9
Epidemiología de la FHA	10
Diagnóstico clínico	11
Diagnóstico etiológico	12
Tratamiento	13
Antivirales	14
Generación de la vacuna Candid#1	15

Capítulo 3 - Biología del Virus Junín

<i>Características de los viriones</i>	17
Ultraestructura	17
Estructura molecular	17
Morfogénesis	19
<i>Estructura y propiedades del genoma</i>	19
Genoma viral	19
Estrategia de codificación	20
<i>Proteínas virales</i>	22
Precursor de las glicoproteínas	22

<i>Péptido Señal</i>	24
<i>Glicoproteínas G1 y G2</i>	24
<i>Unión al receptor y entrada viral</i>	25
<i>Interacción entre el complejo GPC y Z</i>	27
Proteína de la nucleocápside	27
<i>Actividad de regulación de la transcripción/replicación</i>	28
<i>Autoasociación e incorporación de las nucleocápsides al virión</i>	28
<i>Actividad Exonucleasa y de unión a ARN</i>	30
<i>Actividad de inhibición de interferón</i>	34
<i>Actividad de inhibición de la apoptosis</i>	36
<i>Interacción con la proteína viral Z</i>	37
ARN polimerasa viral (L)	38
<i>Dominio endonucleasa o N-Terminal</i>	38
<i>Dominio polimerasa (Región III)</i>	39
Proteína Z	41
<i>Dominio de Miristoilación</i>	42
<i>Dominio RING</i>	43
<i>Late domains o dominios tardíos</i>	44
<i>Interacción con proteínas celulares</i>	50
PRH	50
PML	50
P0	52
eIF4E	52
RIG-I	56
Tsg101	57
<i>Oligomerización</i>	57
<i>Interacción con proteínas virales</i>	58
<i>Antivirales</i>	59
Ciclo Viral	61

Capítulo 4 - Partículas tipo Virales y Proteínas de Matriz

Partículas tipo virales (Virus Like Particles - VLPs)	67
Propiedades biotecnológicas de las VLPs	67

Sección II – Estudios básicos de la proteína Z

Capítulo 5 - Análisis Bioinformático

Introducción	71
Resultados	72
Alineamiento de secuencias aminoacídicas	72
Discusión	78

Capítulo 6 - Desarrollo de Herramientas

Introducción	79
Resultados	80
Producción de proteínas recombinantes	80
Tio-Z-V5-His	80
Expresión de Tio-Z-V5-His	81
Purificación de Tio-Z-V5-His	82
Proteólisis de Tio-Z-V5-his con la enzima Enteroquinasa	85
Purificación de Z-V5-his	85
GST-Z	86
Expresión de GST-Z	87
Purificación de GST-Z	88
Proteólisis de GST-Z con la enzima Factor Xa	89
Ensayos de proteólisis limitada	90
His-Z	92
Expresión de His-Z	93
eIF4E	93
Expresión de eIF4E	93

<i>Purificación de eIF4E</i>	95
Producción de sueros policlonales	96
<i>Titulación del suero policlonal α-Tio-Z-V5-His</i>	96
<i>Purificación de Inmunoglobulinas tipo G</i>	97
<i>Producción de Suero policlonal α-GFP</i>	98
<i>Titulación del suero policlonal α-GFP</i>	98
Discusión	100

Sección III - Estudios de funcionalidad in vitro

Capítulo 7 – Interacción Z-eIF4E

Introducción	103
Resultados	104
Pulldown de GST-Z y eIF4E	104
Desarrollo de un sistema de purificación basado en la proteína Z	106
Discusión	108

Sección IV - Estudios de funcionalidad in vivo

Capítulo 8 – Mecanismos de evasión de las defensas celulares

Introducción	109
Resultados	113
Silenciamiento de EGFP	113
Evaluación de la actividad supresora de ARNi de las proteínas N y Z	115
Citotoxicidad de la expresión de la proteína Z	120
Discusión	124

Capítulo 9 – La proteína Z como fuerza impulsora de la brotación viral

Introducción	129
Resultados	130
Expresión de Z-EGFP bajo el control de promotores de virus de mamíferos	130
Expresión de Z-EGFP (CMV) en 293T por transfección	131
Búsqueda de vesículas extracelulares conteniendo Z-EGFP	134
<i>Detección de Z-EGFP en el sobrenadante de cultivo</i>	134
<i>Ensayo de protección a Proteinasa K</i>	134
<i>Determinación de la presencia de vesículas fluorescentes en el sobrenadante de cultivo mediante citometría de flujo</i>	136
<i>Detección de vesículas en el sobrenadante de cultivo por microscopía electrónica de transmisión</i>	137
<i>Caracterización proteica de las VLPs</i>	137
<i>Control de VLPS con pEGFP-N3</i>	138
Expresión de Z-EGFP bajo el control de promotores baculovirales	140
<i>Expresión de Z-EGFP (Ie1) en 293T por transfección</i>	141
<i>Expresión de Z-EGFP (Ie1) en Sf9 por transfección</i>	142
<i>Producción de baculovirus recombinantes Ac-Z-EGFP</i>	142
<i>Expresión de Z-EGFP (Ie1) en Sf9 por infección</i>	143
Cinética de expresión de Z-EGFP en Sf9 por infectadas	143
Búsqueda de VLPs conteniendo Z-EGFP producidas en células de insecto	145
Ensayo de protección a Proteinasa K	145
Gradiente de sacarosa del sobrenadante de Sf9 infectadas con Ac-Z-EGFP	143
<i>Estrategias para disminuir la presencia de virus brotantes en el sobrenadante de cultivo</i>	148
Expresión de Z-EGFP en células UFL-Ag 286	148
Ensayo de Afidicolina	149
Expresión de His-Z en células Sf9	154
<i>Búsqueda de Z en partículas brotantes después de la infección</i>	154
<i>Ensayo de protección a Proteinasa K</i>	156
Discusión	157

Sección V – Aplicaciones biotecnológicas

Capítulo 10 – Diseño de un sistema de vehiculización de antígenos y evaluación de la respuesta inmune *in vivo*

Introducción	163
Toxina Shiga	163
Rotavirus	164
Tecnología de VLPs	165
Resultados	166
Producción de VLPs conteniendo Z-EGFP	166
Análisis de la respuesta inmune humoral	166
Producción de Z-EGFP VLPs en células COS-7	168
Evaluación del sistema de vehiculización utilizando otros antígenos	169
<i>Expresión de Z-VP6 en células 293T</i>	169
<i>Expresión de Z-CD4 y Z-CD4-EGFP en células 293T</i>	171
<i>Expresión de Z-Stx2A en células 293T</i>	172
Discusión	174

Sección VI – Conclusiones y perspectivas

Conclusiones y perspectivas	179
------------------------------------	-----

Sección VII

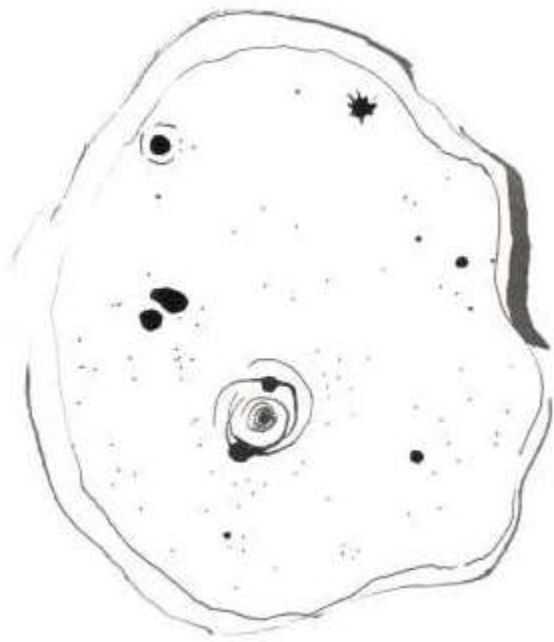
Materiales y métodos

Técnicas de biología celular	183
Técnicas de biología molecular	192
Expresión y purificación de proteínas en <i>E. coli</i>	198
Ensayos y métodos inmunológicos	204
Técnicas de análisis bioinformático	208
Técnicas de microscopía	209

Anexo	211
Bibliografía	225
Agradecimientos	245

SECCIÓN I

INTRODUCCIÓN



ARENAVIRUS

CAPÍTULO 1

El ser humano convive con una gran variedad de microorganismos, algunos de ellos patógenos que han co-evolucionado en una relación de tipo predador-presa, seleccionando complejos sistemas de defensa, contra los cuales a su vez, estas entidades desarrollaron mecanismos de evasión. Los patógenos con los que nos relacionamos ancestralmente, rara vez nos producen enfermedades o, en todo caso, provocan enfermedades leves y crónicas. Sin embargo, existen alteraciones en este equilibrio dinámico en las cuales una de las partes prevalece transitoriamente.

A diferencia de estas afecciones crónicas, las denominadas enfermedades emergentes son provocadas por patógenos con los que nos relacionamos circunstancialmente. Un virus emergente se define como aquél que ha aparecido recientemente en una población, o que rápidamente está expandiendo su rango de hospedadores y con ello provocando una enfermedad (Flint *et al.*, 2000). Podemos clasificar a los patógenos que producen enfermedades emergentes, en tres grupos: 1) los que han evolucionado recientemente, 2) los que llamamos agentes zoonóticos (patógenos que poseen un hospedador o reservorio animal desde el cual se transmiten a los humanos), y 3) los que están presentes en grupos humanos aislados que, después del establecimiento de contactos que antes no existían entre dos poblaciones, logran propagarse. Existen numerosos ejemplos de patógenos emergentes, entre los cuales se hallan los virus causantes de las zoonosis provocadas por arenavirus y bunyavirus, cuyos reservorios naturales se encuentran en especies particulares de roedores. La mayoría de las enfermedades emergentes se clasifican dentro de lo que se denominan zoonosis, y suelen ocurrir como consecuencia de cambios ecológicos que afectan la densidad de población del hospedador zoonótico, del vector de la enfermedad o de los humanos. Un ejemplo de este fenómeno es la Fiebre Hemorrágica Argentina causante de epidemias estacionales en la región central de nuestro país.

LA FAMILIA ARENAVIRIDAE

El agente responsable de la Fiebre Hemorrágica Argentina es un virus perteneciente a la familia *Arenaviridae*. Estos patógenos poseen un genoma bisegmentado y son envueltos en una membrana de naturaleza lipoproteica. Los ARN genómicos se denominan S (por *short*, con un promedio de aproximadamente 3500 nucleótidos de longitud) y L (por *large*, de aproximadamente 7300 nucleótidos de longitud), los cuales contienen dos marcos de lectura abiertos, no superpuestos y de polaridad opuesta, que dieron origen a la denominación “ambisentido” para designar el sistema de codificación de estos virus (Auperin *et al.*, 1984). Los miembros de esta

familia causantes de Fiebres Hemorrágicas, producen infecciones agudas en humanos, mientras que la infección en los roedores se caracteriza por ser persistente y asintomática.

HISTORIA Y TAXONOMÍA

La primera descripción médica de una infección humana producida por un arnavirus fue realizada durante 1925 por el médico sueco, Arvid Wallgren. Esta enfermedad, conocida en ese momento como meningitis aséptica aguda, en la actualidad se denomina coriomeningitis linfocitaria. Sin embargo, el virus asociado con la enfermedad fue aislado una década después, y denominado como LCMV por la sigla inglesa que identifica a la enfermedad (*Lymphocytic Choriomeningitis virus*). Varios grupos independientes realizaron el descubrimiento casi simultáneamente, siendo Armstrong y Lillie (1934) los que publicaron la primera descripción del virus. Durante varias décadas el virus de LCM permaneció sin ser clasificado dentro de alguna familia viral. Hoy, es el prototipo de la familia *Arenaviridae*. Entre 1956 y 1958 se aislaron, en diferentes regiones del globo, otros dos nuevos virus los cuales fueron denominados Tacaribe (Trinidad y Tobago) y Junín (Argentina), que pronto mostraron tener antígenos comunes (Mettler *et al.*, 1963). Este último agente fue aislado a partir de pacientes por primera vez en el año 1958, aunque ya durante 1955 el Dr. Arribáztiga y colaboradores se encargaron de documentar ampliamente los síntomas y signos clínicos de una enfermedad que afectaba a los trabajadores de la zona rural del noroeste de la provincia de Buenos Aires, posteriormente denominada Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) (Arribáztiga *et al.*, 1955).

En los comienzos, el criterio para la clasificación de estos virus dentro de un grupo fue únicamente epidemiológico. En particular, debido a que los primeros aislamientos del virus Junín fueron obtenidos a partir de roedores y ácaros (Parodi *et al.*, 1959 a y b) se pensó que la FHA estaba asociada a artrópodos (Mettler *et al.*, 1963), y por ello, el virus fue ubicado en ese entonces dentro del grupo Arbovirus (virus transmitidos por artrópodos o en su denominación inglesa *arthropode borne virus*). No obstante, como no pudo probarse que los ácaros fueran vectores de la enfermedad, se cree que la detección mencionada fue casual y probablemente debida a los hábitos hematófagos de los artrópodos ensayados.

Luego, en 1970, en base a la caracterización serológica, fisicoquímica y morfológica de estos virus, se conformó la familia *Arenaviridae*, integrada por LCMV y los virus americanos (Pfau, 1974; Rowe *et al.*, 1970a). En la actualidad, esta familia está formada por veinticuatro virus reconocidos por el Comité Internacional de Taxonomía

Viral (ICTV) (King *et al.*, 2011) y otros trece que aún permanecen en lista de espera (tabla 1.1). Incluido en el nombre “arenavirus” se encuentra el prefijo derivado de la palabra latina *arenosus* y se refiere a los virus arenosos, derivado del aspecto granuloso que presentan los viriones al microscopio electrónico, como consecuencia de la presencia de ribosomas en su interior (ver figura 3.1 del capítulo 3).

Virus	Acrónimo	Virus	Acrónimo
Allpahuayo virus	ALLV	Machupo virus	MACV
Amapari virus	AMAV	Mobala virus	MOBV
Bear Canyon virus	BCNV	Morogoro	-
Big Brushy Tank	-	Mopeia virus	MOPV
Catarina	-	North American	-
Chapare virus	-	Oliveros virus	OLVV
Cupixi virus	CPXV	Pampa	-
Dandenong	-	Paraná	PARV
Flexal virus	FLEV	Pichinde	PICV
Guanarito virus	GTOV	Pinhal	-
Ippy virus	IPPYV	Piritai virus	PIRV
Junín virus	JUNV	Rio Carcarañá	-
Kodoko	-	Sabiá virus	SABV
Lassa virus	LASV	Skinner Tank	-
Latino virus	LATV	Tacaribe virus	TCRV
Lujo virus	LUJV	Tamiami virus	TAMV
Luna	-	Tonto Creek	-
Lunk	-	Whitewater Arroyo	WWAV
Lymphocytic choriomeningitis	LCMV		

Tabla 1.1 Listado de los miembros virales pertenecientes a la familia *Arenaviridae*, junto con su acrónimo. Los virus remarcados en negrita aún no han sido incluidos en la clasificación taxonómica del ICTV.

ECOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

Los virus Junín y Machupo, causantes de las fiebres hemorrágicas Argentina y Boliviana (FHB) respectivamente, en general producen la infección en humanos a través de las mucosas (conjuntiva, inhalatoria u orofaríngea), por cortes o raspaduras de la piel por contacto con semillas, tallos de malezas o por inhalación de aerosoles,

polvo u otros materiales contaminados con la orina o la saliva de un roedor infectado (Weissenbacher *et al.*, 1987; Maiztegui, 1975; Peters *et al.*, 1974; Johnson *et al.*, 1965; Mackenzie *et al.*, 1964; Rugiero *et al.* 1964a,b,c; Arribáizaga, 1955). De este modo, los roedores son los reservorios naturales de casi todos los arenavirus (Arata & Gratz, 1975), excepto en el caso de Tacaribe, el cual fue aislado a partir de un quiróptero (Downs *et al.*, 1963).

La historia natural de los arenavirus está caracterizada por infectar generalmente a un número limitado de especies de pequeños roedores, quienes actúan como sus reservorios y habitan áreas geográficas bien definidas, que en general coinciden con la actividad de cada virus (Ambrosio *et al.*, 2006). En el caso del virus Junín el reservorio principal es un roedor con hábitos rurales (*Calomys musculinus*), aunque también ha sido aislado de *Calomys laucha* (Maiztegui, 1975). En estos roedores infectados, el patógeno cumple un ciclo que asegura su mantenimiento en la naturaleza y en general, se encuentran altos títulos virales en casi todos los órganos y fluidos corporales como la sangre y, en particular, la saliva. En la mayoría de los arenavirus, los roedores presentan infecciones crónicas inaparentes, con eliminación persistente del virus al medio ambiente (Lehmann Grube *et al.*, 1983; Rawls *et al.*, 1981; Staneck *et al.*, 1972).

Aunque se detectan casos de FHA durante cualquier época del año, esta enfermedad tiene una distribución estacional que abarca desde el mes de marzo hasta julio. Este hecho está relacionado con el crecimiento estacional de los roedores dentro del área endémica. La población de *Calomys* aumenta de manera considerable durante los meses de cosecha, quizás debido a un cambio en las condiciones ambientales que favorecen su desarrollo, tal como el aumento de la disponibilidad de alimento. En ese sentido, se han hecho especulaciones epidemiológicas que vinculan las condiciones de cultivo en la pampa húmeda durante la segunda guerra mundial, con la primera emergencia de la FHA como enfermedad humana de casuística importante. Durante el primer brote de FHA, la enfermedad afectó en mayor proporción a personas que trabajaban en la cosecha de cereales. En estos campos sembrados se encontró una mayor densidad de roedores, incrementando las oportunidades para la transmisión del virus al hombre.

En la actualidad, el área endémica posee límites cada vez más difusos, reportándose casos en localidades alejadas de la misma. En el último informe de la Reunión anual del Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica del año 2012 se informaron 259 casos de Fiebre Hemorrágica, confirmando una prevalencia histórica en el género masculino entre 15 y 45 años de. Por otro lado, también se destacó la significativa presencia de la enfermedad en trabajadores no rurales (por

ejemplo. camioneros), lo que sugiere la inclusión de los complejos agro-industriales (silos, molinos, aceiteras) al área endémica.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA: ARENAVIRUS DEL VIEJO Y NUEVO MUNDO

En relación con el origen geográfico de sus hospedadores, los arenavirus pueden ser clasificados en dos grupos: los arenavirus del Nuevo Mundo (ANM) y los arenavirus del Viejo Mundo (AVM). El grupo del Nuevo Mundo está comprendido por arenavirus autóctonos de las Américas, mientras que el grupo del Viejo Mundo, está comprendido por virus de África y el ubicuo LCMV. La distribución geográfica de cada uno de ellos está determinada por el rango de su especie reservorio, siendo LCMV el único con una distribución mundial, probablemente por su asociación con el cosmopolita ratón doméstico *Mus musculus*, (Charrel *et al.*, 2008; Charrel & Llambarie, 2003) el cual se ha distribuido en diferentes territorios a bordo de los barcos de comerciantes, conquistadores y esclavistas.

De las veinticuatro especies reconocidas de arenavirus, seis han sido aisladas a partir de seres humanos, estableciéndose un cuadro clínico para cada uno de los casos y dando lugar así a la descripción de la enfermedad: LCM, coriomeningitis linfocitaria; Lassa, Fiebre de Lassa; Junín, Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA); Machupo, Fiebre Hemorrágica Boliviana (FHB); Guanarito, Fiebre Hemorrágica Venezolana (FHV); y Sabiá, Fiebre Hemorrágica Brasileira (FHBr).

Por otro lado, durante el año 2008 se ha caracterizado el virus Dandenong, aislado a partir de un paciente transplantado, el cual presentó una alta homología a LCMV (Palacios *et al.*, 2008), aunque se encuentra en discusión si se trata de un nuevo virus o de una cepa del LCMV. También, el pasado año 2008 se reportó en Sudáfrica el brote de una enfermedad humana nosocomial con una alta tasa de mortalidad (80 %), y cuyo agente etiológico fue posteriormente caracterizado como un arenavirus. Este brote representó la primera emergencia de una fiebre hemorrágica arenaviral proveniente del Viejo Mundo luego de 30 años (Briese *et al.*, 2009). Este virus, recientemente incorporado a la lista de virus reconocidos por el ICTV, fue denominado virus LuJo cuyo nombre deriva de las ciudades más populosas de las repúblicas de Zambia y de Sudáfrica (Lusaka y Johannesburgo, respectivamente) de donde provinieron los primeros pacientes.

CLASIFICACIÓN FILOGENÉTICA

A partir de reacciones serológicas y considerando relaciones estructurales entre los distintos virus del grupo, se estableció la división de los miembros de la familia en dos serocomplejos: arenavirus del Viejo Mundo, aislados en África y Europa, y arenavirus del Nuevo Mundo, aislados en el continente americano (Buchmeier *et al.*, 1981; Rawls & Buchmeier, 1976; Murphy & Withfield, 1975; Pfau, 1974; Murphy *et al.*, 1970; Rowe *et al.*, 1970b; Murphy *et al.*, 1969; Dalton *et al.*, 1968). Esta clasificación es coincidente con la distribución geográfica de sus hospedadores, como se mencionó anteriormente.

Por otro lado Charrel *et al.*, (2008) han establecido un criterio unificado para la incorporación de un virus al género arenavirus como una nueva especie, el cual indica que se debe cumplir con la una combinación de dos o más de las siguientes características:

- a) las especies de los hospedadores (ó grupos de especies de hospedadores);
- b) la distribución geográfica definida para el virus;
- c) la enfermedad asociada a humanos;
- d) la reactividad antigénica cruzada con otros miembros del género, incluyendo la ausencia de neutralización cruzada cuando sea aplicable;
- e) la divergencia significativa de otras especies en el género a nivel de aminoácidos.

En la actualidad, y como ya se ha mencionado, esta familia viral cuenta con 24 especies virales reconocidas por el ICTV. En tanto, hay otras trece especies descriptas que aún no han sido evaluadas por el ICTV: Pampa, Río Carcarañá, Kodoko, Morogoro, Dandenong, Pinhal, Skinner Tank, Catarina, Tonto Creek, Big Brushy Tank, North American, Luna y Lunk. En el año 2008 una revisión realizada por Charrel *et al.* (2008) clasificó los virus descriptos hasta el momento según su filogenia en 2 grupos: el complejo Coriomeningitis Linfocitaria-Lassa (AVM) incluyendo los virus de la Coriomeningitis Linfocitaria (LCMV), Lassa (LASV), Ippy (IPPYV), Mobala (MOBV), Lujo (LUJV) y Mopeia (MOPV), y las especies más recientes Dandenong, Morogoro y Kodoko; y el complejo del Nuevo Mundo, donde encontramos a Allpahuayo (ALLV), Flexal (FLEV), Paraná (PARV), Pichindé (PICV), Pirital (PIRV), Amapari (AMAV), Cupixi (CPXV), Guanarito (GTOV), Junín (JUNV), Machupo (MACV), Sabiá (SABV), Tacaribe (TCRV), Latino (LATV) y Oliveros (OLVV) en América del Sur, y los virus Bear Canyon (BCNV), Tamiami (TAMV), Whitewater Arroyo (WWAV) en América del Norte. Además se agregaron las nuevas especies descriptas, las cuales se dividieron

entre estos dos subgrupos, formando parte del primero los virus Pinhal y Chapare, mientras que Catarina, Skinner Tank, Tonto Creek y Big Brushy Tank forman parte del segundo. Bowen y colaboradores propusieron una subclasificación de los arenavirus del Nuevo Mundo en tres linajes, denominados A, B y C (Bowen *et al.*, 1996). Aunque luego de observar que los segmentos S de los virus BCNV, TAMV y WWAV parecían ser el producto de la recombinación genética entre virus del linaje A, que aportarían el ORF de N, y virus del linaje B, que aportarían el ORF GPC, se agrupó a este conjunto de miembros dentro de un nuevo linaje, A/Rec (Archer & Rico-Hesse, 2002; Charrel *et al.*, 2002 y 2001) (figura 1.1).

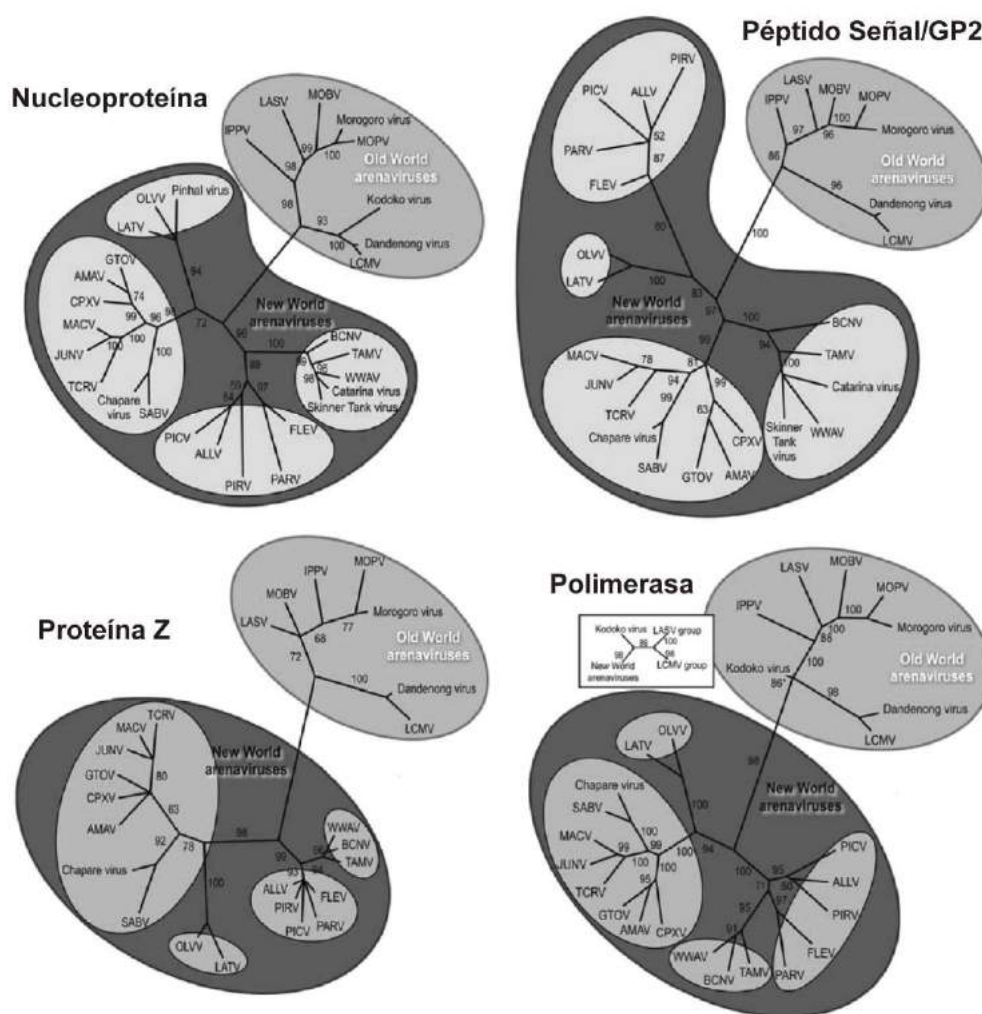


Figura 1.1. Estudio Filogenético realizado en base a la secuencia aminoacídica completa de la nucleoproteína, péptido señal/GP2, proteína Z y la polimerasa viral. Puede observarse que las nuevas especies descritas no se encuentran en todos los filogramas, debido a que no se cuenta con la secuencia genómica completa de los mismos. Figura extraída de Charrel *et al.* 2008

Los últimos reportes de nuevos arenavirus encontrados corresponden a Coulibaly–N'Golo y colaboradores (2011) quienes encontraron por RT-PRC dos nuevos posibles arenavirus nombrados Menekre (MENV) y Gbagroube (GBAV) hallados en los roedores *Hylomyscus* sp. y *Mus (Nannomys) setulosus*, respectivamente. Luego en 2012 Cajimat y colaboradores (2012) aislaron ARN arenaviral en roedores de la especie *Peromyscus mexicanus*, en el sur de México cerca del sitio de una epidemia de fiebre hemorrágica en 1967. El virus Ocozocoautla de Espinosa, como así se lo denominó, se asocia al grupo del Nuevo Mundo y aún no ha sido caracterizado.

Por otro lado, en agosto de 2012, se describió el aislamiento de dos nuevas especies virales a partir de boas mantenidas en cautiverio. Los aislamientos han sido completamente secuenciados (Números de acceso de *Genbank* JQ717261 a JQ717264) evidenciando una organización genómica idéntica a los miembros de la familia arenavirus, sin embargo los porcentajes de similitud de secuencia observados resultaron significativamente bajos (Stenglein *et al.* 2012). En particular, en este trabajo se señala la cercanía filogenética del ORF de las glicoproteínas con la familia viral *filoviridae*, junto con la ausencia de algunas características conservadas entre las proteínas Z de los arenavirus. En consecuencia, los autores de esta publicación proponen a los virus Golgen Gate (GGV) y California Academy of Science Virus (CASV) como potenciales miembros de la familia *Arenaviridae*, remarcando la importancia de incluir a las boas como posibles reservorios virales.

FIEBRES HEMORRÁGICAS ARENAVIRALES

Las fiebres hemorrágicas provocadas por arenavirus se caracterizan por el desarrollo de la enfermedad en fases bien diferenciadas (prodromal, neurológica-hemorrágica y convaleciente) (Enríz *et al.*, 2004), con un período corto de incubación, fiebre alta, dolor de cabeza, y un conjunto de síntomas específicos que dependerá del tipo de arenavirus que lleve a cabo la infección. El desarrollo de hemorragias y petequias suele ocurrir en pacientes infectados con la mayoría de los virus comunes que infectan a humanos. El sangrado diseminado en la piel, las membranas mucosas y órganos internos caracterizan a un pequeño número de infecciones, causadas frecuentemente por un grupo de virus exóticos presentes en diferentes nichos ecológicos alrededor del mundo. Los denominados virus causantes de fiebres hemorrágicas están ordenados en cuatro grandes grupos, debido principalmente a sus características biológicas (Craighead, 2000), uno de los cuales está constituido por los arenavirus.

FIEBRE HEMORRÁGICA ARGENTINA

La Fiebre Hemorrágica Argentina, cuyo agente etiológico es el virus Junín, es una enfermedad endémica caracterizada por alteraciones cardiovasculares, hematológicas, renales, inmunológicas y neurológicas. Desde el aislamiento del virus Junín, se ha podido realizar un seguimiento epidemiológico que ha demostrado la ocurrencia de brotes anuales de FHA sin interrupción, principalmente en los meses que corresponden a las estaciones de otoño e invierno. A su vez, la enfermedad posee una distribución focal que puede correlacionarse con la distribución geográfica de los roedores infectados.

La etiología viral de la infección fue establecida en 1958 por dos grupos en forma independiente (Pirotsky *et al.*, 1959; Parodi *et al.*, 1958). Ellos aislaron un agente viral a partir de sangre y órganos obtenidos por necropsias en el Hospital Regional de la ciudad de Junín, en la Provincia de Buenos Aires. Y fue por este hecho que el agente etiológico fue llamado virus Junín, como consecuencia del nombre de la ciudad en donde se efectuó su primer aislamiento.

Epidemiología de la FHA

Teniendo en cuenta la situación de la FHA, ya sea en cuanto a su incidencia como a su prevalencia, dentro del Programa Nacional de Control de la FHA se ha establecido un estricto programa de Vigilancia Epidemiológica, el cual contempla absolutamente todos los procedimientos a realizarse ante la aparición de un posible caso de FHA.

Según la ley de la República Argentina de notificación de Enfermedades Transmisibles N° 15.465, la FHA es de notificación obligatoria. De este modo, el sistema de vigilancia tiene la capacidad funcional para recopilar y analizar datos en forma sistemática y constante. Los informes correspondientes a las reuniones anuales se encuentran disponibles en la página web del INEVH (Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas, Dr. Julio I. Maiztegui) de modo de facilitar el acceso a los mismos para la planificación, ejecución y evaluación de actividades eficaces para la prevención y control.

En la **figura 2.1 A** se observa el porcentaje de casos fatales notificados y confirmados en el periodo 1958-2006, donde es evidente la significativa disminución de casos fatales a partir del año 1973, lo cual se correlaciona con el comienzo de la implementación del tratamiento con plasma inmune (o suero de paciente convalescente) como tratamiento específico para la FHA. A partir de 1991 se comienza a administrar la vacuna Candid#1, y si bien se observa en los años posteriores una disminución de la incidencia de la enfermedad, también se puede evidenciar un relativo incremento de los casos fatales. La **figura 2.1 B** muestra la efectividad de la aplicación de la vacuna, producida a solicitud del Ministerio de Salud de la Nación por el Instituto Salk de Swifwater (Pennsylvania, EEUU), mediante la campaña de vacunación iniciada en 1991. Durante la misma se procedió a administrar la vacuna bajo protocolo de uso compasivo a la población adulta de ambos sexos con mayor riesgo de adquirir la enfermedad. Hasta la fecha, más de 200.000 personas de ambos sexos procedentes de 206 localidades de las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires han recibido la vacuna. Los estudios en desarrollo continúan avalando la inocuidad, la inmunogenicidad y la eficacia de la misma para prevenir la FHA. A partir de agosto de 2006 la vacuna es producida en el Instituto Nacional de Estudios sobre Virosis Humanas, Julio I. Maiztegui, de Pergamino, y se incorporó al Programa Nacional de inmunizaciones (Decreto Presidencial N°48/07)

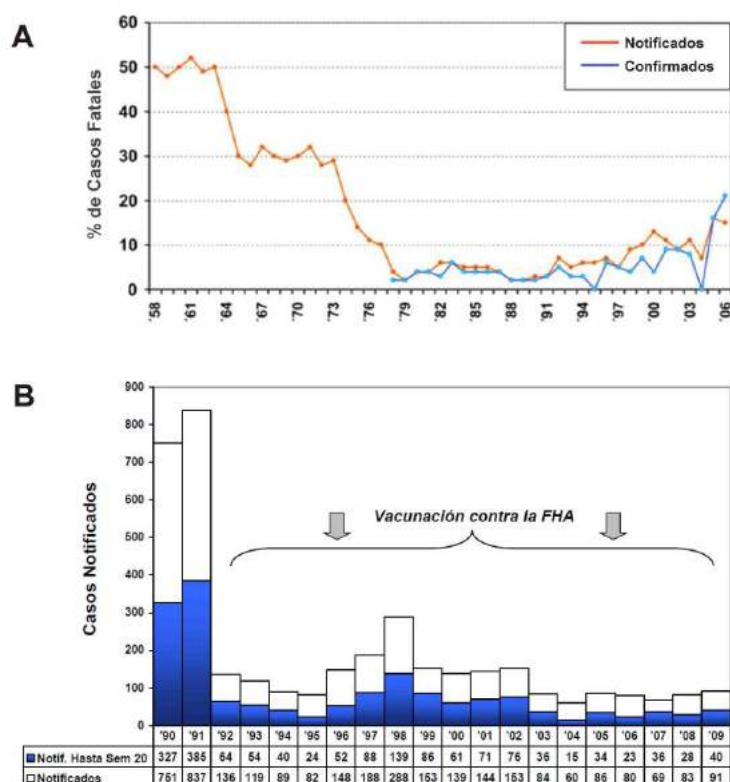


Figura 2.1. Análisis retrospectivo del porcentaje de casos fatales por FHA notificados y confirmados en el periodo 1958-2006 **(A)** y de los casos notificados hasta la semana 20 y los casos totales en el periodo 1991-2009 **(B)**. Figuras extraídas de Enría *et al.* 2008 y del XIV informe de la Reunión anual del Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica del año 2012, respectivamente.

Diagnóstico clínico

Como se señaló previamente, la enfermedad producida por el virus Junín puede dividirse en tres fases: prodromal, neurológica-hemorrágica, y convaleciente (Enría *et al.*, 2004). El diagnóstico de la FHA es primariamente establecido por examen clínico, análisis generales de laboratorio bioquímico y anamnesis del paciente. Los síntomas y signos iniciales de la FHA son similares a los de muchas otras enfermedades infecciosas. Durante la primera semana hay leucopenia y trombocitopenia progresiva, con conteos de alrededor de 1.000- 2.000 células blancas y 50.000-100.000 plaquetas por mm³. La tasa de sedimentación es normal o inferior. Hay proteinuria, y el sedimento urinario contiene precipitados granulares de hialina y glóbulos rojos. En sangre, se observa comúnmente un leve aumento de la actividad de las enzimas aspartato transaminasa (AST), creatinina fosfoquinasa (CPK) y lactato deshidrogenasa

(LDH). La creatinina sérica y la urea son generalmente normales, pero se ve un incremento en varios casos de deshidratación y shock. En tanto, durante la fase aguda, el fluido cerebroespinal (CSF) es normal, aún en pacientes con forma neurológica severa (Enría *et al.*, 2008). También, se ha descrito la presencia de un inhibidor de la agregación de plaquetas circulante (Cummins *et al.*, 1990) junto con niveles disminuidos de los factores de coagulación II, V, VII, VIII y X y de fibrinógeno. A pesar de ello, las alteraciones en las funciones de coagulación son menores.

Diagnóstico etiológico

La gran diversidad de formas en que se presenta la FHA, y la alta frecuencia de cuadros clínicos confusos, conduce a la necesidad de aplicar diferentes ensayos para el diagnóstico etiológico en los distintos momentos de la infección.

Los inmunoensayos son específicos, aunque su utilidad es limitada ya que la presencia de anticuerpos es detectada tardíamente durante la convalecencia. En efecto, y aunque la conversión serológica ocurre en general después del primer mes, su detección se utiliza como un ensayo definitivo recién a los 60-90 días después de la internación del paciente y sólo con el fin de confirmar el diagnóstico etiológico de FHA. El ensayo se realiza por las técnicas de ELISA (Barrera Oro *et al.*, 1990; Meegan *et al.*, 1986), inmunofluorescencia indirecta o de neutralización (Webb *et al.*, 1969).

Es importante tener en cuenta que las manipulaciones con virus Junín, ya sea para su detección o para la obtención de antígenos virales para los ensayos serológicos, poseen una complicación adicional, dado que requiere la utilización de condiciones de seguridad especiales. Estas condiciones fueron establecidas por *The Subcommittee on Arbovirus Laboratory Safety of the American Committee on Arthropod-Borne viruses* (1980), y en Sewell (1995), y determinan la utilización de un laboratorio de bioseguridad de nivel BSL3 o BSL4 dependiendo de la patogenicidad de la cepa.

Por ambos motivos, la disponibilidad de ensayos que permitan la detección temprana, rápida y eficaz de FHA es de vital importancia, para poder aplicar la terapia con el menor riesgo posible, evitando el consumo innecesario del escaso plasma disponible (Lozano *et al.*, 1993). Hasta la actualidad, el único ensayo de diagnóstico que cuenta con validación clínica y que puede ser aplicado a la detección de virus Junín en la ventana inicial de la infección (1 a 10 días), cuando puede ser aplicada una terapia temprana y efectiva, es el ensayo de RT-PCR que utiliza *primers* dirigidos contra las regiones 5' de los ORFs de N y GPC (Lozano *et al.*, 1993 y 1995). Sin embargo, actualmente existen ensayos de detección de FHA mediante la técnica de inmunodetección. Estos ensayos están basados en la obtención de proteínas virales a

partir del lisado de células de mamífero en cultivo, infectadas con JUNV, lo que requiere de instalaciones de alto nivel de bioseguridad. Por este motivo, Ure y colaboradores describieron la producción de proteínas virales de JUNV en células de insecto, para ser utilizadas en los ensayos de ELISA, en lugar de los lisados celulares infectados (Ure *et al.*, 2008). Un enfoque similar fue abordado por un grupo de investigación de Brasil en colaboración con Argentina, donde la producción de la nucleoproteína viral de JUNV en células de insecto fue empleada para ensayos de ELISA, los cuales se utilizaron para realizar un control epidemiológico (por presencia de Inmunoglobulinas de tipo G, IgG) de infecciones por arnavirus en el territorio del Mato Grosso en Brasil (Machado *et al.*, 2010). Como una alternativa a la producción de antígenos, Nakauchi y colaboradores (2009) describieron la producción de anticuerpos monoclonales de la nucleoproteína viral para el desarrollo de ensayos de ELISA de captura. Estos serían de utilidad en la detección de antígenos durante la fase aguda de la infección con el virus Junín.

En el caso de otras fiebres hemorrágicas, como LCMV, se han desarrollado ensayos de diagnóstico basados en RT-PCR en tiempo real, para ser utilizados sobre fluido cefalico (Cordey *et al.*, 2011). Y recientemente se ha descrito la titulación viral de LCMV mediante Citometría de flujo, como una alternativa más sensible y más rápida que la clásica titulación por el método de formación de placas de lisis (Korns Johnson *et al.*, 2012). Por último, un grupo de investigación de Alemania, con experiencia en la detección de LASV por RT-PCR (Olschlager *et al.*, 2010), describió un ensayo dual a partir del cual es posible la detección de la infección por el virus Lassa junto con la identificación de la cepa viral. Este consiste en el ensayo de RT-PCR para la región codificante de la glicoproteína viral, previamente optimizado en el año 2010, sumado a la hibridación con un *array* de 47 oligonucleótidos de 50 nt, los cuales permiten la identificación de la cepa (Olschlager *et al.*, 2012). Este tipo de ensayos permiten combinar la sensibilidad y rapidez de la RT-PCR, con la especificidad e identidad de secuencia obtenidas a partir de los ensayos de hibridación.

Tratamiento

La respuesta inmune contra el virus Junín puede ser muy efectiva en la eliminación del patógeno durante la enfermedad aguda, y además puede ser suficiente para proteger contra futuras infecciones (de Bracco *et al.*, 1978; Cossio *et al.*, 1975). Los anticuerpos detectados en pacientes que comienzan a recuperarse después de una infección aguda son principalmente del tipo neutralizantes. Por otra parte, aunque se

ha mostrado alguna evidencia en humanos de respuesta inmune mediada por células, su rol en la eliminación del virus y en la protección subsiguiente es desconocido.

En la década del 70 del siglo pasado, se realizaron importantes avances en el tratamiento de la FHA. Por ejemplo, los resultados de los estudios originales sobre la utilización de la administración pasiva de anticuerpos como terapia para la infección de virus Machupo en primates, sugirieron que esta terapia podría tener éxito en humanos, tanto para el tratamiento de FHA como de FHB (Eddy *et al.*, 1975). Poco tiempo después, un ensayo realizado sobre un muestreo estadístico de pacientes de FHA en el Instituto Nacional de Estudios sobre Virosis Humanas en Pergamino, estableció la eficacia de la administración de plasma de la fase convaleciente como tratamiento para la FHA. De hecho, esta terapia redujo drásticamente la tasa de mortalidad de 30% hasta menos de un 1% sólo cuando fue aplicada previamente al octavo día desde el comienzo de la infección (Maiztegui *et al.*, 1979).

Hasta el momento, la administración de plasma inmune obtenido de pacientes que han sobrevivido a la infección por virus Junín se ha convertido en la única terapia efectiva contra la FHA. Sin embargo, esta mejora no se logró sin un costo, ya que 10% de los pacientes tratados de esta manera desarrollaron el síndrome neurológico tardío (Enríz *et al.*, 1986). Este síndrome no ha sido observado en pacientes no tratados, y hasta el momento no ha podido detectarse la presencia de virus Junín en preparaciones de líquido cefalorraquídeo de los pacientes afectados. Además, la terapia conlleva otro riesgo que consiste en la posible transmisión al paciente de algún agente infeccioso transportado por sangre. Esto hace imprescindible el ensayo del plasma utilizado para la detección de agentes infecciosos, como el virus de la hepatitis, el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) y el parásito *Trypanosoma cruzi*.

Antivirales

Actualmente existe una activa búsqueda de moléculas antivirales para el tratamiento de las Fiebres Hemorrágicas Arenavirales. Un ejemplo de esto fue el proyecto VIZIER (*Viral enZymes InvolvEd in Replication*, <http://www.vizier-europe.org>) el cual fue creado con el objetivo de identificar nuevos blancos terapéuticos contra los virus de ARN más relevantes, a través de la caracterización estructural de la maquinaria de replicación de los mismos. En el marco de este proyecto se han estudiado las estructuras cristalinas de las enzimas virales más conservadas implicadas en la maquinaria de replicación, las cuales constituyen un atractivo blanco para el diseño de drogas (Coutard *et al.*, 2008)

Por otro lado, mediante el desarrollo de los sistemas de genética reversa de los arenavirus (LCMV, Lee *et al.*, 2000; LASV, Hass *et al.*, 2004; PICV, Lan *et al.*, 2009; TACV, Jacamo *et al.*, 2003; JUNV, Albarino *et al.*, 2009) se han estudiado y evaluado numerosos componentes para potencial uso como antivirales, los cuales se encuentran revisados en detalle por Emonet *et al.* (2011).

Más adelante, en el Capítulo 3 se detallarán algunos de los compuestos más relevantes detallando su blanco de acción en el apartado de las proteínas virales de los arenavirus.

Generación de la vacuna Candid#1

Con respecto a la prevención de la enfermedad, los intentos para obtener una vacuna contra la FHA se habían iniciado en el año 1959, siguiendo principalmente dos líneas: la de vacunas inactivadas y la de vacunas a virus vivos atenuados. Entre todas las iniciativas, se pueden mencionar dentro del primer grupo al virus Junín completo inactivado con formol, o tratado con luz y colorantes, o en su versión incompleta. En tanto, dentro de las vacunas a virus vivos atenuados se ensayaron virus heterólogos, como el virus Tacaribe u homólogos, como las cepas del virus Junín XJ#0, XJC#13, y la cepa Candid#1 (Ambrosio *et al.*, 2006). Finalmente, la vacuna a virus vivo atenuado utilizada se denominó Candid#1, y fue desarrollada mediante un proyecto de colaboración entre el Ministerio de Salud Pública de la República Argentina y los laboratorios de USAMRIID (*United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases*, Fort Detrick, Frederick, MD) en Maryland, Estados Unidos (Barrera Oro & Eddy, 1982).

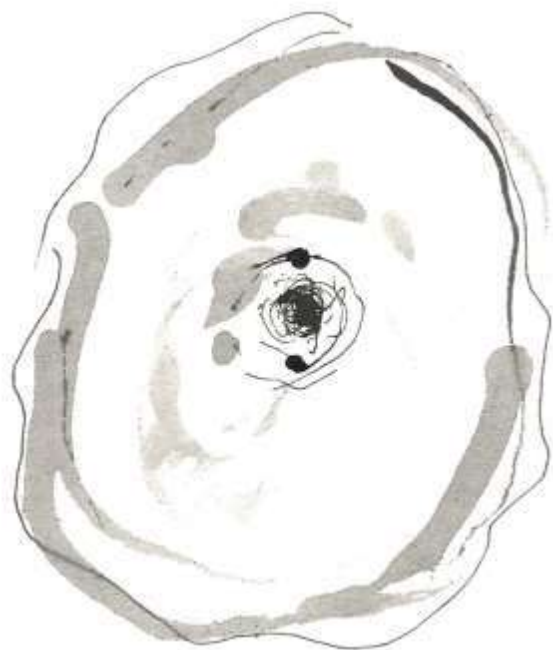
La cepa Candid#1 deriva de una cepa del virus Junín con características muy virulentas, denominada XJ (Parodi) aislada en 1958 en la ciudad bonaerense de Junín, a partir de un paciente con Fiebre Hemorrágica Argentina (Parodi *et al.*, 1958). Este aislamiento fue pasado 2 veces por cobayo y 11 veces por cerebro de ratón en el laboratorio del Dr. Parodi (Buenos Aires, BA). En 1959, la cepa XJ fue enviada al Dr. J. Casals (*Rockefeller Foundation*, New York, NY) y, posteriormente, fueron realizados varios pasajes por cerebro de ratón en el laboratorio *Yale Arbovirus Research Unit* (New Haven, CT). De acuerdo a ello, el pasaje 43 fue recibido en el laboratorio de USAMRIID en 1979, y amplificado mediante un pasaje por cerebro de ratón, dando origen a la cepa XJ#44. Este homogeneizado de cerebro fue utilizado para infectar una línea celular diploide, derivada de pulmón de feto de mono Rhesus (FRhL-2, *fetal rhesus lung diploid cells*), realizando en ellas varios pasajes.

Como resultado de esta colaboración entre instituciones argentinas y estadounidenses, se obtuvo una cepa de virus Junín llamada Candid#1, con un alto grado de atenuación (Peters *et al.*, 1987; Barrera Oro & Eddy, 1982). Luego de rigurosos controles biológicos en monos Rhesus (McKee *et al.*, 1984, 1985), la cepa Candid#1 fue utilizada en voluntarios humanos y, a continuación, se realizó un ensayo clínico extensivo en el área endémica de FHA (Maiztegui *et al.*, 1987).

La cepa atenuada vacunal mostró la ausencia de efectos adversos en primates sin evidencia de persistencia viral, y aprobó de forma adecuada las pruebas en humanos realizadas en EEUU. La mitad de la Semilla Maestra y de la Semilla Secundaria o Semilla de Trabajo de la cepa vacunal Candid#1 fueron cedidas a la República Argentina a la custodia del INEVH en diciembre de 1983, cumpliendo de este modo con los acuerdos firmados al inicio del convenio internacional en el año 1979 (Ambrosio *et al.*, 2006).

Si bien la vacuna Candid#1 es la primera vacuna contra una fiebre hemorrágica derivada de una infección arenaviral, actualmente una cepa viral atenuada del virus Lassa se encuentra en estudio. En el año 2005 se aisló una cepa viral derivada de una biblioteca de recombinantes de LASV/MOPV la cual contiene el segmento S de LASV y el segmento L de MOPV, denominada ML29 (Lukasceovich *et al.*, 2005). Esta cepa evidenció ser atenuada en cobayos y primates no humanos. En el año 2007 Carrion y colaboradores confirmaron la protectividad de esta cepa en cobayos, mientras que recientemente, durante el corriente año, Zapata y colaboradores mediante estudios en macacos Rhesus, confirmaron que la cepa atenuada ML29 es un muy buen candidato para una vacuna atenuada para la fiebre de Lassa (Carrion *et al.*, 2007; Zapata *et al.*, 2013).

Actualmente se evalúan otras estrategias vacunales, además de las cepas atenuadas. Rodriguez-Carreño y colaboradores lograron evidenciar respuesta celular tipo CD8 en ratones inoculados con un plásmido conteniendo la secuencia completa de la nucleoproteína de LASV. Además, esta estrategia demostró ser protectora contra LASV y PICV (Rodriguez-Carreño *et al.*, 2005). Por otro lado, se han evaluado estrategias basadas en partículas tipo virales o *Virus-like particles* (VLPs) de virus heterólogos exponiendo la glicoproteína arenaviral o fragmentos de la misma (Geisbert *et al.*, 2005; Mazeike *et al.*, 2012; Branco *et al.*, 2010), las cuales demostraron ser protectoras en primates no humanos y ratones.



FIEBRE HEMORRÁGICA ARGENTINA

CAPÍTULO 2

CARACTERÍSTICAS DE LOS VIRIONES

Ultraestructura

Las partículas virales de la familia arenavirus son de forma variable, con un diámetro aproximado de 50 a 300 nm (Murphy & Whitfield, 1975; Gschwender *et al.*, 1975; Ofodile *et al.*, 1973; Speir *et al.*, 1970; Murphy *et al.*, 1969 y 1970; Dalton *et al.*, 1968). En general, las partículas más pequeñas son de forma esférica, mientras que la de mayor tamaño son pleomórficas.

A partir de microscopías electrónicas de transmisión (TEM) se ha logrado observar viriones recubiertos por una unidad de membrana electrodensa que contiene proyecciones externas en su superficie. Estas proyecciones se encuentran dispersas en la envoltura y, cuando se observan preparaciones por tinción negativa, tienen estructura claviforme. El interior de los viriones aparece formado por una materia amorfa constituida principalmente por el citoplasma celular junto con una cantidad variable de estructuras electrodensas de 20-25 nm de diámetro, las cuales dan el aspecto “arenoso” a las partículas, dando origen al nombre de la familia viral. En la literatura se ha propuesto repetidas veces que estos gránulos corresponden a ribosomas celulares encapsidados al momento de la brotación viral de manera inespecífica. Si bien la capacidad traduccional de estos ribosomas fue demostrada en sistemas *in vitro* (Chinault *et al.*, 1981; Buchmeier *et al.*, 1981; Giménez & Compans, 1980), la función de los mismos en el virión es desconocida.

En general, no suelen observarse otros detalles estructurales dentro de los viriones, salvo cuando después de la ruptura de la envoltura lipídica es posible observar estructuras circulares en forma de collares de perlas que corresponden a las nucleocápsides, constituidas por las nucleoproteínas y el ARN genómico viral (Palmer *et al.*, 1977).

Estructura molecular

Como ya se mencionó previamente, la partícula viral posee una envoltura lipídica y un genoma constituido por dos especies de ARN que codifican para las proteínas virales. La envoltura lipídica posee dos glicoproteínas virales (G1 y G2) junto al péptido señal y algunas escasas proteínas celulares presentes al momento de la brotación viral (figura 3.1). Localizadas en el interior del virión se encuentran las otras proteínas de los arenavirus, como la mayoritaria N, la cual está asociada a los ARNs virales formando las nucleocápsides. Además, pueden observarse en cantidades minoritarias otros dos polipéptidos, la ARN polimerasa (L) y la proteína Z. Junto con estas

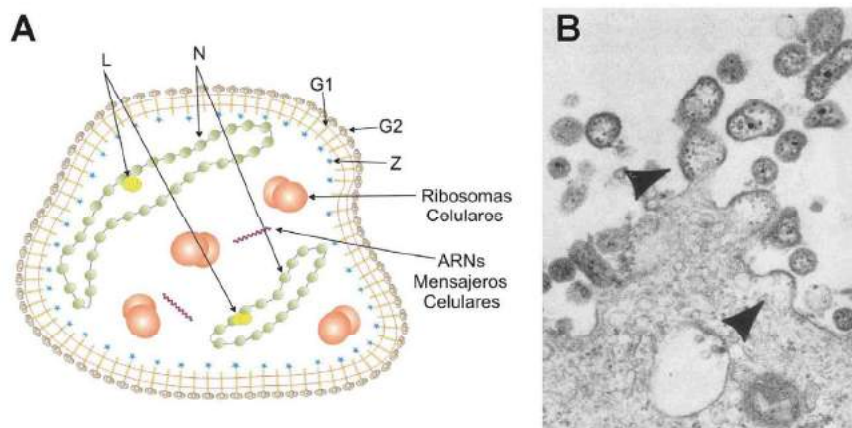


Figura 3.1 A. Esquema de la estructura del virión. La envoltura lipídica se encuentra representada por la doble línea roja, recubierta por las glicoproteínas G1 y G2 en la superficie extracelular y por la proteína Z, en la superficie interior. Dentro del virión se encuentran las nucleocápsides circulares en forma de collar de perlas, las cuales se encuentran asociadas a la proteína L, junto con el ARNm y ribosomas celulares. **B.** Microscopía electrónica de transmisión de un célula infectada con el virus Paraná, donde se observa el proceso de brotación desde la membrana plasmática. Aumento x45000 (Murphy *et al.*, 1970).

proteínas, se suelen encapsidar ribonucleoproteínas celulares y algunos ARNm celulares y/o virales.

Los ARNs virales poseen cuatro marcos de lectura abiertos, dos en cada ARN, y en ambos casos, los mismos están en sentidos opuestos, lo que resulta en una doble polaridad del ARN clasificado como ambisentido (*ambisense*) (Auperin *et al.*, 1984b). En el ARN S se encuentran los marcos de lectura para las proteínas estructurales del virión, la proteína N y el precursor de las glicoproteínas (GPC), que luego es procesado proteolíticamente durante el ciclo replicativo viral para producir las dos glicoproteínas de la envoltura del virión (G1 y G2) y el péptido señal. En tanto, en el ARN L se encuentran los marcos de lectura para la ARN polimerasa ARN dependiente, o proteína L, y para la proteína Z (figura 3.2).

Estos genomas arenavirales presentan gran cantidad de estructura secundaria y terciaria, las cuales desempeñan un rol regulatorio esencial durante la traducción, replicación, y ensamblaje de las partículas virales (Álvarez *et al.*, 2005). De hecho, la región intergénica de ambos fragmentos genómicos da lugar a la formación de una estructura en horquilla o “*hairpin loop*”, la cual se postula que posee un importante rol en la regulación del pasaje entre la transcripción génica y la replicación del genoma viral (Tortorici *et al.*, 2001a). Además, los extremos no codificantes del genoma poseen

regiones complementarias, las cuales se hipotetiza podrían dar lugar a la formación de una estructura en mango de sartén o *panhandle*, aunque aún no se ha logrado confirmar esta hipótesis de manera experimental.

Morfogénesis

La envoltura de las partículas virales es obtenida a partir de la membrana plasmática de la célula hospedadora, en el lugar donde ocurre el proceso de brotación. Este sitio está caracterizado por la presencia de microdominios del complejo GPC de aproximadamente 120 a 160 nm. Para muchos de los virus de ARN envueltos, el proceso de brotación ocurre a partir de microdominios llamados balsas lipídicas (*lipid rafts*). Estos microdominios se caracterizan por ser ricos en moléculas de colesterol y resistentes a la solubilización en detergentes no iónicos. En el caso del virus Junín se ha demostrado que los microdominios de GPC no están asociados a *lipid rafts*, siendo esto una característica no convencional de los arenavirus (Agnihothram *et al.*, 2009). Estos parches de GPC en la superficie de la célula, además de direccionar el sitio de ensamblaje, son capaces de producir la curvatura de la membrana plasmática, que luego junto con la proteína Z, impulsarán la brotación del virión naciente (Schlie *et al.*, 2010).

ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DEL GENOMA VIRAL

Genoma viral

Los arenavirus poseen un genoma segmentado, formado por dos tipos de ARN de cadena simple (figura 3.2). Estas especies presentan tamaños diferentes, siendo el ARN de menor tamaño denominado S (por *small*) y el de mayor tamaño denominado L (por *large*). El ARN S, tiene aproximadamente 3.500 nucleótidos de longitud y un coeficiente de sedimentación de 22 a 25 S, mientras que el ARN L posee 7.000 a 7.500 nucleótidos, con un coeficiente de sedimentación de 31 a 37 S.

Para que el virión sea infectivo, debe contener al menos una hebra de cada tipo viral, es decir una molécula del ARN S y otra del ARN L. Experimentalmente se ha comprobado la formación de partículas virales con dotaciones genómicas diversas, como la diploidía para el segmento S (Romanowski & Bishop, 1983). Además, como se mencionó previamente, se ha detectado la presencia de otras moléculas de ARN que acompañan el genoma, como los ARN ribosomales o ARN mensajeros.

Estrategia de codificación

Los segmentos S y L del genoma arenaviral presentan una alta proporción de secuencia codificante, con presencia de regiones no codificantes en los extremos del genoma y en las regiones intergénicas entre los ORFs de polaridad opuesta (**figura 3.2**).

Particularmente, en el extremo 3' de los ARNs genómicos se halla una secuencia de 19 nucleótidos extremadamente conservada en todos los arenavirus conocidos denominada región Arena (3' GCGUGUCACCUAGGAUCCG 5', [Auperin et al., 1982a y b](#)), la cual se cree que podría tener importancia en el reconocimiento de los ARNs por la ARN polimerasa en el inicio de la replicación. Además, esta región es complementaria con la secuencia de las primeras bases del extremo 5', lo que podría dar origen a una estructura de asa de sartén (*panhandle*).

El ciclo de los arenavirus ocurre exclusivamente en el citoplasma de la célula hospedadora, incluyendo el proceso de transcripción y replicación viral. Particularmente, un trabajo reciente del grupo de investigación de York y Numberg demostró para los virus Tacaribe y Junín, que el proceso de síntesis de ARN viral se localiza en complejos de replicación-transcripción asociados a membranas celulares, los cuales contienen las formas genómicas y antigenómicas completas junto con proteínas celulares involucradas en el metabolismo del ARNm y otros factores traduccionales ([Baird et al., 2012](#)).

Los ARN genómicos virales no pueden ser usados como ARNm. Por ello, para que el virus sea infectivo y logre transcribir su genoma, debe imperativamente contener al menos una molécula de la polimerasa viral dentro del virión. De esta manera los ARNm de las proteínas N y L son transcritos por la polimerasa viral a partir del extremo 3' del ARN genómico S ó L, respectivamente. Una vez producidas las proteínas N y L, es posible obtener los ARNs virales antigenómicos de longitud completa, que son las formas replicativas del genoma viral. Posteriormente, los ARNm de GPC y Z son transcritos a partir del extremo 3' del ARN viral antigenómico S o L, respectivamente. Hasta el presente, no se ha podido probar que los genes codificados en la región 5' de los ARNs virales (genómicos o antigenómicos) de longitud completa se traduzcan a partir de estas formas directamente (**figura 3.2**).

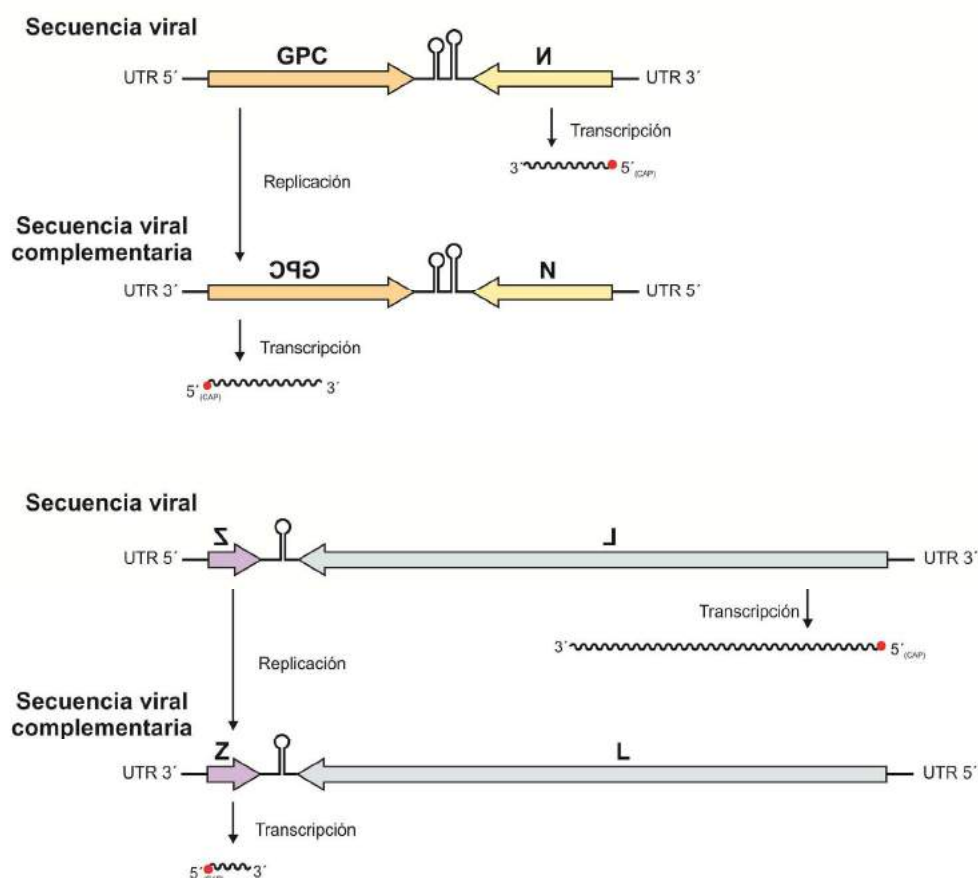


Figura 3.2 Estrategia de organización y codificación del genoma de los arenavirus. Ambos segmentos genómicos (S y L) se encuentran esquematizados, y se indican los marcos de lectura abiertos en la polaridad correspondiente. Los ARN mensajeros, los cuales contienen una estructura de CAP en su extremo 5', se producen a partir de las secuencias virales y virales complementarias de cada segmento.

La obtención del ARNm de N y L, como resultado de la transcripción viral o la obtención del ARN antígenómico de longitud completa, como intermediario de la replicación, es un fenómeno regulado en el que la estructura de las regiones intragénicas de cada uno de los ARNs genómicos, y la presencia de algunas de las proteínas virales, juegan un rol central. Como ya se mencionó, la región intergénica no codificante posee la capacidad de formar una estructura secundaria muy estable en forma de horquilla, la que podría ser responsable de esta regulación, actuando como terminador de la transcripción (Ghiringhelli *et al.*, 1991; Iapalucci *et al.*, 1991; Rivera Pomar *et al.*, 1991; Franze Fernández *et al.*, 1987; Romanowski *et al.*, 1985). En este modelo, basado en experimentos *in vivo*, se propuso que el cambio de la transcripción del ARNm a la replicación de la hebra antígenómica ocurre mediante la relajación de

esta región intergénica, a partir de la interacción con la proteína N de forma dependiente de su concentración (Tortorici *et al.*, 2001b). Años después, Pinschewer *et al.* (2003) utilizando un modelo replicativo *in vitro*, sugirieron que los niveles de expresión de N no eran suficientemente significativos como para controlar los procesos de transcripción/replicación. Hasta la fecha, aún no se han confirmado los factores responsables de la regulación de estos procesos, lo que aún hoy demanda su estudio.

PROTEÍNAS VIRALES

El genoma arenaviral codifica para cuatro marcos de lectura abiertos. Estos cuatro ORFs dan origen al complejo GPC y a las tres proteínas virales, la nucleoproteína, la proteína L y la proteína Z. Las mismas serán analizadas a continuación.

Precursor de las Glicoproteínas

La glicoproteína de los arenavirus se expresa como un único precursor polipeptídico y genera las glicoproteínas G1 y G2 a partir de su procesamiento proteolítico. En consecuencia estos péptidos se encuentran en cantidades equimolares en el virión y se sitúan como proteínas de superficie. Estas fueron observables al microscopio electrónico como espículas claviformes de 5 a 10 nm en la membrana (Lascano & Berria, 1974; Neuman *et al.*, 2005). G1 es una proteína periférica, mientras que G2 es transmembrana. El precursor de las glicoproteínas (GPC) es un polipéptido que para el virus Junín, en su forma no glicosilada, tiene aproximadamente 56 kDa. Para LCM, dentro de esta secuencia se establecieron tres regiones definidas: el péptido señal, desde el aminoácido 1 al 58; la glicoproteína G1, desde el aminoácido 59 al 247; y la glicoproteína G2, desde el aminoácido 248 al 485 (Buchmeier & Oldstone, 1979; York *et al.*, 2004) (figura 3.3).

El precursor GPC es direccionado a membrana a través del péptido señal presente en su secuencia. Una vez allí, el procesamiento proteolítico se produce de manera ordenada, en dos eventos independientes, y mediado por dos enzimas celulares diferentes. En un primer paso, el péptido señal es separado por acción de la peptidasa señal celular, antes de que el polipéptido deje el retículo endoplasmático. El fragmento separado (péptido señal, SSP) es miristoilado (York *et al.*, 2004) y el precursor de las glicoproteínas se ancla a membrana. El segundo clivaje ocurre entre el Golgi medio y el trans-Golgi mediante la subtilasa SKI-1/S1P, generando así las proteínas G1 y G2 (Beyer *et al.*, 2003; Lenz *et al.*, 2001). Estas se asocian en trímeros, los cuales

permanecen unidos de manera no covalente, junto con el SSP. Esto último, conforma el complejo GPC de los arenavirus, el cual posee la particularidad de mantener unido al péptido señal como una tercer subunidad fundamental para la maduración del complejo.

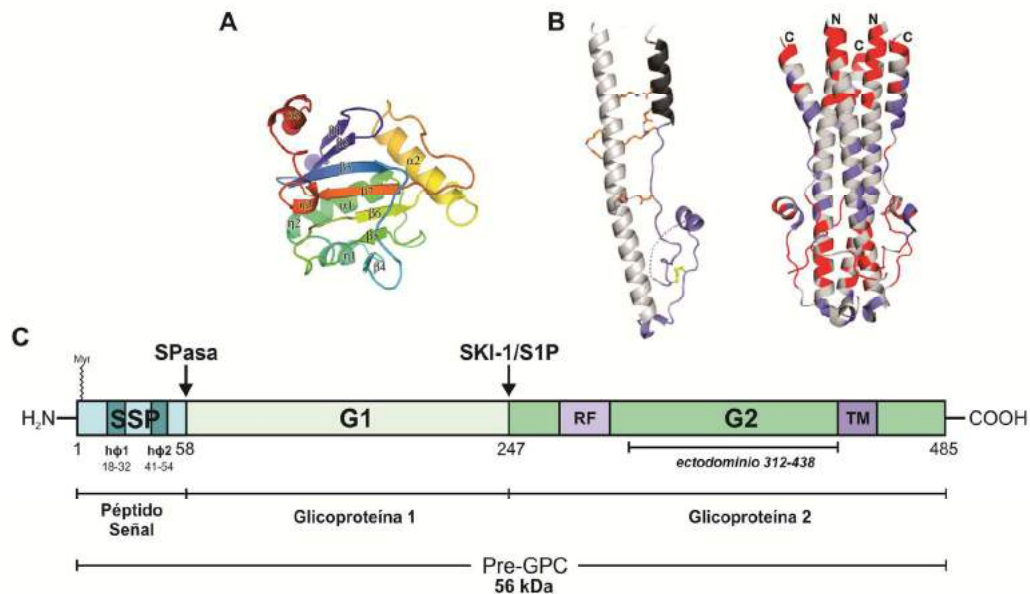


Figura 3.3. Esquema de la secuencia protéica del precursor de las glicoproteínas. A. Estructura cristalográfica de la glicoproteína 1 del virus Machupo (residuos 87 a 257) expresada en células de mamífero 293T. Figura adaptada de [Bowden et al. 2009](#) **B.** Estructura cristalográfica del ectodominio de la glicoproteína 2 del virus LCM (residuos 312 a 438) expresada en *E.coli*, en su forma monomérica, y a la derecha el trímero formado por GP2. Figura adaptada de [Igonet et al. 2011](#). **C.** La barra horizontal representa la secuencia protéica del precursor de las glicoproteínas. Con una flecha vertical en la parte superior de la barra, se señalan los sitios de corte de las enzimas celulares que procesan a GPC (SPase; *Signal peptidase*, SKI-1/S1P; *Subtilisin-like kexin protease-1/site-1-prptease*). El péptido señal (SSP) contiene dos regiones hidrofóbicas ($h\phi 1$ y $h\phi 2$), las cuales atraviesan la membrana lipídica, y el sitio de miristoilación en la glicina 2. G1 corresponde al péptido señalado desde el residuo 59 a 247. La G2 (248-485) está dividida en tres partes principales, el dominio N-terminal que constituye la parte exterior que interacciona con G1, y en donde se encuentra la región fusogénica (RF), el dominio hidrofóbico que está insertado en la membrana (TM), y el dominio C-terminal interior o intracelular (IC).

Péptido Señal

El péptido señal de los arenavirus posee numerosas características que lo hacen único; en particular su larga vida media observada ($T_{1/2}$ 6 hs) (Froeschke *et al.*, 2003), la participación en el complejo glicoprotéico, la miristoilación del mismo en su extremo N-Terminal y la posibilidad de ser expresado independientemente del precursor de G1 y G2. Si bien se han propuesto numerosas topologías para el SSP, la más aceptada corresponde a la conformación transmembrana, a través de dos regiones separadas por un *loop* extracelular, y ambos dominios terminales localizados en el interior celular (Agnihothram *et al.*, 2007) (figura 3.4). Además, posee una cisteína en la posición 57, la cual coordina un átomo de Zn con dos Cys y una Hys de GP2, formando una estructura de *Zinc finger* intermolecular junto con GP2. Se hipotetiza que esta interacción podría retener al SSP dentro del complejo GPC, como se demostró por RMN (Resonancia Magnética Nuclear) para el virus Junín. (Briknarova *et al.*, 2011; York & Nunberg, 2007)

Glicoproteínas G1 y G2

La proteína G1 es completamente extracelular, mientras que G2 presenta en un ectodominio, un dominio transmembrana y un endodominio. El extremo amino terminal de G2, correspondiente al ectodominio, contiene el dominio de interacción con G1, que a su vez comprende a la región fusogénica (RF); en tanto, en el extremo carboxilo terminal se encuentra la región hidrofóbica que conforma el dominio transmembrana (TM) y el endodominio o dominio intracelular (IC) (figura 3.3). En esta región hay 3 histidinas y una cisteína que coordinan un átomo de Zn, que junto con la cisteína de la posición 57 del SSP forman una estructura de dedo de Zinc (*Zinc finger*) intersubunidad. En la figura 3.4 se muestra un esquema del complejo GPC maduro, con las características anteriormente mencionadas, en base a las estructuras calculadas por Igonet *et al.* (2011) y Bowden *et al.* (2009).

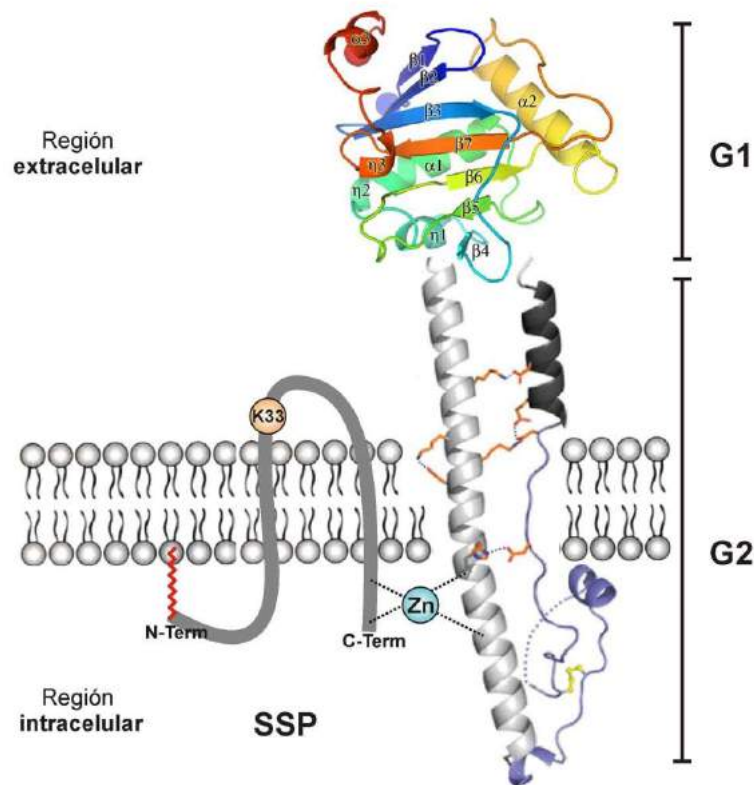


Figura 3.4. Interacción entre las subunidades del complejo GPC de los arenavirus. En la secuencia del péptido señal (SSP) se indica la miristoilación de la Glicina 2 (línea roja), la lisina de la posición 33 y la coordinación de un átomo de Zn junto con la porción interna de Glicoproteína 2 (G2). Esta última se localiza como una proteína transmembrana con un dominio intracelular y otro extracelular, el cual interacciona con la Glicoproteína 1 (G1). Si bien en este esquema las proteínas G1 y G2 se muestran como monómeros, la topología fisiológica corresponde a la formación de trímeros en ambos casos, donde el trímero de G1 interacciona de manera no covalente con el trímero de G2 (Eschli *et al.*, 2006). Esta simplificación permite una mejor visualización del modelo.

Unión al receptor y entrada viral

El complejo GPC está implicado en el reconocimiento del receptor celular, mediando la entrada del virus a través de un proceso de fusión de membranas, luego del cual se deposita el contenido del virión en el citoplasma. Los arenavirus del Viejo Mundo y los del clado C del Nuevo Mundo, ingresan en la célula a través de la unión al receptor de α -dystroglicano (α DG) (Cao *et al.*, 1998; Spiropoulou *et al.*, 2002), mientras que los miembros de los clados A y B del Nuevo Mundo utilizan el receptor de transferrina (TfR1) (Abraham *et al.*, 2010; Radoshitzky *et al.*, 2007). En el trabajo de Abraham y

colaboradores lograron obtener el cristal de GP1 de Machupo acomplejado con el ectodominio del receptor de transferrina humano. A partir de estos datos lograron mostrar los residuos esenciales para la interacción de G1 con la porción apical del receptor de transferrina. Por otro lado, se ha descrito recientemente que los miembros Axl, Tyro3 (de la familia TAM), DC-SIGN y LSECtin son capaces de funcionar como receptores alternativos para el virus Lassa (Shimojima *et al.*, 2012a y b).

Una vez que G1 se une al receptor, el virión es endocitado y luego de la maduración del endosoma, la cual conlleva una disminución del pH, se activa el mecanismo de fusión de membranas. En el caso de los miembros de los clados A y B, los cuales utilizan el receptor de transferrina, se ha demostrado que la internalización del virión ocurre mediante la endocitosis dependiente de clatrina e independiente de caveolina (Martinez *et al.*, 2007). Sin embargo para los virus que utilizan el receptor de α DG la entrada viral parece ser independiente de clatrina, caveolina, dinamina y actina. Pasqual y colaboradores publicaron en el año 2011 un modelo donde los virus del Viejo Mundo y del clado C del Nuevo Mundo realizan la entrada viral a través de la vía de cuerpos multivesiculares (MVBs), utilizando los componentes del complejo ESCRT (Hrs, Tsg101, VPs22 y Vps24) (Pasqual *et al.*, 2011). En este modelo se propone que luego de la endocitosis del receptor unido al virión, el endosoma es transportado hacia los cuerpos multivesiculares a través del sistema de microtúbulos. Una vez allí, el complejo virus-receptor es capaz de formar parte de vesículas intraluminales (ILVs) dentro de los MVBs, las cuales dependen de la presencia de fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3P) y del ácido lisobifosfatídico (LBPA). Por último, los virus presentes en la membrana de ILVs o MVBs son llevados hacia los endosomas tardíos, donde la disminución de pH activa la fusión de membranas, un proceso que según los autores, podría estar emulando la vía natural asociada a la endocitosis y degradación del receptor α -DG.

La activación del mecanismo de fusión comienza cuando el pH local disminuye aproximadamente a 5 unidades, y según estudios de mutagénesis el censo del pH se encuentra principalmente a cargo de la lisina 33, ubicada en el bucle extracelular del péptido señal (York & Nunberg, 2006). Este residuo mantiene la estructura del complejo GPC en una forma metaestable previo a la fusión a pH neutro, mientras que a pH ácido desestabiliza el complejo activando el mecanismo de fusión protagonizado por la G2, con participación del SSP (Harrison, 2005; White *et al.*, 2008).

Esta regulación del mecanismo de fusión por parte del SSP ha sido estudiada como blanco de antivirales. Estudios de alto rendimiento (o *high-throughput*) en *SIGA Technologies* (Corvalis, USA) y en *Scripps Research Institute* (La Jolla, USA) han

encontrado seis compuestos capaces de inhibir esta asociación, y en consecuencia impedir la fusión de la membrana viral (Bolken *et al.*, 2006; Cashman *et al.*, 2011). Una revisión sobre antivirales que utilizan como blanco la entrada viral y el procesamiento proteolítico del precursor de las glicoproteínas ha sido recientemente publicado por Lee y colaboradores (Lee *et al.*, 2011)

Interacción entre el complejo GPC y Z

La generación de viriones infectivos requiere de la presencia de todos los componentes virales, en particular de la proteína de matriz que impulsa la brotación viral (Z) y del complejo GPC en la superficie del virión. Capul y colaboradores estudiaron la interacción existente entre la proteína Z y el complejo GPC en su publicación del año 2007, y demostraron que la interacción entre Z y el endodominio de GP2 y SSP es dependiente de la miristoilación de Z (Capul *et al.*, 2007). Por otro lado Agnihothram, en el año 2009, evidenció la acumulación del complejo GPC en microdominios de 120-160 nm alojados en la membrana plasmática, los cuales no colocalizan con la proteína Z (Agnihothram *et al.*, 2009). Estos resultados implican la existencia de otros factores responsables de la colocalización de ambas proteínas durante el ensamblado del virión. La existencia de un mecanismo de interacción entre los componentes estructurales del virión durante su ensamblado, como el que se menciona, estaría relacionada con la optimización del proceso de brotación de viriones infectivos, disminuyendo la brotación de viriones incompletos. Agnihothram también observó la capacidad del complejo GPC de producir la curvatura de la membrana plasmática, lo que soporta los resultados obtenidos por Schlie y colaboradores, quienes describen la existencia de partículas de tipo viral (VLPs) decoradas con espículas obtenidas a partir de la sola expresión del complejo GPC del virus de Lassa (Schlie *et al.*, 2010). Este trabajo es la primera evidencia de la capacidad del complejo GPC de inducir la brotación de partículas tipo virales. Sin embargo aún no se conoce si estas partículas son producidas durante la infección natural del virus.

Proteína de la nucleocápside (N)

La nucleoproteína (NP) de los arenavirus es una proteína de aproximadamente 60-65 kDa (según la especie viral), y es el constituyente principal de la nucleocápside, convirtiéndola en la proteína más abundante del virión con un 70 % de la masa proteica viral. Particularmente, en el virus Pichindé se ha estimado que hay unas 1.500 moléculas de N y 400 de G1 y G2 por virión (Vezza *et al.*, 1977). La NP presenta una

gran variedad de funciones, tanto sea como proteína estructural o como no estructural. Está involucrada en pasos esenciales de la replicación y transcripción del genoma viral, y en su asociación al mismo para formar las nucleocápsides que luego serán empaquetadas dentro del virión. Por otro lado, asociada a su actividad exonucleasa posee funciones recientemente descritas de evasión de la respuesta inmune, actuando como antagonista de Interferón (IFN), e inhibidora de la apoptosis en células infectadas.

Actividad de regulación de la transcripción/replicación

Como se indicó en el párrafo anterior, la nucleoproteína viral es esencial para promover el desarrollo del ciclo viral y junto con la polimerasa componen los elementos mínimos para dar inicio a la replicación y transcripción del genoma viral (Lee *et al.*, 2000, Lopez *et al.*, 2001). Como se mencionó previamente, ambos mecanismos son dependientes de la ARN polimerasa ARN dependiente (RdRP) viral, por lo que es necesario un mecanismo de regulación capaz de hacer el cambio entre el estado de síntesis de los mensajeros y la síntesis de los segmentos antigenómicos. Tortorici *et al.* propuso que el *switch* estaba dado por la acumulación de la proteína N, en un mecanismo de antiterminación, desestabilizando las estructuras de *hairpin-loops* de las regiones intergénicas y permitiendo a la polimerasa atravesar este punto para replicar completamente el segmento viral (Tortorici *et al.*, 2001a).

Autoasociación e incorporación de las nucleocápsides al virión

Desde hace tiempo, es conocida la actividad de autoasociación de la proteína NP y su unión al ARN viral para la formación de las nucleocápsides, sin embargo estudios recientes han demostrado esto de manera directa. En primer lugar, LIVINGSTON MACLEOD y colaboradores fueron los primeros en demostrar la capacidad de autoasociación de la proteína NP de Tacaribe a través de su dominio N-Terminal (figura 3.5). Particularmente, a través de estudios de mutagénesis, confirmaron que los residuos 92 a 119 estarían implicados en la unión de NP-NP y que esta asociación es independiente de la presencia de ARN (Livingston Macleod *et al.*, 2011).

Por otro lado Ortiz-Riaño en el año 2012 confirmó estas observaciones para los virus LASV y LCVM, con leves discrepancias en las regiones involucradas (figura 3.5). Además, demostró que la NP de LCMV es capaz de interactuar con la NP del virus LASV, muy cercanamente emparentado, y con la NP del virus del Nuevo Mundo,

MACV, sugiriendo la conservación de los dominios involucrados en la oligomerización de NP (Ortiz-Riano *et al.*, 2012).

Sin, embargo, la reciente descripción del dominio N-Terminal de NP como protagonista en la formación de los oligómeros mediante técnicas bioquímicas, no concuerda con los modelos propuestos por los grupos que simultáneamente han publicado la estructura cristalográfica de NP (Hastie *et al.*, 2011; Qi *et al.*, 2010) (figura 3.5). Si bien los autores proponen diferentes alternativas para armonizar ambos resultados, se requieren mayores estudios sobre estas interacciones para lograr dilucidar la respuesta.

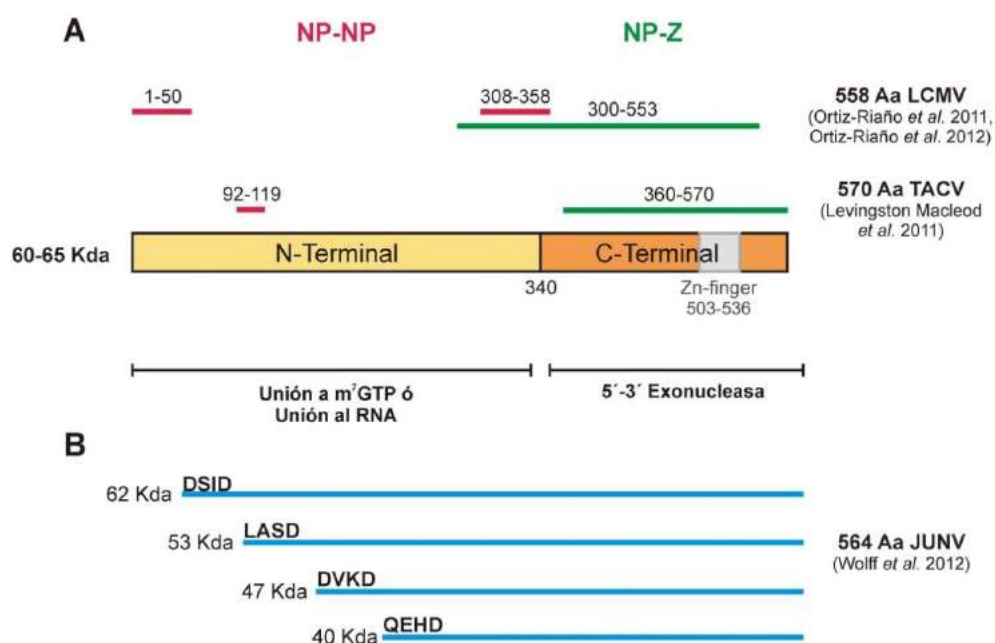


Figura 3.5 A. Esquema de la secuencia aminoacídica de la proteína N, en la que se señalan las porciones N-Terminal y C-Terminal. Las líneas superiores indican las regiones asignadas a la autoasociación de NP y a la interacción con Z, según los autores Ortiz-Riaño y Levingston Macleod. En gris se indica el dominio descrito como *Zinc Finger*. **B.** Fragmentos peptídicos de la proteína N observados en células infectadas. Se señalan los pesos moleculares de los péptidos y los motivos de reconocimiento para caspasas (Wolff *et al.*, 2012).

Levingston Macleod y colaboradores (2011) describen que la unión de la NP a la proteína Z es necesaria para la incorporación de las nucleocápsides al virión, y que esto ocurre a través de su dominio C-Terminal (360-570 en TACV). Dentro de esta región se encuentra un motivo de *Zinc-finger* (Cys-X₂-His-X₁₅₋₂₄-Cys-X₄-Cys), presente en todos los miembros de la familia, el cual fue previamente descrito y demostrada su

capacidad de unir Zn^{+2} (Parisi *et al.*, 1996; Tortorici *et al.*, 2001b). Este motivo, junto con los residuos 461-489 adyacentes al motivo *Zinc-finger*, son esenciales para la interacción NP-Z y es independiente de la oligomerización de NP. Nuevamente, esto fue confirmado para LCMV y LASV, señalando a los residuos 300-553 de LCMV como los involucrados en la interacción NP-Z y la incorporación de las ribonucleoproteínas (RNP) al virión (Ortiz-Riano *et al.*, 2011). Si bien este dominio de interacción se superpone con la región descrita para la actividad exonucleasa, asociada a una función de antagonista de interferón, Ortiz-Riaño y colaboradores han demostrado que los residuos involucrados en la unión NP-Z y los implicados en esta actividad, son distintos y segregables (figura 3.5).

Actividad Exonucleasa y de unión a ARN

La nucleoproteína tiene un dominio N-terminal y otro C-terminal conectados por una región flexible (figura 3.6 A). En la región C-terminal se describió recientemente un dominio caracterizado como exonucleasa, el cual se detallará más adelante, mientras que la porción N-terminal fue descrita como de unión al CAP o m^7GTP y como región de autoasociación. Si bien se creía que la región de unión a ARN se encontraba en la región flexible junto con la porción N-terminal (Qi *et al.*, 2010), tal como ocurre para otros virus de ARN no segmentado de cadena negativa, la reciente publicación de la estructura cristalográfica de esta porción del virus Lassa unida a ARN (Hastie *et al.*, 2011) (figura 3.6 C) ha descartado esta hipótesis. Hastie *et al.* confirmaron que la unión al ARN ocurre a través de una hendidura profunda y básica localizada en la región N-terminal de NP. A través de la comparación de la estructura cristalográfica de la NP libre de ARN y el cristal de la región N-terminal de NP unida a ARN, los autores han postulado un modelo de *gating* o puerta, donde la unión de NP-ARN se controla a través de un mecanismo de cambios conformacionales.

La estructura cristalográfica observada en la figura 3.7 A y B para la nucleoproteína completa en ausencia de ARN muestra una estructura trimérica, con sus respectivos dominios orientados en una conformación cabeza-cola, formando un anillo de monómeros de NP libres de ARN. En esta conformación los contactos de los monómeros bloquean el sitio de unión a ARN, lo que inhibiría su unión.

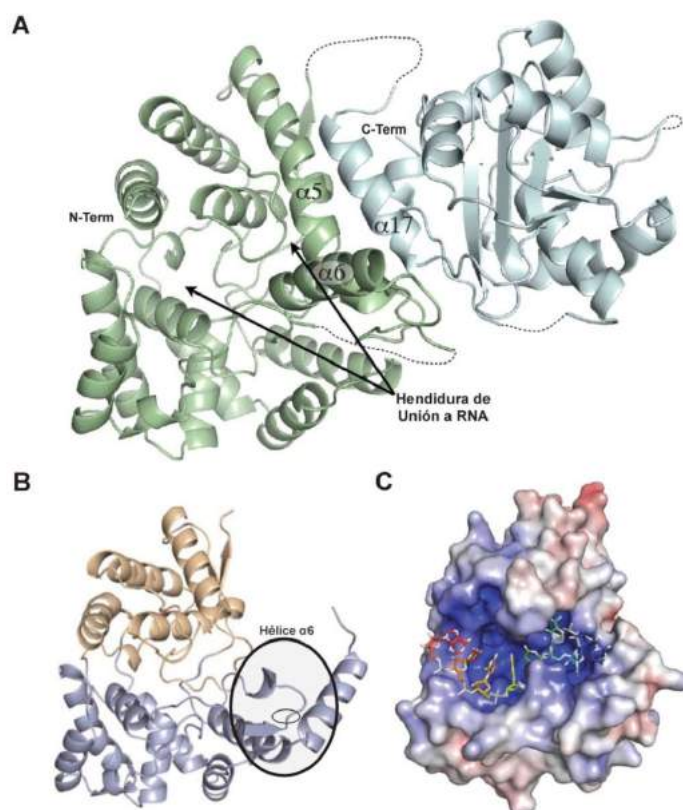


Figura 3.6 A. Estructura cristalográfica de la proteína NP completa. En celeste se señala el dominio C-Terminal, mientras que en verde la porción N-Terminal. En esta última se indica la hendidura de unión a ARN (Hastie *et al.*, 2011). **B.** Región N-Terminal de NP, en donde se señala la hélice-alfa $\alpha 6$, la cual participa en el modelo de compuerta o *gating*. **C.** Potencial electrostático de superficie de la región N-Terminal de la proteína N, donde se señala la hendidura básica de unión a ARNsc. La superficie positiva esta coloreada en azul, mientras que la negativa en rojo. Figuras adaptadas del trabajo de Hastie *et. al*, 2011.

Como se mencionó previamente, una de las funciones de NP es la de unir al genoma viral para conformar las nucleocápsides, así como ocurre en otros virus a ARN de cadena negativa. Durante la replicación de algunos virus de ARN, la Nucleoproteína viral se une a un cofactor de la polimerasa, usualmente llamado P, quien previene la polimerización de NP y la encapsidación inespecífica de ARNs del huésped (Masters & Banerjee, 1988). Este cofactor no se encuentra codificado en el genoma de los arenavirus, orthomyxovirus o bunyavirus, y no se conoce aún el mecanismo por el cual estos virus controlan la unión de NP al ARN durante la infección viral.

En el modelo de *compuerta* propuesto por [Hastie et al. \(2011\)](#), la forma trimérica de NP podría representar NP⁰ (libre de ARN), en el que la trimerización realiza la función equivalente al cofactor de la polimerasa P inhibiendo la unión de NP al ARN. Luego de la unión de NP al ARN, la cual puede ser desencadenada por un factor aún no identificado o la misma presencia del genoma viral, la región C-terminal de NP realiza un cambio conformacional girando significativa la hélice α_6 , junto con la región C-terminal de NP (**figura 3.7 C**). Este cambio produce la “apertura de la puerta” al sitio de unión a ARN y la pérdida de las interacciones NP-NP involucradas en la formación del trímero. Ahora la NP unida al ARN es capaz de formar un polímero lineal que recubre el ARN simple cadena (**figura 3.7 D**).

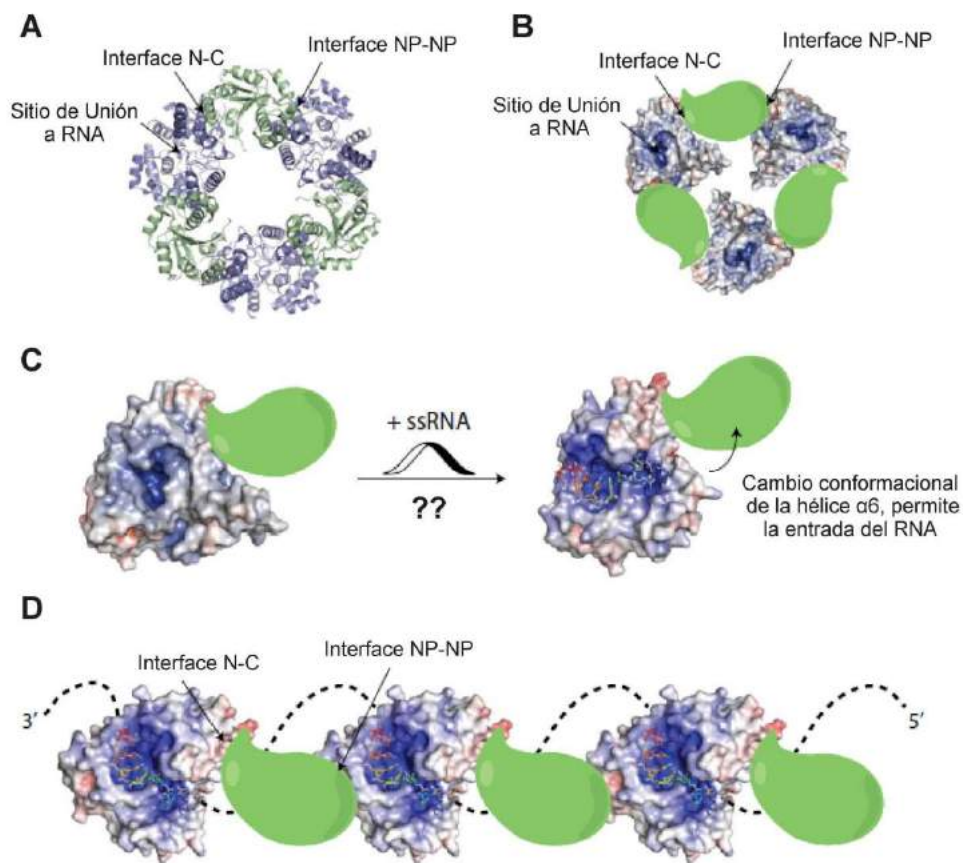


Figura 3.7 A. Estructura trimérica de la proteína N, en la que se señalan las interfaces NP-NP, en particular la interacción entre la porción N-Terminal de una subunidad con la C-Terminal de otra. Además se muestra potencial sitio de unión a ARN. **B.** Potencial electrostático de superficie de la región N-Terminal de la proteína N en su forma trimérica. **C.** Modelo de “gating” donde se muestra el cambio conformacional en la región N-Terminal de NP, como

consecuencia de la presencia de ARNsc u otro factor desconocido. **D** Modelo de polimerización lineal de NP sobre la hebra de ARNsc, la cual está representada por la línea punteada. Debido a que el modelo está ilustrado con el cristal de la porción N-Terminal de NP, la región C-terminal se ilustra como una gota verde. Figura adaptada de [Hastie et al. \(2011\)](#)

Con respecto a la actividad de unión al CAP descrita para N, [Qi et al. \(2010\)](#), propusieron que el *loop* ubicado entre la K236 y la S242 corresponde al sitio de unión al 5'cap m⁷GpppN. Esta afirmación se encuentra basada en el análisis bioinformático de la estructura y la cristalización de la NP junto a dUTP y dTTP. Por otro lado, esta predicción permitió a Qi y sus colaboradores plantear un modelo para el proceso de *Cap-Snatching* adjudicado para la familia *Arenaviridae*, aunque aún no haya sido directamente confirmado. En este modelo, la proteína NP aloja al CAP dentro de la cavidad ubicada en la región N-terminal, mientras que el resto del ARN libre por fuera de la cavidad puede ser sustrato para la degradación por exonucleasas celulares o incluso de la misma NP. Este modelo podría explicar la presencia de 1 a 4 nt sin molde presentes en los ARN mensajeros de los arenavirus ([Meyer & Southern, 1993](#); [Polyak et al., 1995](#)).

Sin embargo no existe evidencia directa de la unión de NP a CAP. Además [Hastie y colaboradores \(2011\)](#) mencionan la imposibilidad de purificar NP a partir de la coprecipitación con m⁷GTP y contrariamente a los resultados descritos por Qi, postula que en realidad la región descrita por Qi, no corresponde a un sitio de unión al CAP, sino que es un sitio de unión al genoma viral ([Hastie et al., 2011](#)).

Como se mencionó al inicio de esta sección, la región C-terminal de la nucleoproteína de los arenavirus, en particular del virus Lassa, ha sido descrita como 5'-3' exonucleasa de la familia DEDDh ([Hastie et al., 2011](#)), una de las seis familias de exoribonucleasas. La familia DEDD se caracteriza por la presencia de 4 residuos conservados (Asp-Glu-Asp-Asp), la presencia de dos iones metálicos en su sitio catalítico y algunos de los miembros poseen actividad ADNsa ([Zuo & Deutscher, 2001](#)). Hastie y colaboradores lograron cristalizar la porción C-terminal de NP del virus Lassa y demostraron en su trabajo la capacidad de NP de degradar ARN doble cadena (ver **figura 3.8**). Simultáneamente al trabajo de Hastie, Qi y colaboradores publicaron la estructura cristalográfica de la NP completa, coincidiendo en la predicción de la actividad 5'-3' exonucleasa del dominio C-terminal. Sin embargo, los ensayos *in vitro* de Hastie et al. y Qi et al. mostraron una discrepancia entre los sustratos de esta actividad, los cuales se encuentran resumidos en la **figura 3.8**.

	ssRNA _(OH)	ssRNA _{5' ppp}	CAP-ssRNA m ⁷ GTP	dsRNA _(OH)	dsRNA _{5' ppp/5' OH}	dsRNA _{5' ppp/5' ppp}	dsRNA _{5' overhang}	dsRNA _{3' overhang}	dsRNA _{5' ppp + overhang}	dsRNA _{poly (I:C)}	ssDNA	dsDNA
Qi et al. 2010	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-	-	✓	-	✓
Hastie et al. 2010	✗	-	-	✓	✓	-	✓	✓	✓	-	✗	✗

Figura 3.8. Diferencias de sustrato de la actividad endonucleasa de NP. El símbolo verde indica degradación del sustrato, mientras que la cruz roja indica la no degradación. El guión indica que la condición señalada no fue evaluada. Los resultados negativos para la degradación de ARNsc, ADNsc y ADNdc fueron realizados con fragmentos de 18 nt o 21nt de longitud.

Los resultados obtenidos por Qi respecto a los sustratos, en particular la degradación del ARNsc por la actividad exonucleasa de NP introducen la interrogante de cómo el ARN viral es protegido de la degradación de la propia nucleoproteína viral. El modelo propuesto por los autores implica un mecanismo de regulación aún no descrito en condiciones *in vivo*, donde la actividad exonucleasa estaría restringida a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) incluidos en el ARN viral.

Por otro lado, esta interrogante no se presenta en el modelo propuesto por Hastie y colaboradores ya que demuestran que la especificidad de la NP es solo por el sustrato de ARNdc (confirmada a partir de la cristalización de la NP unida a un oligonucleótido de 8 pb a la porción C-Terminal de NP) (Hastie et al., 2012a; Hastie et al., 2012b).

Actividad de inhibición de interferón

La vía de activación de interferón puede ser desencadenada a partir de la detección de patrones moleculares asociados a patógenos a través de los receptores celulares de reconocimiento de patrones (PRRs). Dentro de este grupo se encuentran los receptores *Toll-like*, *retinoic-acid-inducible gene-I-like helicase* (RIG-I) o *melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA-5). Estos son los encargados de translocar

los factores IRFs y NF- κ B al núcleo, donde activan la expresión de INF α y β (figura 3.9).

En el año 2006, trabajos con LCMV reportaron mecanismos básicos por los cuales el virus evita la eliminación por la respuesta inmune adaptativa del huésped. Se demostró utilizando diferentes estímulos, incluyendo la infección con el virus Sendai y transfección de ADN mediada por liposomas, que LCMV deshabilita esta respuesta interfiriendo con la producción de interferón- β (IFN- β). La inhibición de la producción de IFN en células infectadas con LCMV es causada por un bloqueo temprano en el camino de activación del factor regulador 3 (IRF-3). Este factor induce la expresión de Interferón (Haller *et al.*, 2006). Además, usando plásmidos que expresan las proteínas individuales de LCMV, se encontró que la producción de la nucleoproteína fue suficiente para inhibir tanto la generación de IFN como la translocación nuclear de IRF-3. En el año 2010 Zhou y colaboradores realizaron estudios más detallados sobre este mecanismo en células de cultivo y en ratones, donde confirmaron que los receptores de reconocimiento de patrones involucrados en la infección por LCMV son MDA-5 y RIG-I. (Zhou *et al.*, 2010) (figura 3.9). Se demostró que estos receptores interactúan físicamente con el ARN viral (lo cual indica que el ARN viral activaría la vía IFN) y con la NP, a través de la región 382-386 (Martinez-Sobrido *et al.*, 2009). Zhou también confirmó que el ARN viral desnudo era capaz de activar la vía de IFN, mientras que no así la infección natural. Y si bien NP interacciona con RIG-I y MDA-5 deben existir mecanismos adicionales para la inhibición de IFN, dado que mutantes incapaces de reprimir la respuesta de IFN conservan su actividad de unión a los receptores.

La función antagonista de IFN sitúa a la NP como una de las proteínas virales cuya actividad podría determinar la virulencia *in vivo* (Martinez-Sobrido *et al.*, 2006). Esto fue confirmado para varios de los virus de la familia como LASV, WWAV, PICV, JUNV, MACV y LATV, excepto para el virus Tacaribe el cual no posee esta función antagonista de Interferón (Martinez-Sobrido *et al.*, 2007). Esto ha sido abordado por los autores de la estructura cristalográfica de la NP (Hastie *et al.*, 2011; Qi *et al.*, 2010), donde ambos mencionan el cambio de Gly392 del sitio catalítico de la actividad exonucleasa completamente conservado en todos los arenavirus, por Asp presente en todas las secuencias de los clones del virus Tacaribe.

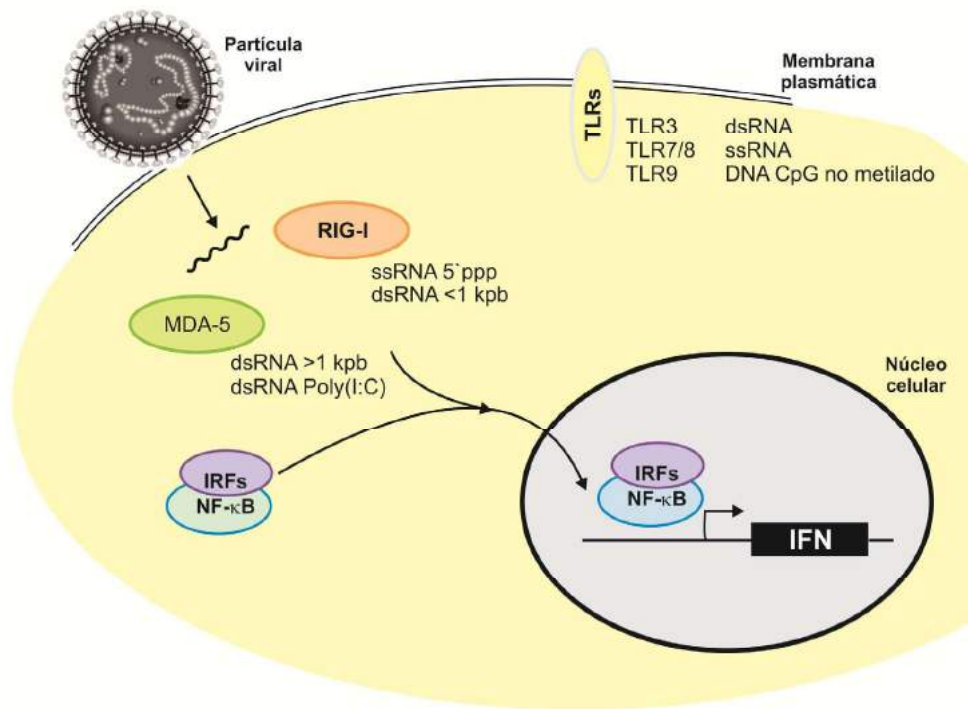


Figura 3.9 Mecanismo de activación de la vía de IFN α/β . Los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) MDA-5, RIG-I y TLRs detectan patrones exógenos como ARNsc 5'ppp, ARNdc, entre otros y activan la translocación de los factores IRF y NF- κ B al núcleo, donde activan la expresión de la vía de Interferón. La proteína N ha sido descrita como inhibidora de la translocación de los IRFs y NF- κ B, impidiendo así la activación de la vía de IFN. (Rodrigo *et al.*, 2012)

Actividad de inhibición de la apoptosis

Recientemente se describió la actividad inhibitoria de la apoptosis de la nucleoproteína de los arnavirus (Wolff *et al.* 2012). Había sido reportado previamente la presencia de fragmentos definidos de NP durante la expresión de la misma, o durante la infección viral. Estos datos junto con la evidencia de que la infección por arnavirus no induce el proceso de apoptosis, fue el punto de partida para el grupo de Wolff. En este trabajo los autores confirman la existencia de varios motivos para la proteólisis por caspasas (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) dentro de la secuencia de NP, los cuales coinciden con los pesos moleculares de los fragmentos observados. Además demostraron que mediante la activación de la apoptosis, la proporción de NP procesada aumentaba, y la proteólisis de la Caspasa 3 disminuía. Esto último, demostró la interferencia en la cascada de señalización de la apoptosis mediante un mecanismo de “señuelo”, donde NP compite con la Caspasa 3 por el

procesamiento proteolítico. Esta función anti-apoptótica garantiza condiciones óptimas para los procesos virales asegurando la continua disponibilidad de la maquinaria celular. Los motivos descritos como sitios de proteólisis son completamente conservados dentro de la familia, excepto en el virus Tacaribe, el cual demostró en los experimentos realizados por Wolff, la ausencia de esta actividad anti-apoptótica, lo que se condice con la baja patogenicidad de esta especie viral. Por otro lado, los autores tampoco descartan una función adicional de los fragmentos derivados de NP, los cuales también son incorporados dentro del virión. Por último, la función anti-apoptótica de NP sería complementaria a la activación de la vía P13K/Akt mediada por la proteína viral de matriz (Z), la cual será detallada en la sección de Z.

Por otro lado se demostró que la proteína N, o los productos derivados de su procesamiento proteolítico mencionados previamente actúan como antígeno responsable de la fijación de complemento (de Mitri & de Martinez Segovia, 1980). Además, al menos un epítipo de la NP se ha detectado en la superficie del virión de LCM, así como en la superficie de células infectadas (Bruns *et al.*, 1986; Zeller *et al.*, 1986, 1988). Esta observación ha sido soportada por el hecho de que N presenta regiones hidrofóbicas que podrían anclarla en la membrana celular, aunque ha sido localizada principalmente en el citoplasma de las células infectadas (Neuman *et al.*, 2005).

Interacción con la proteína viral Z

Como se mencionó anteriormente, la proteína NP es capaz de interaccionar con Z, a través del dominio C-terminal de NP, y es a través de esta interacción que Z dirige la incorporación de las nucleocápsides al virión (Capul *et al.*, 2011). Recientemente Shtanko y colaboradores identificaron al dominio YLCL de la proteína Z como el responsable de la incorporación de la proteína N a las partículas virales (Shtanko *et al.*, 2011). En el mismo trabajo también se identificó la interacción simultánea de la proteína ALIX/AIP1 (asociada a los complejos ESCRT) con Z y N. Esta última interacciona con ALIX/AIP1 a través de la región 342-390 del dominio C-Terminal, donde también se encuentra el dominio de actividad exonucleasa descrito para NP. Sin embargo, Ortiz-Riaño ha demostrado que si bien ambas funciones se encuentran en la porción C-Terminal de NP, los residuos involucrados son distintos y segregables para cada función (Ortiz-Riano *et al.*, 2011).

ARN polimerasa viral (L)

El ORF de mayor tamaño del genoma arenaviral se encuentra en el segmento genómico L, y codifica para la proteína L (Harnish *et al.*, 1981; 1983) con un peso molecular aproximado de 200 kDa, a la cual se le atribuye la actividad de ARN polimerasa ARN dependiente (RpRd). En consecuencia, la proteína L es la encargada de los procesos de transcripción y replicación viral, estando ambos altamente regulados

Es notable destacar que la proteína L de los arenavirus presenta motivos muy conservados entre las ARN polimerasa ARN dependiente de virus de ARN con cadena negativa (Sanchez & de la Torre, 2005), como la proteína L de rhabdovirus y paramixovirus. De hecho, la comparación de diferentes secuencias de RdRp de estos virus, incluyendo a las proteínas L de los arenavirus, muestra la presencia de cuatro regiones conservadas. Entre ellos, esta módulo polimerasa localizado dentro de la región III (Vieth *et al.*, 2004) como se muestra en la **figura 3.10 B y C**.

Dominio endonucleasa o N-Terminal

Por otro lado, aún no ha sido posible la determinación de estructura terciaria completa de la proteína L, principalmente debido a que se trata de un polipéptido de gran tamaño y que su manipulación presenta muchas dificultades experimentales. Pero si ha sido posible obtener la estructura cristalográfica de la porción N-terminal de la proteína L de LCMV (dentro de la región I, residuos 1 a 196), la cual corresponde a un dominio endonucleasa de tipo II, con una arquitectura α/β similar al extremo N-terminal (subunidad PA) de la polimerasa viral de influenza y una alta conservación entre los miembros de la familia (Morin *et al.*, 2010) (**figura 3.10 A**).

Durante la replicación, la polimerasa viral primero une al extremo 3' del molde de ARN y copia hasta el siguiente extremo, dirigiendo así la síntesis de los antigenomas completos. Sin embargo, durante la transcripción, la polimerasa frena la síntesis en la zona cercana a la región intergénica (ver NP) y es en estas moléculas, particularmente en su extremo 5', donde se encuentran secuencias no codificadas por el molde de longitud variable que terminan con una estructura de CAP 5' (Meyer & Southern, 1993; Raju *et al.*, 1990). Este hecho sugiere la presencia de un mecanismo de *Cap Snatching*, el cual ha sido previamente descrito para los miembros de la familia *Orthomixoviridae* (Plotch *et al.*, 1981) y *bunyaviridae*. (Bishop *et al.*, 1983; Garcin *et al.*, 1995). En este mecanismo la polimerasa viral captura ARNm celulares conteniendo extremos m⁷GTP y mantiene el extremo liberando el resto del ARNm, a través de una

actividad endonucleasa (particularmente en influenza, la región corresponde a la subunidad PA). Estos ARNm de corta longitud son utilizados como cebadores para la síntesis de ARNm virales. En consecuencia, por analogía de secuencia y actividad a las polimerasas de influenza y otros bunyavirus, [Lelke et al. \(2010\)](#) propusieron a la proteína L como la responsable del mecanismo de *Cap Snatching* en los Arenavirus ([Garcin & Kolakofsky 1990](#)). Meses después, Morin y colaboradores (2010) determinaron la estructura cristalográfica de la porción N-Terminal de la polimerasa viral (residuos 1 a 196) y por analogía estructural propusieron paralelamente la asignación a la proteína L de la función de *Cap snatching* ([Morin et. al., 2010](#)).

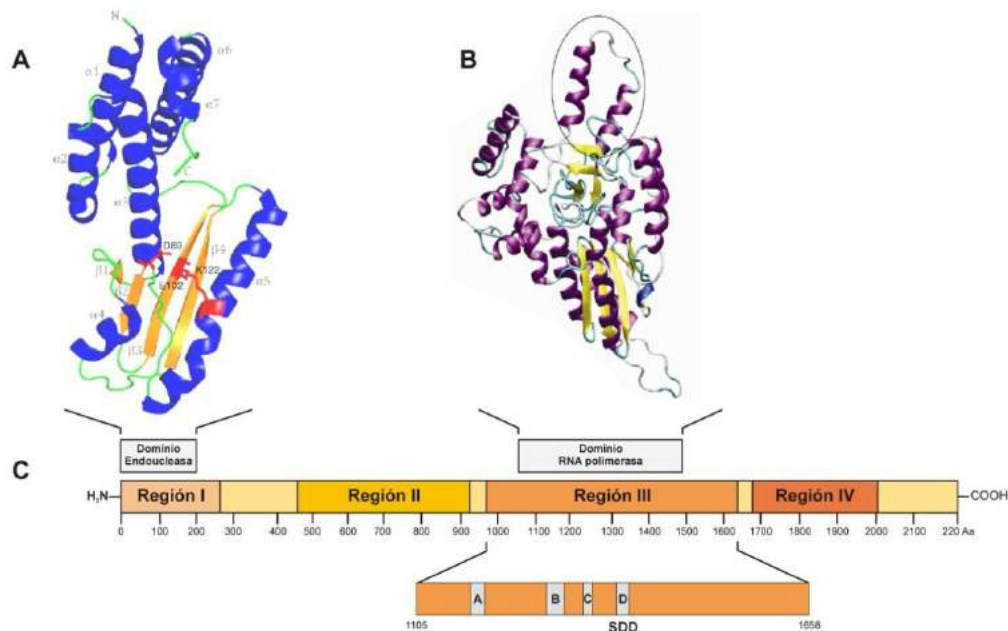


Figura 3.10 A. Estructura cristalográfica de la porción N-terminal (exonucleasa) de la proteína L ([Morin et al., 2010](#)) **B.** Modelado por homología a HCV del dominio polimerasa de L de JUNV ([Goñi, tesis doctoral, 2010](#)). **C.** Esquema de la secuencia aminoacídica de la proteína L completa, donde se señalan las regiones I, II, III y IV según ([Vieth et al., 2004](#)). El esquema inferior detalla la región III, la cual se subdivide en las regiones A, B, C y D. En esta última se encuentran presentes los aminoácidos SDD, de los que el aspartato central está altamente conservado.

Dominio Polimerasa (Región III)

Como se mencionó previamente, la actividad ARN polimerasa ARN dependiente de los arenavirus se encuentra alojada en la región III de la proteína L ([figura 3.8 C](#)). Esta proteína de gran tamaño posee un plegamiento conservado entre otras polimerasas

virales, como así lo demuestran microscopias electrónicas del complejo de la proteína L completa del virus Machupo. En estas se muestra la formación de una estructura tipo anillo decorada con dos subunidades globulares y un dominio tipo brazo, consistente con lo observado para otras RdRPs (Kranzusch *et al.*, 2010). En este trabajo los autores proponen que la región central en forma de anillo corresponde a la actividad polimerasa, mientras que los apéndices estarían involucrados en el proceso de *Cap snatching*. Además, la medición del diámetro del anillo, permite hipotetizar que para que el ARN viral sea capaz de atravesar el anillo, debe estar previamente desacoplado de la nucleoproteína que lo recubre, y una vez desnudo es sustrato para la actividad polimerasa. Por otro lado, los autores también proponen que el reconocimiento del ARN viral requiere de un motivo de secuencia específica localizado en las posiciones 2-5 del extremo 3' del genoma viral, y esta interacción L-nucleocápside comprende el complejo ribonucleoproteico que es incorporado al virión.

Continuando con la caracterización del dominio polimerasa, un trabajo publicado a finales del año 2008 (Wilda *et al.*, 2008) analizó los sitios de unión entre la proteína Z y la polimerasa L en el virus Tacaribe (Nuevo Mundo). La interacción de estas proteínas fue descrita anteriormente como inhibitoria de la replicación (Jacamo *et al.*, 2003). En el trabajo de Wilda se mostró que el fragmento C-terminal de la L, incluyendo la región IV, no resultó ser necesaria para la interacción Z-L, definiéndose dos regiones contiguas que si resultaron determinantes para esta función (A y C) (figura 3.10 C). En este trabajo Wilda y colaboradores sugirieron que el residuo H1189 es crítico para la interacción con Z, mientras que en la región D los resultados indican que sólo los cambios realizados en la primera D del triplete SDD anulan completamente la interacción, mientras que los cambios en los otros residuos no producen modificaciones radicales en la interacción. Debido a que estos motivos son esenciales para la función catalítica de la polimerasa, es probable que los residuos identificados en estos ensayos estén directamente involucrados en la potencial función inhibitoria de la replicación por parte de Z. Por último, los análisis de delección de la región N-terminal, conducen a la identificación de una región comprendida entre los residuos 156 y 292 que también resulta esencial para la unión con la proteína Z. Esto podría ser debido a que la delección de esta zona influiría negativamente en el plegamiento de la polimerasa, o afectaría la oligomerización de la misma, dado que la homooligomerización de L ha sido descrita por Sanchez y de la Torre como necesaria para desempeñar su actividad polimerasa (Sanchez *et al.*, 2005). La hipótesis de regulación de la polimerasa mediante la proteína Z ha sido confirmada por el reciente trabajo de Kranzusch, donde los autores describen la formación de un complejo especie-específico entre L y Z (Kranzusch & Whelan, 2011). En esta interacción Z inhibe la

iniciación de la síntesis de ARN y bloquea a la polimerasa en un estado catalíticamente inactivo unida al promotor. Este mecanismo de regulación donde la forma inactiva de L permanece unida al ARN genómico permite garantizar el ensamblaje de la polimerasa dentro del virión.

En resumen, la polimerasa constituye la proteína más grande codificada por el genoma del patógeno, y desempeña un rol fundamental en el ciclo viral, ya sea mediante la interacción con las demás proteínas virales, así como con proteínas del huésped. Esto hace de L una proteína con numerosos aspectos que aún quedan por resolver, por lo que su estudio es de gran interés, particularmente como blanco de antivirales.

Proteína Z

La proteína Z es el péptido más pequeño codificado por los arenavirus, posee entre 90 y 103 aminoácidos (10-11 kDa) y aún no se conoce si existe una proteína homologa entre la familia de virus de ARN de cadena negativa. Las variadas funciones de este polipéptido aún no están completamente dilucidadas, sin embargo se conoce que es un componente estructural del virión (Salvato *et al.*, 1992) responsable del proceso de brotación (Perez *et al.*, 2003), y que en células infectadas es capaz de interactuar con varios factores celulares. Su estructura está caracterizada por la presencia de una secuencia consenso para la miristoilación en la región N-terminal, un dominio central RING o “Zinc finger” conteniendo dos átomos de Zn^{2+} , y un extremo C-terminal en el que se encuentran presentes motivos ricos en prolina, denominados dominios tardíos o *Late domains* (figura 3.11).

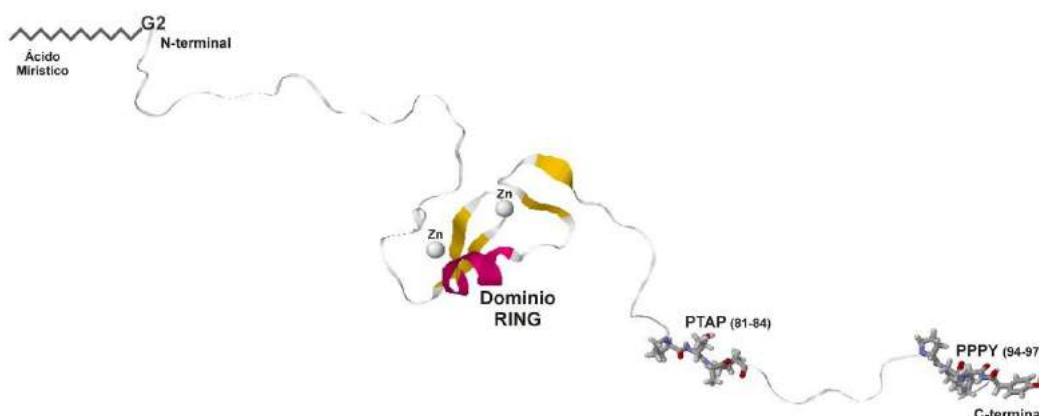


Figura 3.11 Estructura de la proteína Z del virus Lassa (cepa Joshia) obtenida por RMN. En el extremo N-terminal se destaca la presencia de una glicina en la posición 2, la cual es

sustrato de la miristoilación. En la región central se indica el motivo RING en coordinación con dos átomos de Zn^{+2} , mientras que en la región C-terminal se muestran los dos dominios tardíos presentes en la secuencia del virus de Lassa. Figura adaptada de [Volpon et al., 2010](#).

Dominio de Miristoilación

La N-miristoilación es una modificación proteica irreversible, que ocurre co-traduccionalmente o post-traduccionalmente por la acción de la *N-miristoil transferase* (NMT). Esta enzima cataliza la adición covalente de un ácido graso saturado de 14 carbonos (ácido mirístico) a un residuo de glicina en la posición 1, a través de un enlace amida. Esta glicina libre en el extremo N-terminal es un requisito excluyente para el mecanismo de acción de la NMT, por lo que el residuo metionina inicial es removido por la acción de una metionin-aminopeptidasa celular ([Farazi et al. 2001](#)).

Además de la glicina en la posición 1 (Gly1), la NMT requiere que en la posición 2 no existan residuos cargados, aromáticos o una prolina. En las posiciones 3 y 4 se permite cualquier aminoácido, mientras que en la posición 5 es necesaria la presencia de Ser, Thr, Ala, Gly, Cys, o Asn, y en la posición 6 se permite cualquier residuo, excepto prolina ([Farazi et al., 2001](#)). Esta secuencia consenso se encuentra presente en la región N-terminal de la proteína Z de todos los arenavirus y la glicina en la posición 2 está totalmente conservada en todos los miembros de la familia. En el año 2004 Pérez y colaboradores describieron por primera vez la participación de la miristoilación de la proteína Z de los arenavirus en el proceso de brotación viral, reportando que no se producía la brotación viral cuando se expresaba una versión mutante de la proteína Z (en la cual se remplazaba la Glicina crucial por una Alanina), lo que les permitió definir a la miristoilación de Z como un requisito para el proceso de brotación viral ([Pérez et al., 2004](#)). Dos años más tarde Strecker y colaboradores describieron la fuerte asociación de la proteína Z de Lassa con las membranas celulares, a pesar de que esta careciera de dominios transmembrana ([Strecker et al., 2006](#)). Los autores adjudicaron este direccionamiento celular al ácido mirístico unido covalentemente en la G2, dado que la mutación del sitio producía la pérdida de la localización celular característica de Z, su asociación a las membranas celulares y la capacidad de producir VLPs de Z. Finalmente, Capul y colaboradores describieron la interacción entre Z y la glicoproteína transmembrana de la partícula viral (GP2). Esto último permitió sugerir que la localización de Z en membrana asociada a GP2 constituye el sitio de ensamblaje viral, a partir de donde se producirá el proceso de brotación viral ([Capul et al., 2007](#)).

Dominio RING

La región central de la proteína Z está caracterizada por un motivo RING o “Zinc finger”. Este tipo de dominio fue definido por primera vez por Freemont en el año 1991 y se caracteriza por contener la siguiente secuencia canónica: Cys-X₂-Cys-X₍₉₋₃₉₎-Cys-X₍₁₋₃₎-His-X₍₂₋₃₎-Cys-X₂-Cys-X₍₄₋₄₈₎-Cys-X₂-Cys (donde X es cualquier aminoácido). (Freemont *et al.* 1991) Por otro lado, estudios de estructuras tridimensionales de estas proteínas revelaron que los residuos conservados de Cys e Hys se encuentran en el núcleo del dominio, el cual mantiene su estructura a través de la coordinación de dos átomos Zinc (figura 3.12 A).

El motivo RING descrito por primera vez, se lo denominó RING1 (*Really interesting new gene 1*). Hasta el momento se conoce que esos motivos cumplen funciones de unión a ADN, unión a sustratos proteicos o lipídicos y de participar en la actividad de ubiquitina ligasa (Deshaies & Joazeiro, 2009). Esta última actividad consiste en la unión covalente de una Ubiquitina a la proteína blanco. Brevemente el proceso consiste en la activación de la Ubiquitina a través de un enlace tioéster catalizado por una enzima E1. Una vez activada, la energía almacenada en ese enlace cataliza el acople del residuo C-terminal de la ubiquitina con la cisteína ubicada en el sitio catalítico de la enzima E2. Una vez que la proteína E2 es “cargada” con Ubiquitina, esta estará disponible para transferir su carga a residuos de glicina, lisina, serina, treonina, cisteína, o metioninas terminales de la proteína que será ubiquitinada (figura 3.12 B). La especificidad de este último proceso se logra a partir de las 616 E3 Ubiquitin-ligasas codificadas por el genoma humano, y son estas enzimas las que conforman en mayor proporción la familia RING. (Gustin *et al.*, 2011)

Existen varias superfamilias con motivos *Zinc Finger*, las cuales varían según la secuencia o la estructura del dominio. En los arenavirus este motivo comprende aproximadamente 50 aminoácidos, y Z es la proteína más pequeña conocida que contiene un motivo RING, comprometiendo aproximadamente el 50% de la secuencia aminoacídica total. Este dominio central participa en la inhibición de la síntesis del ARN viral a través del bloqueo del sitio catalítico de L, previamente mencionado, en la interacción con proteínas celulares (PML o eIF4E, ver más adelante) y, como se ha descrito recientemente, a través de ensayos de mutagénesis dirigida, en el proceso de brotación viral (Wang *et al.*, 2012).

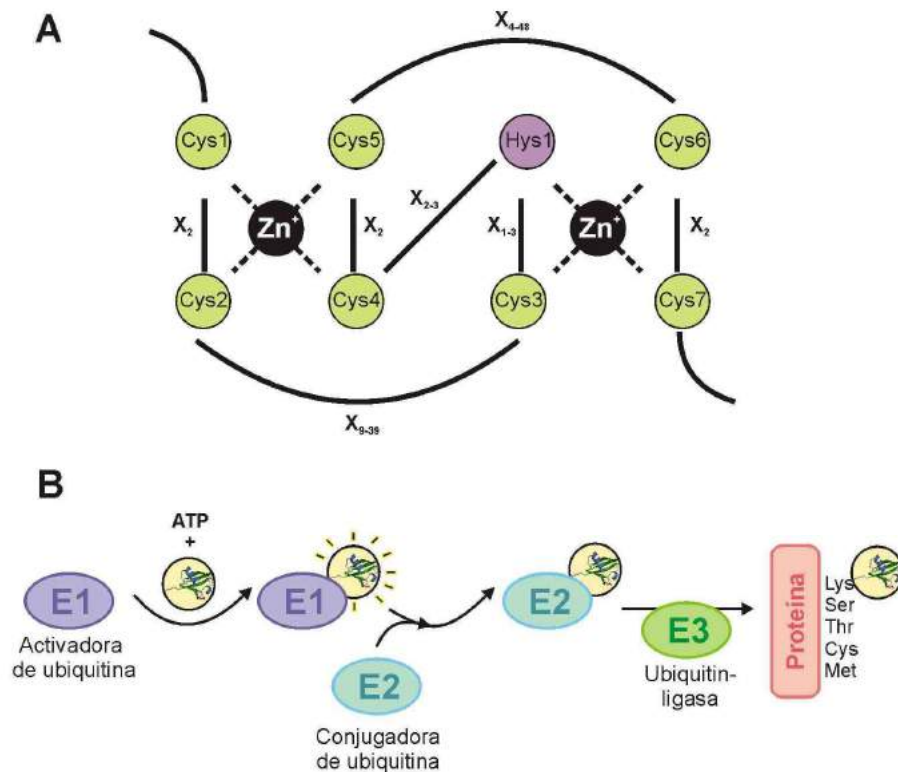


Figura 3.12 **A.** Esquema genérico de la secuencia canónica de la familia RING. **B.** Esquema de las etapas iniciales de la vía de ubiquitinación. La primera etapa constituye la activación de la ubiquitina por medio de la enzima activadora de ubiquitina E1. Luego la ubiquitina activada es transferida desde E1 a la enzima conjugadora de ubiquitina E2. Finalmente la enzima ubiquitin-ligasa E3 específica para el sustrato blanco permite la unión espacio-temporal de ambos sustratos, permitiendo así la transferencia de la ubiquitina a la proteína blanco.

Dominios tardíos

Un paso necesario en la generación de viriones envueltos, es la formación de la membrana lipídica que los recubre. En la mayoría de los casos está cubierta deriva de la membrana de la célula hospedadora, en un proceso que implica la curvatura de la misma y la brotación del virión naciente. En algunos casos los virus han resuelto el mecanismo de este estadio a través de la imitación de los procesos celulares naturales para la formación de vesículas.

El término “dominio tardío” (*Late domain*) o “dominio L” fue utilizado para describir a aquellos motivos secuenciales a los que su mutación inducía el ensamblaje defectivo de la progenie viral, de manera tal que los viriones nacientes eran incapaces de

escindirse de la membrana celular, observándose una acumulación de los mismos (Bieniasz, 2006). El estudio de estos motivos comenzó dentro de la familia de retrovirus, donde se caracterizaron como dominios tardíos las siguientes secuencias: YPXL, PTAP y PPXY. Consecuentemente estos motivos fueron descritos en otras familias virales (*Filoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Arenaviridae*), observándose su relación con el proceso de brotación viral.

Garrus *et al.*, (2001) describieron la presencia del motivo PTAP por primera vez en la proteína p6^{gag} del virus del HIV y su interacción con la proteína TSG101 (*tumor susceptibility gene 101*), un componente de la maquinaria de transporte vesicular o *vesicular protein-sorting*. Dos años más tarde Pérez *et al.* demostraron que la inhibición de Tsg101 por ARN de interferencia (ARNi) producía una disminución significativa en la brotación de LCMV, con un fenotipo similar al observado en los mutantes defectivos en los dominios tardíos (Pérez *et al.* 2003). Si bien la secuencia aminoacídica de LCMV no contiene el dominio PTAP, si posee un dominio rico en prolina (PSSP) en una ubicación similar. Estos datos junto con la colocación de Z y TSG101, fueron los primeros indicios de la participación de factores celulares del transporte vesicular en el mecanismo de brotación de los arenavirus. Por otro lado el motivo PPXY, presente en la mayoría de los arenavirus del Viejo Mundo, es capaz de unir a los dominios WW presentes en las proteínas ubiquitin-ligasa Nedd-4 y otras ubiquitin-ligasas tipo Nedd-4, los cuales consisten en secuencias de 38 a 40 aminoácidos espaciados por dos triptófanos.

Además, existe evidencia de que numerosos virus que contienen estos dominios tardíos son capaces de interactuar con proteínas de clase E (VPS4A, VPS4B, Nedd4 y TSG101), las cuales están implicadas en el camino de la formación de los cuerpos multivesiculares y la citocinesis. Esta convergencia sugiere que la brotación de virus que contienen dominios tardíos, la formación de cuerpos multivesiculares y la separación final de las células en división, podrían ser procesos análogos donde se involucran factores celulares similares (McDonald & Martin-Serrano, 2009; Urata *et al.*, 2006). En la revisión de Gustin *et al.* (2011) se menciona que mediante estudios de mutagénesis dirigida se ha analizado, en proteínas virales, la posibilidad de que estos dominios tardíos fueran ubiquitinilados en los residuos de lisina. Estos estudios no lograron confirmar la hipótesis, sin embargo la reciente descripción de los residuos Ser, Thr, y Cys como aceptores de ubiquitina alternativos obligan a revisar los estudios previos.

Un dato importante sobre los dominios tardíos es su capacidad para funcionar como unidades autónomas. Es decir, que son capaces de promover la brotación viral aun cuando son expresados en un contexto proteico diferente, y en posiciones no

naturales dentro de una proteína. Esto fue estudiado principalmente en la proteína Gag del virus del Sarcoma de Rous y de HIV, donde otros dominios tardíos fueron capaces de remplazar el motivo PTAP presente naturalmente en estas proteínas, incluso en posiciones distintas (Parent *et al.*, 1995). Este funcionamiento autónomo sugiere un mecanismo de acción asociado al reclutamiento de otros factores virales o celulares responsables de la brotación viral, de manera independiente al contexto proteico que contiene el dominio L. Estos factores involucrados en el transporte multivesicular han sido ampliamente estudiados en levaduras, donde se ha descrito un subconjunto de factores designados de Clase E, los cuales participan en la formación de cuatro complejos proteicos, denominados complejos de clase endosomal requeridos para el transporte (ESCRT, por la denominación inglesa *endosomal sorting complexes required for transport*) -0, -I, -II y -III. Estos complejos participan en el reconocimiento y la clasificación de las proteínas ubiquitiniladas en la membrana de las vesículas de transporte y están ampliamente conservados en mamíferos, por lo que se los denomina de manera análoga. Los factores pertenecientes a estos complejos son capaces de ubiquitinar y reconocer proteínas ubiquitinadas, de manera tal que actúan de forma secuencial y orquestada para estimular la formación de vesículas o, en el contexto de una infección viral, el proceso de brotación viral. Por ejemplo la proteína de unión al dominio PTAP perteneciente al complejo ESCRT-I, Tsg101 posee en su extremo N-terminal (residuos 1-145) una variante E2 del dominio de unión a ubiquitina (*Ubiquitin E2 variant* UEV), una región central rica en prolina (residuos 146-215) y en el extremo C-terminal una región *Coil-coiled* (residuos 240-311) en conjunto con una *steadiness box* región (S-box) (figura 3.13 A). La actividad propuesta para TSG101 es la de unir independientemente a proteínas ubiquitinadas y al dominio tardío PTAP de manera de funcionar como puente para el reclutamiento de las proteínas de los complejos ESCRT promoviendo la formación de vesículas o la brotación viral (figura 3.13 B). El proceso de ubiquitinación consiste en la unión covalente de ubiquitina (una proteína de 76 aminoácidos), la cual es llevada a cabo por enzimas Ubiquitin-ligasas. Esta modificación ocurre sobre los residuos de lisina y señalizan el destino degradativo de la proteína blanco, o el camino hacia MVB, entre otros.

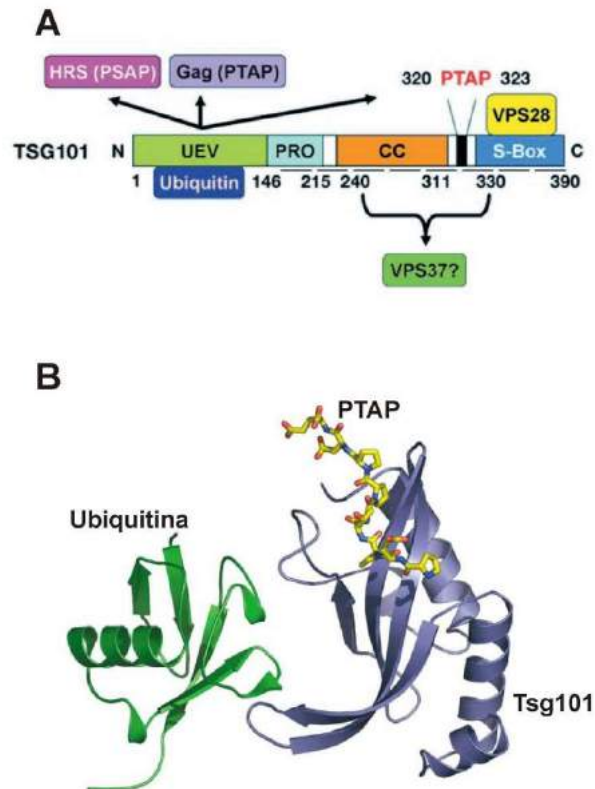


Figura 3.13 Proteína Tsg101. **A.** Esquema de la estructura de Tsg101. Sobre el extremo N-terminal se indica en verde el dominio de unión a PTAP y la ubiquitina, UEV. En celeste se indica el dominio rico en prolina, PRO. En naranja se indica el dominio predicho *Coil-coiled*. Y sobre el extremo C-terminal se indica en azul el dominio S-box. Los dos últimos han sido propuestos como los sitios de unión a proteínas de los complejos ESCRT (VPS37 y VPS28). Intercalado entre estos dos dominios se encuentra presente la secuencia PTAP, la que permite la oligomerización de TSG101 a partir de su unión a la región UEV. Figura adaptada de Stuchell M.D: *et al.* 2004. **B.** Estructura cristalográfica de la proteína TSG101 unida a ubiquitina. Se destaca en bastones amarillos el dominio PTAP. Figura adaptada de Sundquist *et al.*, 2004

Otra de las proteínas más estudiadas de unión a dominios tardíos, es la proteína ubiquitin-ligasa Nedd4. Esta posee tres dominios principales: un dominio N-terminal de unión a lípidos, un dominio central WW, y un dominio C-terminal HECT con actividad de ubiquitin-ligasa. Una de las principales funciones de Nedd4 es la de regular la expresión del canal de sodio epitelial en la superficie celular a partir del reclutamiento de otras proteínas de los complejos ESCRT. Por otro lado, Nedd4 es capaz de unir al dominio tardío PPPY reclutando otros factores, y de esta manera estimula la brotación viral a través de la escisión de la partícula naciente (Freed, 2002). Justamente los

Estudio de la función y actividad de la proteína Z del virus Junín

motivos PTAP y PPPY son los dominios más conservados entre los arenavirus (figura 3.14).

Dos nuevos dominios han sido recientemente descritos, el primero de ellos caracterizado por la secuencia Φ PxV ("x" implica cualquier aminoácido, y " Φ " indica la presencia de un residuo hidrofóbico) el cual fue identificado en el virus de Parainfluenza-5, otro patógeno de ARN de cadena negativa que pertenece a la familia *Paramixoviridae* (Schmitt *et al.*, 2005). El segundo dominio YMYL fue identificado en otro miembro de la familia *Paramixoviridae*, el virus Nipah (Ciancanelli & Basler, 2006) (figura 3.14).

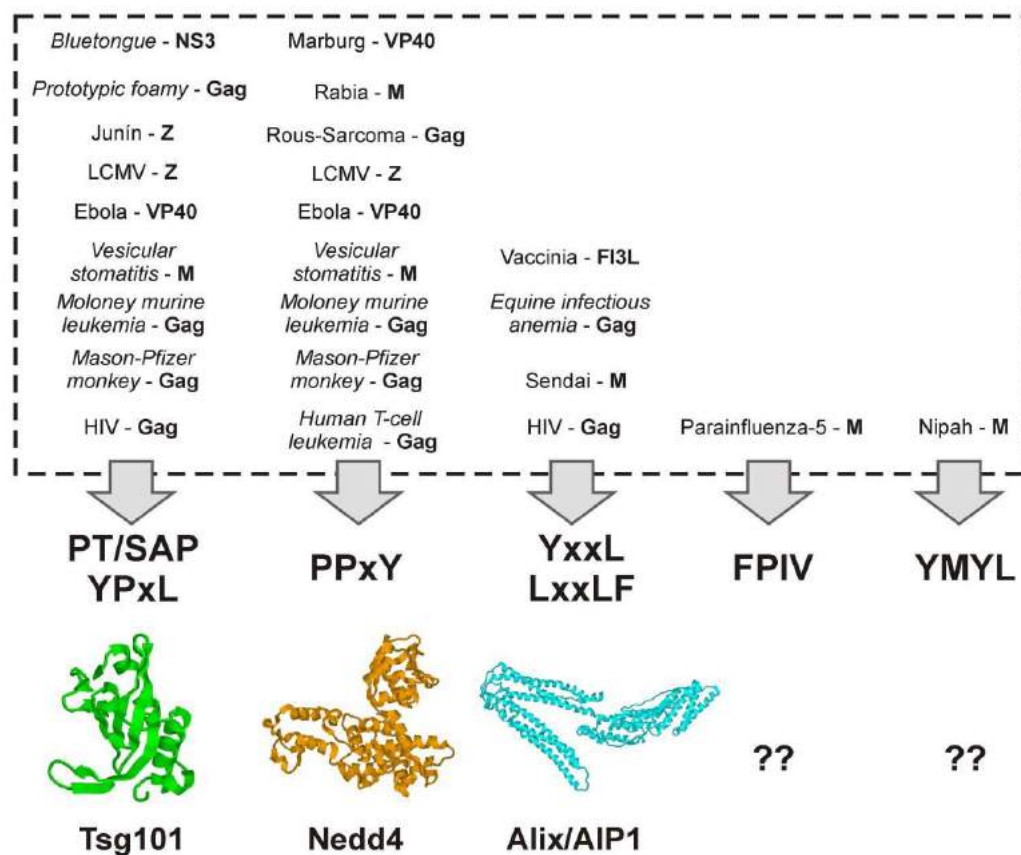


Figura 3.14. Dominios tardíos. Los cinco dominios tardíos reportados se listan en conjunto con las proteínas de los complejos ESCRT de unión a los mismos. Los recientes dominios FPIV (Schmitt *et al.*, 2005) e YMYL (Ciancanelli & Basler, 2006) no poseen proteínas de unión reportadas. En el cuadro superior se listan ejemplos de virus que poseen dominios tardíos en sus proteínas de matriz. Estos datos fueron obtenidos de Chen & Lamb, 2008

Existen dos especies de la familia arenavirus, que no poseen dominios tardíos ricos en prolina, una es miembro de los arenavirus del Viejo Mundo, el virus Merino Walk y la otra especie de los arenavirus del Nuevo Mundo, el virus Tacaribe. En este último, en lugar del motivo PTAP aparece la secuencia ASAP, la cual no se conoce si participa en el proceso de brotación. En cualquier caso, [Urata et al. \(2009\)](#) han demostrado la capacidad de producir partículas brotantes a partir de la sola expresión de Z de TACV, a través de una vía dependiente de ESCRT e independiente de TSg101. Por otro lado, se ha reportado que en el caso de la expresión de Z de TACV, la co-expresión con NP aumenta la formación de partículas tipo virales ([Groseth et al., 2010](#)). Este fenómeno podría ser consecuencia de un reclutamiento de ESCRT por parte de NP la cual, en el caso de TACV, posee motivos YxxL y θ PxV capaces de funcionar como dominios tardíos ([Wolff et al., 2013](#)).

Por otro lado, en el proceso de brotación viral existen dos fuerzas impulsoras necesarias: jalado o *pulling* y empuje o *pushing*. Estas fuerzas se han estudiado detalladamente en el virus Influenza, donde se ha descrito a la fuerza de *pulling* como la estimulación de la curvatura de la membrana por parte de las proteínas de matriz. Por otro lado, la fuerza de *pushing* ha sido adjudicada a la presencia y polimerización de microfilamentos de actina cortical, los cuales unen a las ribonucleocápsides presentes en la partícula viral naciente ([Nayak et al., 2009](#)). Si bien esta hipótesis ha sido estudiada en el virus de Influenza, se ha descrito la presencia de proteínas del citoesqueleto en otros virus envueltos, incluyendo retrovirus ([Damsky et al., 1977](#)), rhabdovirus ([Naito & Matsumoto, 1978](#)) y Arenavirus ([Paisan et al. 1983](#)). En el caso del virus Junín, la doctora Nélida Candurra et al. han descrito la participación de componentes del citoesqueleto en el ensamblaje de la partícula viral ([Candurra et al., 1999](#)). En particular, se describió la interacción de la glicoproteína GP2 con filamentos de actina. Estos datos permitirían hipotetizar la existencia de esta fuerza de *pushing* dentro de los miembros de los arenavirus.

Estudios recientes han reportado que además de los dominios tardíos, la vía de PI3K/Akt está implicada en el proceso de brotación viral de los arenavirus. En el estudio de [Urata y colaboradores \(2012\)](#) observaron la disminución dosis dependiente de la multiplicación de LCMV en células infectadas tratadas con BEZ-235 y LY, ambos inhibidores de la vía de PI3K/Akt. El fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3P) es el producto de la enzima PI3K, el cual es necesario para el ensamblaje del complejo ESCRT en la membrana de los endosomas mediante su reclutamiento. Es posible que las interacciones con ESCRT sean facilitadas en los microdominios ricos en PI3P, y por lo tanto la inhibición de la actividad PI3K disminuya la eficiencia de brotación viral. Incluso, la vía de PI3K/Akt podría estar directamente implicada en la fosforilación de la

proteína Z, de al menos LCMV y LASV, que podría ser necesaria para la brotación viral (Urata *et al.*, 2012). Por otro lado, la inducción de esta vía promueve las señales de supervivencia celulares, inhibiendo las proteínas pro-apoptóticas (Linero & Scolaro, 2009), lo cual es complementario a la función anti-apoptótica descrita para la nucleoproteína viral.

Interacciones con proteínas celulares

Además de la interacción entre la proteína celular Tsg101 y Z mencionada previamente, la proteína de matriz de los arenavirus es capaz de interactuar con otros factores de la célula hospedadora, produciendo efectos variados en el contexto de la infección viral.

• PRH/HEX

La proteína rica en prolina (*Proline-rich Homeodomain Protein*, PRH), también conocida como proteína de homeobox expresada hematopoyéticamente (*Hematopoietically Expressed homeobox*, HEX), pertenece a la familia de factores de transcripción que regulan el desarrollo (Djavani *et al.*, 2005). Es uno de los primeros genes requeridos para el desarrollo del hígado, y también se expresa en tejidos adultos implicados principalmente en los procesos de regeneración vascular y hematopoyesis (Barton *et al.*, 1995). Es importante mencionar que el tejido hepático, el endotelio vascular y las células hematopoyéticas son los principales blancos para los virus de fiebres hemorrágicas, siendo el hígado el órgano de mayor tasa replicativa viral (Lukashevich *et al.*, 2004). Djavani *et al.* propusieron en el año 2005 la hipótesis de que las cepas virulentas de Arenavirus causan disfunción hepática mediante la inhibición de los procesos fisiológicos de reparación del tejido, como consecuencia de la disminución de la producción de PRH y de la dispersión de los cuerpos nucleares de PRH (Djavani *et al.*, 2005). Estudios de doble híbrido en levaduras y de co-precipitación han demostrado la capacidad de la proteína Z, en particular su dominio RING, de interactuar con PRH (Topcu *et al.*, 1999). Si bien la proteína Z en el contexto de infecciones virales con cepas virulentas y no virulentas es capaz de colocalizar con PRH, la translocación los cuerpos PRH al citoplasma y la disminución de la expresión de PRH solo ocurre con las cepas virulentas, lo que en el contexto del individuo podría bloquear el proceso regenerativo.

- PML

La proteína de la leucemia promielocítica (*Promyelocytic Leukemia Protein*, PML) fue descubierta por primera vez como parte de una proteína de fusión presente en la leucemia promielocítica aguda (*Acute Promyelocytic Leukemia*, APL). En el contexto celular gran parte de la proteína PML se encuentra formando complejos multiproteicos de localización nuclear, los cuales poseen varias denominaciones: Dominio nuclear 10 (ND10), cuerpos nucleares, dominios oncogénicos de la leucemia promielocítica (*Promyelocytic Leukemia oncogenic domains* o PODs) o cuerpos de Kremer. Estos complejos están formados por al menos siete proteínas (SP100, NDP52, PIC1, NDP55, factor asociado a PML, una molécula *ubiquitin-like* y PML), y su distribución nuclear se ve alterada durante algunas condiciones patogénicas como en la leucemia promielocítica aguda, infecciones virales y condiciones neurodegenerativas. En particular, en APL una porción de PML (incluyendo el RING) se encuentra fusionada al receptor alfa del ácido retinóico (RAR α) como consecuencia de una translocación cromosomal (de The *et al.*, 1991). Esto produce en la célula una menor inducción hacia la apoptosis. En paralelo se observa que PML-RAR α no forma cuerpos nucleares, mientras que se distingue un patrón citoplasmático punteado (Koken *et al.*, 1994). Esto último sugiere que la integridad morfológica y estructural de los complejos de PML está directamente relacionada con su función pro-apoptótica y supresora del crecimiento. (Melnick & Licht, 1999). Como se mencionó previamente, la distribución de los cuerpos de PML se ve distorsionada en presencia de infecciones virales, incluidos los arnavirus (Borden *et al.*, 1998). Estos virus son capaces de replicar sin producir efectos citopáticos significativos, lo que podría ser consecuencia de una menor inducción de la apoptosis, sin embargo en infecciones agudas se observan disfunción plaquetaria y trombocitopenia, siendo ambos síntomas compartidos con la APL (Tallman & Kwaan, 1992).

La proteína PML de 882 aminoácidos (97,5 kDa) estructuralmente contiene tres dominios ricos en cisteína de unión a Zn⁺², los que son conocidos como RING y cajas B (B1 y B2), y un dominio rico en leucina denominado *coiled-coil* (Borden *et al.*, 1995) (figura 3.15).

Por otro lado, PML se encuentra asociada a la respuesta antiviral de la célula mediante la inducción de la expresión de IFN- α y β , los cuales poseen un efecto inhibitorio de la proliferación celular. (Djavani *et al.*, 2001)

La proteína PML y Z ambas contienen un dominio RING coordinando dos átomos de Zn²⁺. Y se ha descrito que ambas moléculas son capaces de interaccionar *in vitro* e *in vivo*, siendo esto último la causa de la relocalización de los cuerpos nucleares y la

colocalización de ambos péptidos durante la infección viral (Borden *et al.*, 1998). Esta interacción desorganiza los cuerpos nucleares y previene la inducción de interferón, resultando en un aumento de la transcripción y replicación viral (Everett & Chelbi-Alix, 2007).

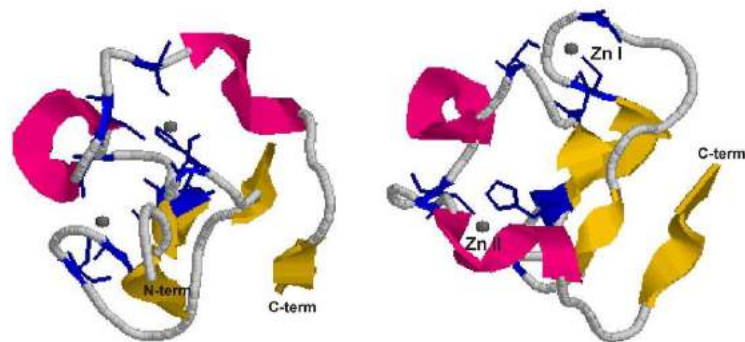


Figura 3.15 Estructura cristalográfica de PML. Las regiones en rosa corresponden a los motivos alfa-hélice, mientras que las flechas amarilla indican β -sheet. Las esferas grises representan los átomos de Zn^{+2} coordinados por el motivo RING. En azul se encuentran destacados los aminoácidos implicados en la coordinación de los átomos de Zn^{+2} . (Cys9, Cys12, Cys23 y Cys32 para el $Zn^{2+}I$; y Cys 24, Hys26, Cys40 y Cys43, para el $Zn^{2+}II$)

Además, Z y PML son capaces de interactuar con el factor de traducción eucariota (eIF4E) independientemente, disminuyendo su afinidad por el m^7GTP y provocando una reorganización de su estructura secundaria, que estabiliza su conformación libre de m^7GTP (Kentsis *et al.*, 2001). Esto último produce la supresión de la traducción *in vitro*.

- **P0**

Tanto PML como Z son capaces de interactuar con las proteínas ribosomales P (P0, P1 y P2) sin afectar su distribución (Campbell Dwyer *et al.*, 2000). Estas proteínas forman parte del complejo ribosomal mayor y son necesarias para la síntesis proteica. La interacción entre las proteínas P y Z podría ser la razón de la presencia de ribosomas y de P0 en la partícula viral. (Leung & Rawls, 1977).

- **eIF4E**

La capacidad de unión entre Z y el eIF4E, fue utilizada por Volpon *et al.* (2010) para permitir la determinación de la estructura tridimensional de la proteína Z de LASV por RMN. Esto permitió identificar un dominio RING en el centro de la proteína Z (residuos 30 a 70) el cual posee una estructura definida, incluida un alfa hélice entre los residuos 50-58. Además posee dos dominios β -sheet antiparalelos (β 1: 42-44, 47-49 y β 2: 63-64, 49-70) y dos regiones *loop* (loop1: 35-39, loop2: 58-62) (figura 3.16 B y C). A su vez, el dominio RING se encuentra coordinando dos átomos de Zn^{+2} (los cuales se numeraron I y II en la Figura 3.16 C).

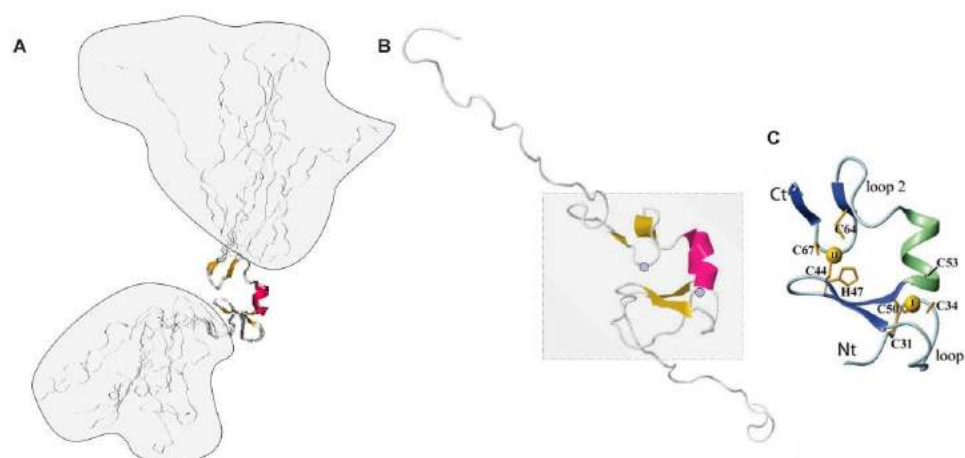


Figura 3.16 Estructura de la proteína Z de LASV asignada por RMN. **A.** Estructura de la proteína Z determinada mediante RMN del complejo Z-eIF4E. Las zonas sombreadas corresponden a los extremos C y N-terminal, los cuales presentan múltiples conformaciones aproximadas (en la figura se encuentran representadas las 10 conformaciones de menor energía). **B.** Estructura de la proteína Z con los extremos asignados a una conformación arbitraria. La región sombreada indica la región central, correspondiente al dominio RING, donde se observan los dos átomos de Zn^{+2} coordinado (círculos grises). La región rosada corresponde a una alfa hélice, mientras que las regiones amarillas corresponden a estructuras beta-plegadas. **C.** Detalle de la región RING, donde se señalan los aminoácidos implicados en la coordinación de los átomos de Zn^{+2} (I y II) indicados como círculos amarillos (C31, C34, C44, H47, C50, C53, C64, C67). Además se indican el loop1 y el loop2 mencionados en el texto. Figura adaptado de Volpon *et al.*, 2010.

El factor eIF4E es un potente oncogén, altamente regulado, que se encuentra altamente expresado en algunos casos de cáncer severo. eIF4E es la proteína que interactúa con el m⁷GTP de los ARNm (figura 3.17), donde los aminoácidos implicados en el sitio de unión con la guanina metilada, utilizan un número de puentes de hidrógeno, tal como lo haría una citosina en la estructura de Watson y Crick (figura

3.18 A y B). Esta interacción induce el comienzo de la traducción y la exportación del ARNm (Hershey, 1994; Rhoads *et al.*, 1994; Shatkin, 1985; Sonenberg, 1994). Ambas actividades se encuentran descontroladas en células malignas, por lo que la regulación de eIF4E suele ser blanco de estudio para terapias oncogénicas. El factor eIF4E es regulado por tres tipos de efectores: aquellos que contienen dominios de unión a eIF4E altamente conservados, como eIF4G o las proteínas de unión a eIF4E (4E-BPs) (figura 3.17); aquellos con dominios RING, como la proteína Z de los arnavirus; y otros como la proteína viral VPg de Potyvirus (Michon *et al.*, 2006). Los integrantes del primer grupo unen a eIF4E por la región dorsal de su superficie (figura 3.19 B), lo que puede aumentar su afinidad por el m⁷GTP incrementando la eficiencia traduccional, como lo hace factor eIF4G (von Der Haar *et al.*, 2000), o pueden producir la disminución de la traducción mediante el secuestro de eIF4E junto con el ARNm (4E-BPs). En la segunda categoría se encuentran las proteínas con dominios RING, como PML y Z, las cuales unen a eIF4E (figura 3.19 A) reduciendo la afinidad por el m⁷GTP, aproximadamente 100 veces (Kentsis *et al.*, 2001).

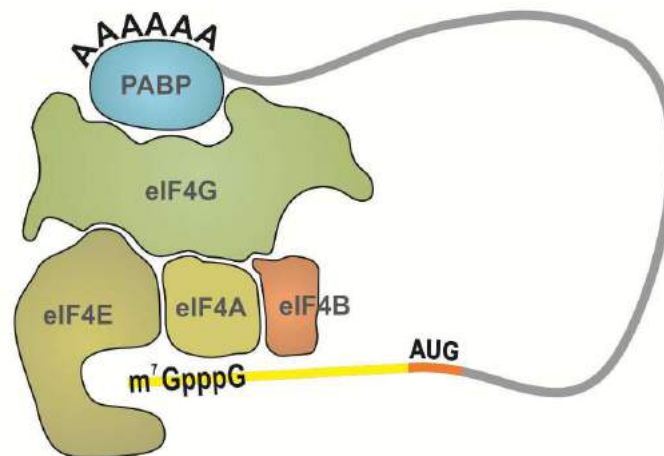


Figura 3.17. Complejo de pre-iniciación ARN mensajero. El ARNm es activado mediante la unión del complejo de pre-iniciación (PIC), el cual se compone de eIF4E, eIF4G, eIF4A e eIF4B, que unen al CAP (m⁷GpppG), y la proteína PABP (*poly(A) binding protein*) que une a la cola de poly(A). La unión del PIC estimula la circularización del ARNm (Sonenberg 2009).

Interesantemente, el tratamiento alternativo a la infección por arnavirus con el nucleósido Ribavirina, el cual inhibe la síntesis de nucleótidos de guanosina y bloquea el ingreso del m⁷GTP al sitio del eIF4E produciendo la inhibición de la traducción CAP-dependiente, ha demostrado ser eficiente *in vitro* e *in vivo* (Damonte & Coto, 2002; McCormick *et al.*, 1986). Se ha documentado la disminución de la mortalidad y

morbilidad en infecciones por LASV cuando se administra la Ribavirina durante los estadios iniciales de la enfermedad, e incluso se han obtenido resultados experimentales similares en infecciones por MACV y JUNV.

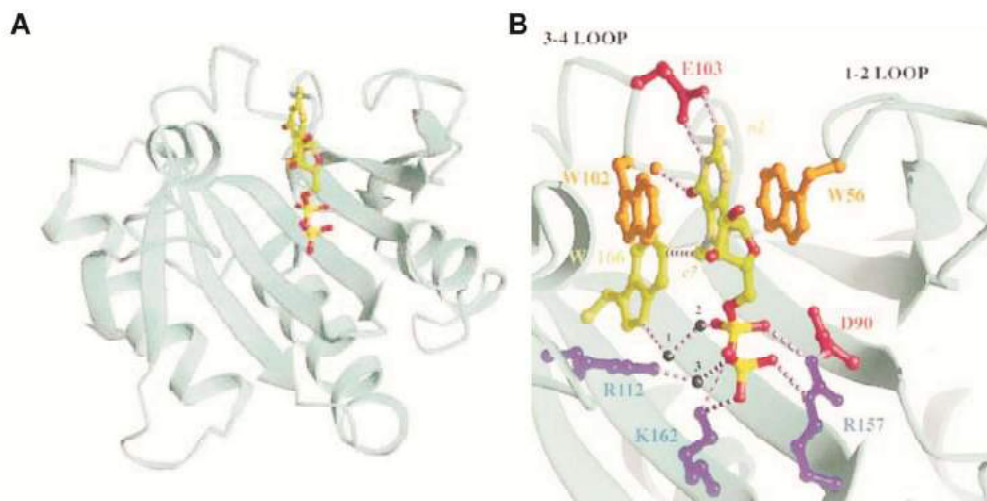


Figura 3.18 A. Estructura cristalográfica del factor eIF4E unida a m⁷GDP. **B.** Detalle del sitio de unión a m⁷GDP. Los residuos seleccionados en colores corresponden a los aminoácidos implicados en el reconocimiento del CAP. Los puentes de hidrogeno e interacciones de *van der Waals* están indicadas en líneas punteadas, mientras que las tres moléculas de agua implicadas están indicadas por esferas negras. Figura adaptada de Kentsis *et al.*, 2001

En un principio Kentsis *et al.* (2001) reportaron que el sitio de unión de Z a eIF4E coincidía con el sitio de unión del factor a eIF4G, siendo el primero más afín que el segundo, lo cual producía el bloqueo del sitio, y la consecuente inhibición de la traducción. Sin embargo, el estudio cristalográfico del complejo Z-eIF4E reveló que el sitio de unión del eIF4E a Z o al eIF4G eran diferentes, siendo el primero más cercano a la primer alfa-hélice (Volpon *et al.*, 2010), lo cual descarta la hipótesis del bloqueo de Z al sitio de unión a eIF4G (figura 3.18).

Por otro lado, la unión de Z a eIF4E fue caracterizada mediante el estudio cristalográfico complementado con estudios de mutagénesis dirigida. De esta manera, fue posible concluir que los residuos implicados en la coordinación de Zn²⁺ del sitio I de Z son indispensables para mantener la actividad de unión, mientras que esto no ocurre para el Zn²⁺ del sitio II. Además mediante estudios biofísicos, se encontró que la unión de Z al factor produce cambios químicos en los aminoácidos del sitio I, mientras que esto no ocurre en el sitio II.

Por último, el eIF4E afecta la expresión de la proteína IRF-7 (*Interferón regulatory factor 7*), la que a su vez regula la expresión de interferón en células dendríticas. Por lo mismo, es posible que Z por medio de la inhibición (en forma indirecta) de IRF-7 en

en células dendríticas infectadas con arenavirus, esté involucrada en la disminución de la respuesta por interferón, lo que permitiría al virus evadir la respuesta inmune innata (Urata & de la Torre, 2011).

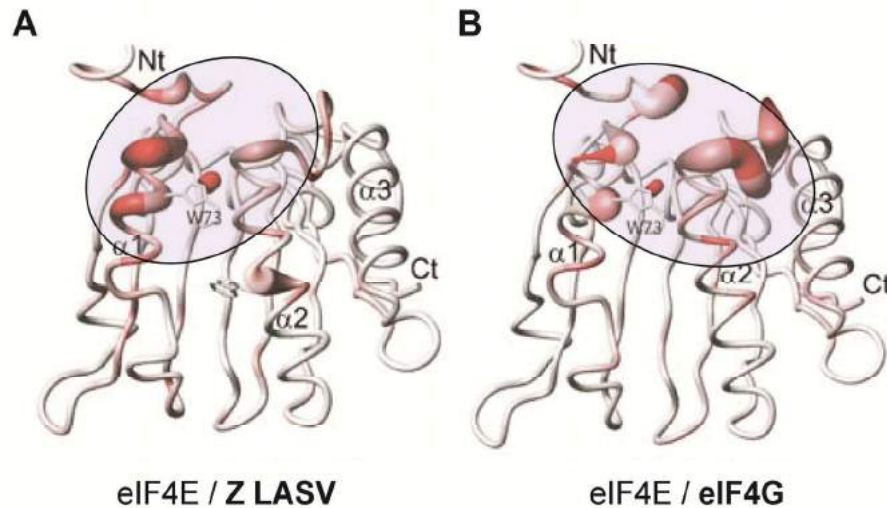


Figura 3.19 Estructura del factor eIF4E. **A.** Región del factor eIF4E la cual interactuar con la proteína Z. **B.** Región del factor eIF4E la cual interactuar con el factor eIF4G. En ambos casos la región sombreada indica la zona de interacción, donde los aminoácidos marcados con rojo son los implicados en la interacción de manera directa. Figura adaptada de Volpon *et al.* 2010.

- **RIG-I**

El sistema inmune innato es capaz de reconocer el contexto de infección viral e inducir una respuesta primaria mediante la producción de interferón α/β . Estas proteínas poseen funciones antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras. El sistema inmune innato es activado a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) capaces de identificar estructuras y patrones conservados entre los patógenos. Algunos de los receptores más importantes son los denominados *Toll-like* y los inducible por ácido retinoico (RIG-I). Este último es capaz de reconocer ARN simple cadena en el citoplasma, siempre que contenga un extremo 5' fosforilado, es decir, que carezcan de la estructura de CAP. A pesar de este sistema de detección, muchos virus (VSV, Influenza, NDV) han evolucionado de manera de evadir este reconocimiento inhibiendo la síntesis de interferón mediante diferentes estrategias.

Se describió que la proteína Z de al menos cuatro arenavirus del Nuevo Mundo (Machupo, Guanarito, Sabia y Junín) son capaces de unir y colocalizar con RIG-I,

interrumpiendo la formación del complejo entre el RIG-I y los MAVS (*Mitochondrial antiviral signaling proteins*) (Fan *et al.*, 2010). Esta interacción impide la activación de NF- κ B y del factor de regulación de Interferón 3 (IRF-3), lo que resulta en una disminución de la inducción de IFN- β . En el trabajo mencionado, la proteína Z del virus Junín fue la que evidenció mayor disminución de la expresión de IFN- β , mientras que los experimentos realizados con las proteínas Z de Lassa y LCM no mostraron una disminución significativa. A pesar de este reporte, recientemente un grupo de investigadores de Universidad de Texas ha reportado la estimulación de Interferón-I durante la infección por el virus Junín (Huang *et al.*, 2012). Por este motivo, resulta interesante analizar la región donde interaccionan RIG-I y Z, para mejorar la comprensión del fenómeno de la modificación de la producción de interferón mediada por la infección de diferentes miembros de la familia *Arenaviridae*.

- **Tsg101**

Como se mencionó previamente, las proteínas Z de los arenavirus del Nuevo Mundo poseen el dominio tardío P[T/S]AP en su secuencia, y son capaces de interaccionar con el factor perteneciente al complejo ESCRT-I, Tsg101. Esta interacción permite el reclutamiento de otros factores de los complejos ESCRT, mediando el proceso de brotación viral.

Oligomerización

El dominio RING en la proteína PML posee funciones análogas a la proteína Z. De la misma manera se ha observado que 50 de los 200 miembros de la familia de proteínas RING se encuentran en forma de estructuras subcelulares visibles al microscopio confocal *in vivo*, tal como ocurre con PML (Kentsis *et al.*, 2002a). Esta función está ligada al dominio RING, debido a que cambios en este dominio producen la pérdida de la capacidad de oligomerizar. Esto fue observado *in vitro* para la proteína Z purificada producida en *E. coli* (Kentsis *et al.*, 2002b). Si bien los autores demostraron la importancia del motivo RING de la proteína Z para la función de autoasociación, la ausencia de modificaciones postraduccionales (como la miristoilación) en el sistema procariota impide el estudio de esta característica en el contexto de la infección viral o de su asociación con la membrana plasmática. Por otro lado, los estudios *in vitro* permitieron analizar el contexto termodinámico y cinético de la asociación, donde fue posible determinar un mecanismo único no fibrilar y ordenado de autoensamblaje, en el cual Z se estructura de a 24 subunidades (en seis arreglos

tetraméricos) formando cuerpos de aproximadamente 500Å, equivalentes en tamaño a los observados *in vivo* en células infectadas con arenavirus.

Posteriormente se demostró que la proteína Z de TACV y JUNV son capaces de auto-asociarse en formas oligoméricas en células de mamífero, aún en ausencia de otras proteínas virales, siendo el aminoácido G2 el determinante para la unión Z-Z. Esto implicaría que la homo-oligomerización de Z estaría asociada a la miristoilación y al anclaje a membrana (Loureiro *et al.*, 2011). Alternativamente se propone que el direccionamiento a membrana podría inducir cambios conformacionales en Z que a su vez inducirían la homo-oligomerización, lo que finalmente estabilizaría la unión de Z a la membrana plasmática, tal como fue sugerido para VP40 de Ebola y gag de HIV (Hoenen *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2007). Por último, mediante mutagénesis dirigida fue demostrada la importancia del motivo RING y el dominio LPTK en la oligomerización de Z (Wang *et al.*, 2012).

Interacción con proteínas virales

Si bien se ha especificado la interacción de Z con cada una de las proteínas virales, es interesante resumirlas en el contexto de la infección viral.

La asociación entre la proteína Z y la glicoproteína es dependiente de la miristoilación de la primera. Mientras que GPC es capaz de migrar a los sitios de ensamblaje por sí sola, como se mencionó en el caso de células polarizadas, es la interacción entre GPC y Z la que las colocaliza y permite la brotación de la partícula viral con las espículas de la glicoproteína en su superficie. Esto es de esencial importancia para el posterior reconocimiento del receptor celular, el cual permite mediar la entrada del virus. Por otro lado, la interacción entre Z y N, junto con el factor celular AIP1 promueven la incorporación de NP a los viriones. Si bien se ha descrito que NP y las proteínas derivadas de GPC no son capaces de interactuar físicamente, es Z la que interacciona con ellas, funcionando como “puente” y asegurando de esta manera la incorporación de NP y de las proteínas derivadas de GPC a la partícula viral. Por último, Z y L forman un complejo que inhibe la iniciación de la síntesis de ARN, contribuyendo a la regulación de la finalización de la etapa de replicación y el comienzo del estadio final de ensamblaje viral, y asegurando de esta manera la incorporación de L en el virión. De esta manera, Z funciona como un actor central en todos los procesos del ciclo viral, lo que hace de la proteína Z un blanco estratégico para la búsqueda de antivirales para el tratamiento de infecciones por arenavirus.

Antivirales

Además de la previamente mencionada terapia antiviral con Ribavirina existen otros compuestos descriptos como inhibidores del ciclo viral. En particular se han descripto numerosos antivirales que utilizan como blanco a la proteína viral Z. En términos genéricos, la estrategia utilizada fue la evaluación de antivirales, ya sean previamente descriptos o derivados de los mismos de manera tradicional o masiva. Un ejemplo de esto último es el trabajo de (Capul y de la Torre, 2008) donde se describió un ensayo *High Troughput* para la evaluación de inhibidores del proceso de brotación basado en la construcción de una proteína de fusión entre Z y el dominio C-terminal de la luciferasa de *Gaussias* (Gluc). La posibilidad de efectuar mediciones rápidas y cuantitativas a partir del sobrenadante un cultivo de células tratadas, permite realizar una primera clasificación entre los compuestos evaluados, para luego analizar su potencial en el contexto de la infección viral.

El grupo de investigación de la Dra. Damonte en la UBA ha realizado grandes aportes en este campo, comenzando en el año 2000 con el estudio de antiretrovirales específicos de proteínas RING otorgados por *The National Cancer Institute* (EE.UU.), utilizándolos en el modelo de las infecciones provocadas por el virus Junín (García *et al.*, 2000). Entre los compuestos previamente seleccionados como inhibidores significativos del ciclo viral, el disulfuro aromático NSC20625 se destacó por su significativa actividad y por su interferencia nula con otras proteínas RING celulares. En el trabajo publicado por García *et al.* (2006) se observó que partículas virales previamente tratadas con este disulfuro aromático, retenían su actividad de unión y entrada a la célula, pero no eran capaces de realizar la replicación viral. Posteriormente en el año 2009, nuevamente García *et al.* (2009) describieron detalles del mecanismo de acción de este compuesto. En su estudio, se observó que partículas de JUNV tratadas con NSC20625 evidenciaban alteraciones en la migración electroforética de Z en condiciones no reductoras, una marcación electrodensa en la membrana de partículas tratadas (observadas por microscopía electrónica), cambios en la distribución celular de Z y la imposibilidad de desarmar el revestimiento de las nucleocápsides virales durante la infección. Estas evidencias permitieron hipotetizar un mecanismo de acción del compuesto NSC20625 sugiriendo la inducción de la oligomerización de Z, probablemente debido a la expulsión de los iones metálicos y a la formación de enlaces disulfuro intermoleculares a través de los residuos de cisteína del dominio RING (García *et al.*, 2009).

En el año 2010 el mismo autor demostró la especificidad de NSC20625 para actuar sobre el dominio RING de Z, sin interferir sobre miembros celulares de esta familia, como PML (García *et al.*, 2010). Además, evidenció que en las células infectadas con JUNV y tratadas con el antiviral, se restablecía el patrón nuclear punteado característico de PML necesario para su actividad supresora de la proliferación celular que cambiaba durante la infección viral (Djavani *et al.*, 2001). Además de NSC20625, el grupo de la Dra. Damonte postuló otros tres nuevos compuestos como posibles antivirales para el virus Junín (NSC4492, NSC71033 y NSC14560), los cuales han evidenciado una inhibición significativa en la expresión de las proteínas virales y la oligomerización de la proteína Z similar a la previamente descrita (Sepulveda *et al.*, 2010). Por último, abordando otro tipo de estrategia, también se demostró la efectividad en la utilización de ARNs de interferencia pequeños (siARNs) como compuestos antivirales, usando como blanco la proteína de matriz del virus Junín (Artuso *et al.*, 2009). Si bien los antivirales basados en siARNs aún no se encuentran aprobados, numerosas compañías farmacéuticas investigan esta propuesta. Actualmente, estudios en HBV y HIV se encuentran en fase I, mientras que tratamientos contra Rous Sarcoma Virus utilizando siARN está en fase II.

El uso de compuestos sintéticos como antivirales ha demostrado ser eficiente, sin embargo existen componentes celulares capaces de comportarse de manera análoga.

La proteína *Tetherin* o Teterina (también conocida como BST2 por *bone marrow stromal antigen 2*, CD317, o HM1.24) ha sido identificada como un factor celular capaz de inhibir la brotación de partículas virales. Inicialmente fue descrita en células infectadas con HIV-1 (Neil *et al.*, 2008), aunque también se comprobó el mismo efecto inhibitorio de la brotación de los virus Lassa y Marburg (Sakuma *et al.*, 2009). Esta proteína se encuentra asociada a la membrana plasmática a través de un dominio transmembrana situado en su región N-terminal. Además posee un dominio central extracelular y un extremo C-terminal de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Se describió que la expresión constitutiva de teterina en células infectadas con LASV y MACV es capaz de disminuir la producción de partículas virales, lo que permite hipotetizar acerca de la ausencia de una función antagonista a teterina presente en el virus. Este efecto permitiría demorar la propagación viral de modo de facilitar la acción de la respuesta inmune (Urata & de la Torre, 2011).

Otra alternativa que permite demorar el ciclo viral es la utilización de inhibidores de la vía P13K/Akt. La vía de la fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K)/Akt participa en numerosos procesos celulares, incluyendo la proliferación y diferenciación celular, y recientemente se ha reportado que esta vía se encuentra activada durante la infección con JUNV (Linero & Scolaro, 2009). En este mismo trabajo se evidenció que la

inhibición de esta vía disminuía la progenie viral, debido a un bloqueo en el reciclaje del receptor de transferrina involucrado en la entrada viral. La utilización de antivirales que posean como blanco la vía PI3K/Akt podría reducir la velocidad de propagación viral, lo que proporcionaría al hospedador una ventana para montar una respuesta inmune eficaz (Urata *et al.*, 2012). Actualmente existen numerosos inhibidores de esta vía previamente caracterizados en estudios oncológicos (BEZ-235, LY, entre otros), lo que permite la rápida obtención de información sobre la citotoxicidad y blancos de acción de los mismos.

Teniendo en cuenta que el proceso de brotación viral es dependiente de la interacción entre Z y las proteínas del ESCRT, se ha pensado en esta asociación como un posible blanco antiviral. Si bien la disrupción del funcionamiento normal del mecanismo de transporte multivesicular a través de las proteínas de los complejos ESCRT podría resultar en efectos citotóxicos inaceptables, las infecciones por arenavirus inducen procesos agudos, por lo que se podría evaluar la aplicación de compuestos inhibidores de los miembros de ESCRT que produzcan una inhibición a corto plazo.

Por último, en el año 2004 Cornu y colaboradores reportaron a la proteína Z como un antiviral *per se* capaz de producir un efecto inhibitorio sobre la polimerasa viral de manera específica (Cornu *et al.*, 2004).

CICLO VIRAL

Una vez detalladas las funciones de cada uno de los componentes virales y sus interacciones, las cuales se resumen en la **figura 3.20**, es necesario describir su participación en el contexto de la infección viral.

El ciclo comienza con el ingreso del virión a la célula a partir de la unión de la proteína G1 al receptor celular específico, el cual en el caso del virus Junín y los virus que utilizan el receptor de transferrina, es internalizado por endocitosis mediante vesículas cubiertas de clatrina (*clathrin-coated vesicles*, CCVs), mientras que los Arenavirus que unen al receptor de α -dextróglicano lo hacen por la vía de MVBs y los complejos ESCRT. A continuación la membrana del virión se fusiona a la membrana del endosoma tardío en un evento dependiente de la acidificación del pH local. Esto induce un cambio conformacional en G2, exponiendo así las regiones con actividad fusogénica. La posterior unión de las membranas libera la nucleocápside directamente al citoplasma celular y es allí donde comienza la síntesis de los ARN mensajeros, a partir de los segmentos genómicos virales.

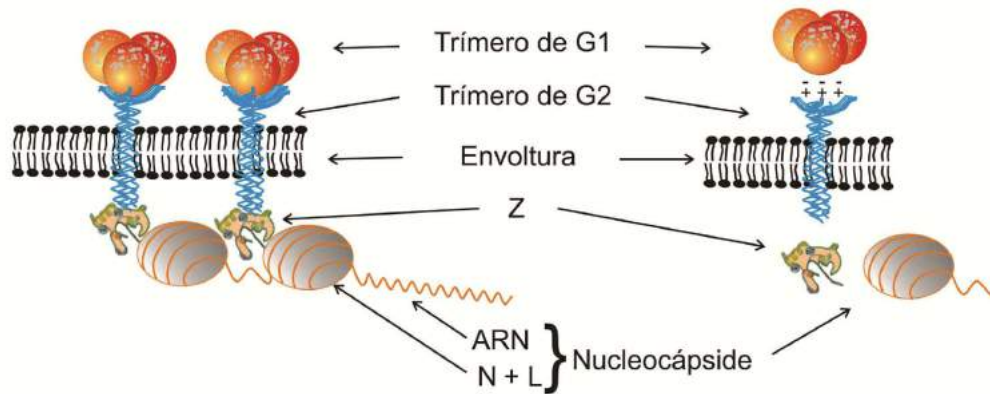


Figura 3.20 Interacción entre las proteínas del virus Junín. Las glicoproteínas G1 y G2 se muestran como trómeros, los cuales se mantienen unidos por interacciones electrostáticas. El endodominio de G2 interactúa con Z, la cual interactúa a la vez con las nucleocápsides virales, las que a su vez contienen a la proteína N, L y al genoma viral.

Debido a la estrategia de codificación ambisentido de los arenavirus, es necesario que en el virión se encuentre al menos una molécula de la ARN polimerasa dependiente de ARN viral (proteína L) para poder comenzar la transcripción del genoma viral. Una vez iniciada la transcripción del genoma ingresado, se generan numerosas copias de las especies de orientación antígenómica del ARN viral, los ARNm de L y N, y más adelante, probablemente después de la traducción consistente de las proteínas L y N, los ARNs S y L antígenómicos, que actúan como formas replicativas. Estas formas replicativas actúan como moldes para la síntesis de las especies de orientación genómica del ARN viral (S y L) y de los ARNm tardíos de Z y de GPC. Esta estrategia replicativa permite la expresión de las distintas proteínas virales en las etapas correspondientes del ciclo viral. En consecuencia, el complejo GPC es ensamblado en microdominios en la membrana plasmática, junto con Z, la cual es direccionada a membrana junto con las nucleocápsides previamente reclutadas (formadas por el genoma viral asociado a NP y L). Por último, se produce el ensamblaje de la partícula en la membrana plasmática y la brotación del virión mediada por la actividad de la proteína Z. En la **figura 3.21** se muestra un esquema del ciclo descripto.

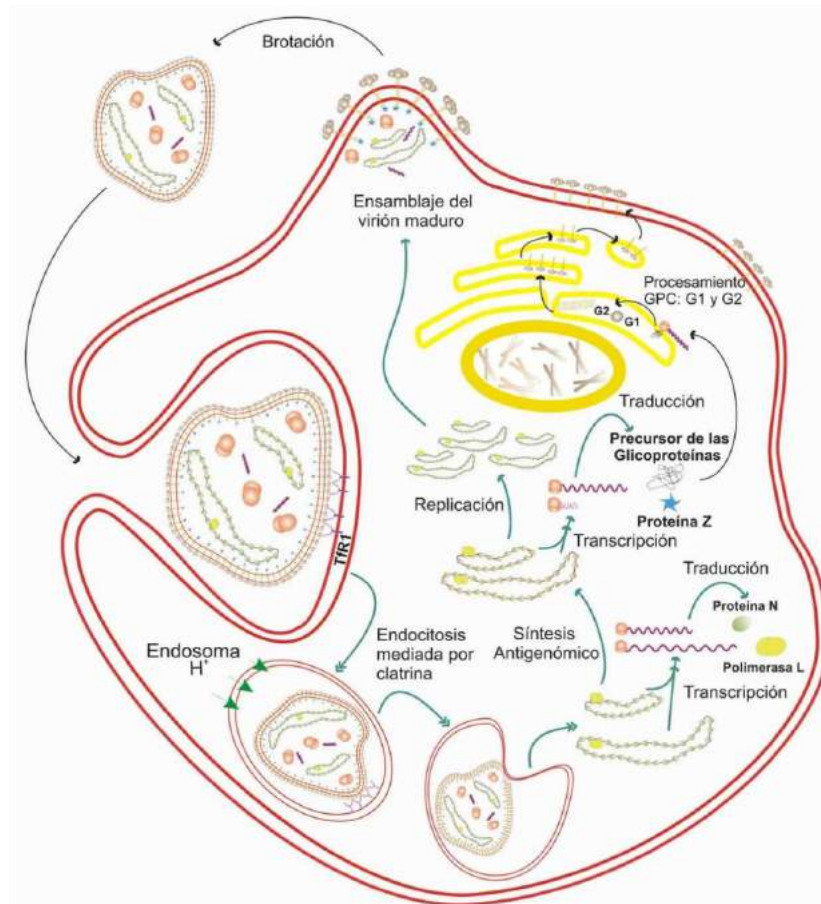


Figura 3.21 Esquema del ciclo de infección arenaviral. El comienzo del ciclo ocurre con la unión de la partícula viral al receptor celular, en este ejemplo el receptor de transferrina para los virus del Nuevo Mundo, lo que produce la internalización de la partícula a través de una endocitosis mediada por clatrina. Luego a partir de la acción de la glicoproteína se produce la fusión de la membrana viral con la de la vesícula, produciéndose así la liberación del genoma viral al citoplasma celular. Esto desencadena la transcripción del genoma y la síntesis del antígeno. A partir de la transcripción se produce en una primera etapa la proteína L y N, y a partir del antígeno se sintetizan nuevas cadenas genómicas, las cuales serán incorporadas en los viriones nacientes. A partir de estas moléculas se transcriben los genes de z y gpc. Estas proteínas serán transportadas a la membrana plasmática donde se terminarán de ensamblar los nuevos viriones.

Si bien esta concatenación de eventos puede deducirse de la suma de los estudios realizados sobre cada uno de los procesos por separado, estudios de criomicroscopía electrónica y de microscopía de fluorescencia han permitido estudiar en detalle la localización de una gran parte de los componentes celulares y virales involucrados.

En primer lugar el trabajo de Neuman y colaboradores (2005) analizó la estructura de los virus Pichinde, Tacaribe y LCM por criomicroscopía electrónica (Neuman *et al.*, 2005). A partir de este estudio se demostró la estructura pleomórfica y envuelta de las partículas, junto con la presencia de las espículas correspondientes a los complejos de las proteínas derivadas de GPC. Además, se evidenció la presencia de dos subcapas electrodensas por debajo de la bicapa lipídica (BL) derivada de la membrana plasmática en la región interna de las vesículas, las cuales fueron asignadas a las proteínas Z y NP, respectivamente (figura 3.22).

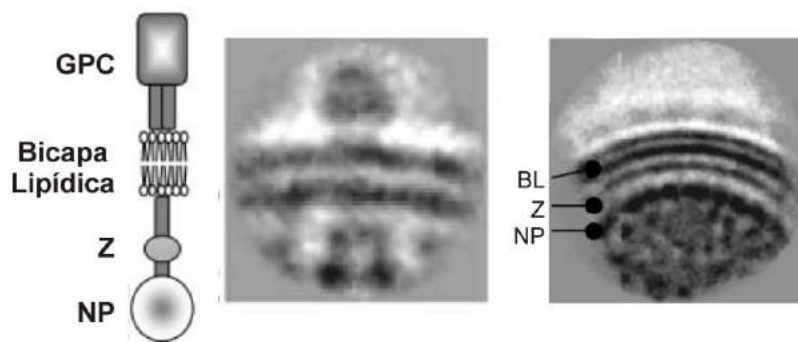


Figura 3.22 Criomicroscopía electrónica de los virus Pichinde, Tacaribe y LCM. El esquema a la izquierda representa a las proteínas virales según lo que se observa en las criomicroscopías. Imágenes extraídas de (Neuman *et al.*, 2005) Bicapa lipídica (BL), Nucleoproteína (NP) y complejos de las proteínas derivadas de GPC (GPC)

Por otro lado, Schlie *et al.* (2010) realizaron un trabajo extenso sobre la localización de las proteínas virales GPC, NP y Z, fuera del contexto viral, en células en cultivo. Primero, se realizaron estudios de localización de las proteínas virales luego de ensayos de expresión de esas proteínas solas, sin el agregado de ninguna otra proteína viral. En estos ensayos, las proteínas derivadas de GPC localizan en estructuras membranosas dentro del citoplasma, muy probablemente en el retículo endoplásmico, y en la membrana plasmática (figura 3.23 A). Por su parte, la nucleoproteína NP se distribuye uniformemente por todo el citoplasma con un patrón punteado (figura 3.23 B). En contraste, la proteína Z se localiza en grandes parches alrededor del citoplasma (figura 3.23 C). Luego, se realizaron estudios de localización de las proteínas virales después de ensayos de co-expresión de esas proteínas a pares o de la triada. Después de la co-expresión, GPC y Z muestran una colocalización parcial en estructuras vesiculares perinucleares (figura 3.23 D a H). También se observó la colocalización parcial de la nucleoproteína y Z, aunque la co-

expresión no modifica el patrón correspondiente al obtenido de la expresión individual de cada una de ellas (**figura 3.23 J a M**). Por el contrario, después de la co-expresión, GPC y NP no evidencia colocalización de las mismas (**figura 3.23 N a R**). Sin embargo, después de la co-expresión de las tres proteínas, GPC, Z, y NP colocalizan en estructuras vesiculares en la región perinuclear, similares a las observadas después de la co-expresión de GP y Z (**figura 3.23 S a W**).

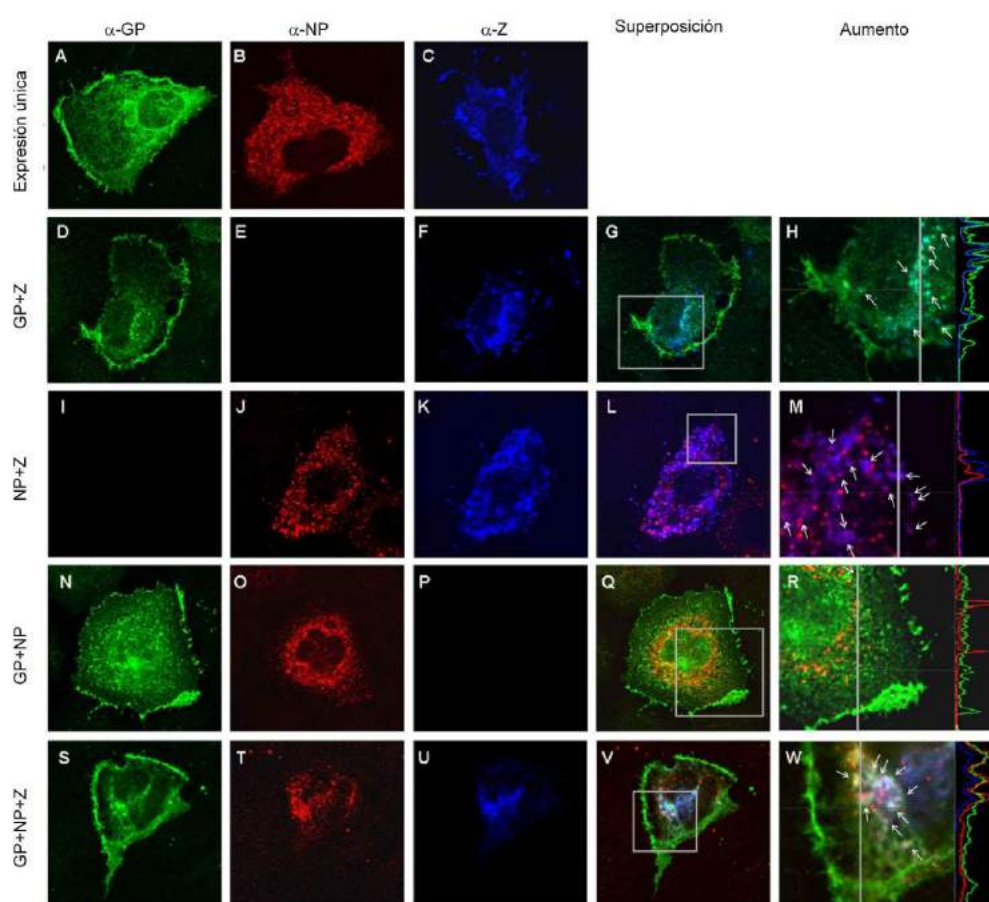


Figura 3.23 Colocalización intracelular de las proteínas GPC, Z, y NP del virus Lassa. Inmunofluorescencia confocal de células epiteliales Huh 7 transitoriamente transfectadas para la expresión de GPC, Z y NP. Figura tomada de [Schlie *et al.*, 2010](#)

Por último, en este mismo trabajo Schlie *et al.* analizaron la polaridad de la entrada y la salida del virus LCMV en células epiteliales, evidenciando una significativa diferencia. En el proceso de entrada viral se observó una preferencia por la región basolateral de las células, sitio donde también se observó una mayor cantidad del receptor α -distribuglicano. Por otro lado, en la salida viral se evidencio una marcada

preferencia por la región apical de las mismas células, donde también se observó la acumulación de las proteínas derivadas de GPC, independientemente de la expresión de otras proteínas virales (figura 3.24).

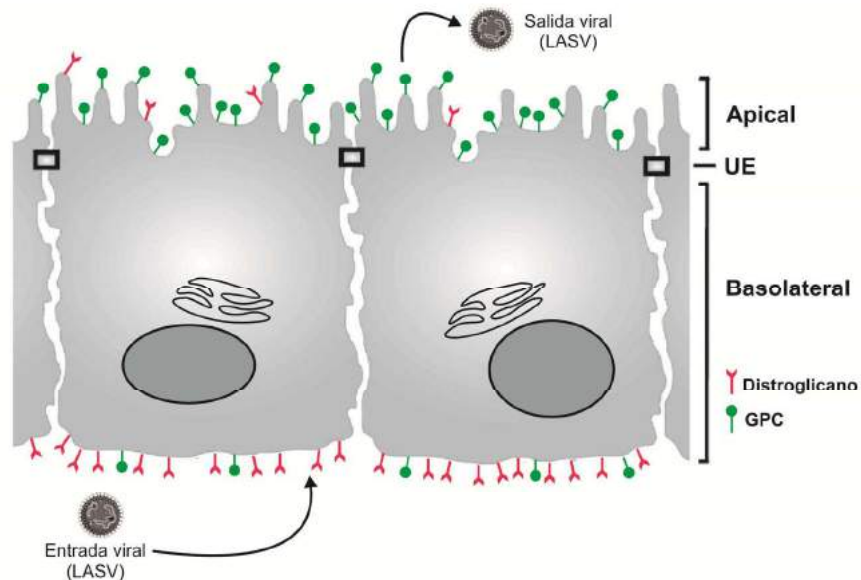
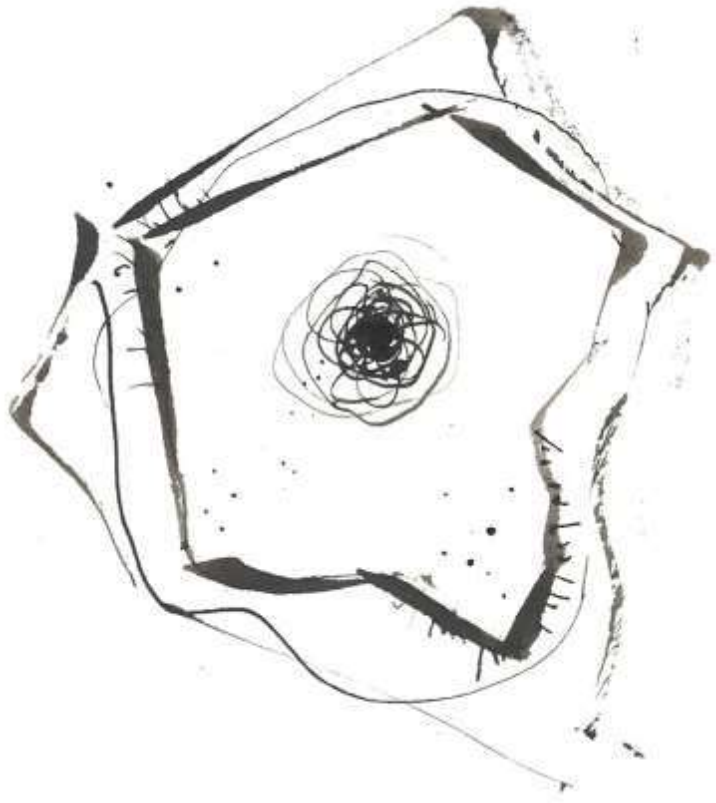


Figura 3.24 Esquema de células epiteliales polarizadas. Las regiones apical y basolateral se señalan en el dibujo, junto las uniones estrechas (UE) o *Tight junction*. El receptor α -distroglicano y el complejo GPC se esquematizan con símbolos rojos y verdes, respectivamente.

Se conoce que los virus que se transmiten a través de aerosoles o por contacto con la superficie de los líquidos corporales, en general atraviesan la barrera epitelial a través de la región apical. Mientras que las infecciones debidas a lesiones o picaduras de insectos entran al tejido desde la región basolateral. En el caso de las fiebres Hemorrágicas por arenavirus, el contagio ocurre a través de los aerosoles de las excreciones de los roedores, lo que no sería compatible con los resultados de Schlie y colaboradores que estamos discutiendo. Sin embargo, en una publicación del año 2008 se sugiere que en los casos de JUNV y LCMV se requiere la presencia de lesiones en el tejido epitelial de las vías respiratorias para que la infección viral ocurra (Dylla *et al.*, 2008).



PARTÍCULAS TIPO VIRALES Y
PROTEÍNAS DE MATRIZ
CAPÍTULO 4

PARTÍCULAS TIPO VIRALES O *VIRUS-LIKE PARTICLES*

La primera vacuna desarrollada por Edward Jenner para combatir la viruela en el año 1796, aunque solo recuperaba para el mundo occidental prácticas y experiencias desarrolladas mucho tiempo antes en china, india y Medio Oriente, fue el inicio de una nueva era en la investigación biomédica. A partir de este descubrimiento se desarrollaron múltiples vacunas veterinarias y humanas basadas en virus inactivados o atenuados, lo que redundó en un gran avance en la calidad de vida de los seres humanos. Si bien las vacunas han sido exitosas, existen algunos casos fallidos de virus que revirtieron a la forma más patogénica o que solo fueron parcialmente inactivados.

Como consecuencia, en la década del 70' del siglo XX, se describió por primera vez que era posible producir una vacuna a partir de una única proteína viral. Finalmente, en el año 1981, Kleid y colaboradores lograron clonar y expresar el polipéptido VP3 de FMDV (foot-and-mouth disease virus) en *E. coli* y producir una vacuna útil para cisnes y ganado, logrando así la primer vacuna generada por técnicas de ingeniería genética (Kleid *et al.*, 1981). Gracias a los avances en la tecnología de ADN recombinante, cinco años después se logró obtener la primer vacuna comercial a subunidad, la vacuna para hepatitis B a partir de su antígeno de superficie (HBsAg). Si bien este tipo de vacunas son eficientes, la expresión de una proteína viral aislada no mimetiza totalmente la naturaleza del agente infeccioso. Es por eso que actualmente las vacunas basadas en partículas de tipo virales (VLPs por *virus-like particles*) se postulan como soluciones prometedoras. Esto se ve acentuado luego de haberse obtenido las primeras vacunas licenciadas por la autoridad Federal de manejo de drogas de EE.UU. (FDA), basadas en la tecnología de VLPs, las vacunas contra el virus del papiloma humano Gardasil® (Merck & Co) y Cervarix® (GlaxoSmithKline's), en los años 2006 y 2009 respectivamente.

Propiedades biotecnológicas

Las VLPs son partículas auto-ensambladas, no replicativas y no patogénicas, con propiedades inmunogénicas naturales capaces de mimetizar la organización y la conformación del virus auténtico. Esto último hace que las VLPs posean epítopes conformacionales similares al virus complejo, por lo que se presupone mayor potencial inmunogénico. Por otro lado, la alta repetitividad de epítopes en la superficie de las VLPs es capaz de inducir respuestas humores mayores en ausencia de adyuvantes, en comparación a los epítopes solubles o aislados.

Las VLPs han sido ampliamente utilizadas en diversos campos de la biología. Se han empleado como plataforma para vacunas contra agentes infecciosos, contra el cáncer y

para la vehiculización o *delivery* de genes, proteínas o drogas (Chang *et al.*, 2011; Gamaley *et al.*, 2010; Kaczmarczyk *et al.*, 2011; Ramqvist *et al.*, 2007). La utilización de sistemas basados en VLPs presenta diversas ventajas, en particular la ausencia de ácidos nucleicos en las partículas hace que las mismas puedan ser obtenidas en laboratorios genéricos, carentes de sistemas sofisticados de contención biológica (Chackerian, 2007; Mena & Kamen, 2011). La naturaleza particulada y las dimensiones de las VLPs (25-200 nm) hacen que estas sean eficientemente internalizadas por las células presentadoras de antígenos (APC), en particular, las células dendríticas (DC), quienes transportan los antígenos a los nodos linfáticos para su posterior presentación e inducción de la respuesta inmune. Además, las DC poseen la capacidad de realizar la presentación cruzada de los antígenos endocitados, de manera tal que los mismos podrían ser expuestos utilizando la vía de MHC I y de MHC II. Esta última es más eficiente con antígenos derivados de partículas estructuradas que utilizando antígenos solubles (Harding & Song, 1994; Kovacs-Bankowski *et al.*, 1993; Storni & Bachmann, 2004).

Actualmente se están desarrollando diversas vacunas basadas en VLPs (Roldao *et al.*, 2010), las cuales se encuentran en distintos estadios de evaluación. Las plataformas de cada sistema, varían según el blanco viral evaluado. Desde virus proteicos a virus envueltos, en sistemas procariotas a sistemas eucariotas (levaduras, células de insecto, células de mamífero, etc.). Esto demuestra la amplia versatilidad de la producción de VLPs, permitiendo la obtención de VLPs quiméricas, que permiten vehiculizar antígenos foráneos al sistema viral utilizado para producir las partículas tipo virales.

Las VLPs estructuralmente simples, compuestas por una o dos proteínas, pueden obtenerse en sistemas de producción bacterianos. Si bien la producción de proteínas en bacterias es sencilla y poco costosa, ningún desarrollo basado en este tipo de sistemas ha logrado ser comercializado para uso humano. Esto es consecuencia de la ausencia de modificaciones postraduccionales complejas en los sistemas bacterianos y al incremento de los costos de producción al momento de eliminar completamente las toxinas bacterianas. Por otro lado, los sistemas de producción en levaduras poseen algunas de las ventajas de los sistemas bacterianos en conjunción con algunos beneficios de los sistemas eucariotas. Actualmente existen 4 vacunas basadas en VLPs producidas en levaduras aprobadas por la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) y la Agencia europea de medicamentos: Recombivax HB® ((Merck & Co, vacuna recombinante anti hepatitis B), Engerix-B® (GlaxoSmithKline's, vacuna recombinante anti hepatitis B), Hepavax-Gene® (GreenCross Vaccine Corporation, vacuna recombinante anti hepatitis B) y Gardasil® (Merck & Co, vacuna recombinante anti papiloma humano).

Para la obtención de VLPs más complejas pueden utilizarse los sistemas de expresión en células de insecto utilizando baculovirus, los cuales presentan ventajas frente a los

sistemas de células de mamífero. Son sistemas biotecnológicamente eficientes, en los cuales las proteínas sobrepresadas pueden alcanzar hasta el 30% de las proteínas totales. Las células de insecto, como las levaduras y las bacterias, pueden ser cultivadas en suspensión, alcanzando altas densidades (Aucoin *et al.*, 2010), lo que facilita el proceso de escalado. También están disponibles variantes de medios de cultivo definidos (libres de suero fetal bovino), lo cual evita la problemática y compleja remoción final de residuos del suero y no requiere de incubadoras gaseadas con CO₂. En resumen, la utilización de células de insecto disminuye los costos y la complejidad en las etapas de producción. Las células de insecto son capaces de realizar modificaciones postraduccionales similares a las células humanas, carecen de pirógenos y patógenos humanos, y si bien los baculovirus son capaces de transducir células de mamífero, están imposibilitados de replicar en las mismas (Airenne *et al.*, 2009). Sin embargo, la principal desventaja y limitante de este sistema es la significativa co-producción y co-purificación de los baculovirus brotantes. Esto aumenta la complejidad del proceso de purificación posterior de las vesículas, o requiere la inactivación de los baculovirus, pudiendo afectar al producto final obtenido. Si bien esto último implica algunas desventajas del sistema, la reciente aprobación de la FDA de la vacuna Cervarix® producida en células de insecto y de la vacuna terapéutica Provenge®, ambas en 2009, abre la puerta a futuros desarrollos en la medicina humana. Por otro lado, para las vacunas de uso veterinario, este tipo de sistemas basados en células de insecto/baculovirus podrían ser una muy buena opción, dado que la presencia de baculovirus inactivados en la preparación han demostrado poseer características adyuvantes (Hervas-Stubbs *et al.*, 2007, Abe & Matsuura 2010).

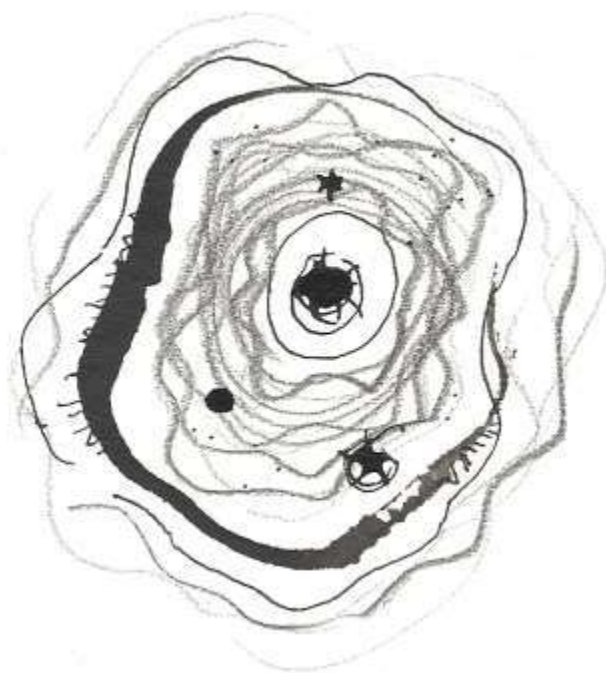
Uno de los sistemas que aún no ha obtenido una vacuna licenciada, pero que resulta prometedor, es el sistema de producción en plantas transgénicas. Estos son sistemas seguros, de bajo costo y de fácil escalado. Sin embargo, su mayor desventaja es la ausencia de modificaciones postraduccionales complejas, junto con la dificultad de obtener VLPs correctamente ensambladas y estables

Finalmente, en el caso de que sean necesarias modificaciones postraduccionales complejas los sistemas más adecuados a utilizar son los de células de mamífero. Si bien su mayor desventaja son los altos costos en la producción, tanto en el proceso previo o posterior a la generación de vesículas, las eficiencias obtenidas son similares a las de los sistemas de células de insecto/baculovirus (1mg/l).

Como se ha detallado en este capítulo, existen diversas plataformas de producción de VLPs y numerosos sistemas de expresión para cada uno de ellos, debiéndose hallar la combinación correcta para cada caso en particular. Actualmente existe una clara tendencia de las empresas farmacéuticas a la utilización de las VLPs como plataformas para la producción de vacunas seguras. El desafío consiste en hallar sistemas de producción a

bajo costo, para que los productos obtenidos de estos desarrollos sean abordables para los países subdesarrollados. Como consecuencia de los resultados presentados en esta tesis, se discute la posibilidad de generar una plataforma genérica de producción de VLPs basada en las características funcionales de la proteína Z del virus Junín.

SECCIÓN II
ESTUDIOS BÁSICOS DE
LA PROTEÍNA Z



ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

CAPÍTULO 5

INTRODUCCIÓN

La proteína Z de los arenavirus posee un tamaño de 99 a 105 residuos aminoacídicos, según la especie viral. El 60% de los mismos participan en la formación del dominio RING ubicado en el centro de la proteína, el cual coordina dos átomos de Zn^{2+} . Además, como se detallará a continuación, existen otras regiones altamente conservadas entre las especies virales, algunas representativas de la familia viral y otras de alguno de sus clados.

Por otra parte, como se mencionó en el capítulo 3, las funciones asignadas a la proteína Z son numerosas y variadas. En este sentido, es probable que haya existido una optimización evolutiva de la secuencia proteica donde cada una de las regiones conservadas haya jugado un rol central en la determinación de las funciones de la proteína, promoviendo su unión tanto a proteínas celulares del huésped como a diferentes proteínas virales. Esto permite formular una serie de preguntas sobre la relación de Z en el ciclo replicativo viral. En este capítulo se analizará la estructura primaria de la proteína Z, y se describirá la función de cada uno de sus dominios y sus regiones conservadas.

RESULTADOS

Alineamiento de secuencias aminoacídicas

Con el objeto de analizar la secuencia aminoacídica de la proteína Z en la familia *Arenaviridae*, se realizó un alineamiento múltiple utilizando las secuencias aminoacídicas ya reportadas de un total de 29 (**tabla M.2**) (materiales y métodos). En este análisis se puede observar las secuencias aminoacídicas particulares de cada especie, los sitios conservados y la variación de longitud entre las mismas (**figura 5.1**).

Por otro lado, se representaron los resultados del alineamiento de secuencias mediante *Sequence Logo* (Schneider & Stephens, 1990) con la finalidad de destacar de forma simple las particularidades de la secuencia de Z (**figura 5.2**). Para no sesgar este análisis hacia un determinado clado, se seleccionó un grupo más reducido de secuencias, tomando como máximo 2 representantes de cada una de las especies virales.

De acuerdo a estos análisis es posible dividir la secuencia de la proteína Z en tres regiones: i) la región N-terminal, entre el aminoácido 1 y el 36; ii) la región central entre el aminoácido 37 y el 87 y iii) la región C-terminal entre el aminoácido 88 y el extremo de la proteína.

En la **figura 5.2**, en la región N-terminal de la proteína Z, desde el residuo 1 al 6, se indica el motivo de miristoilación (sombreado en rosa), donde se destaca una glicina en la posición 2 totalmente conservada. En la posición 3, con un grado relativamente mayor de variabilidad se encuentran residuos básicos (K o R), con cadenas laterales del grupo amida (Q o N), sulfhidrilo (C), o hidroxilo (S o Y). Estos residuos probablemente constituyan un factor adicional para la asociación a membranas celulares (Maurer-Stroh & Eisenhaber, 2004) o quizá formen parte del sitio de reconocimiento de la enzima celular, *N-miristoil transferasa*. El resto de la región N-terminal presenta alta variabilidad, excepto por una isla presente en los arenavirus del Viejo Mundo caracterizada por la secuencia consenso Rx(4)PD, donde x representa cualquier aminoácido. La misma se encuentra subrayada y enumerada como 1 en el panel C de la **figura 5.2** (residuos 26-32).

En la región central de la proteína (residuos 37 a 87) se observa una distribución homogénea de sitios conservados. Esta región contiene el mayor dominio de Z, y se caracteriza por ser la región más estructurada de la proteína. Particularmente se destaca la presencia de los 8 aminoácidos necesarios para la coordinación de los dos átomos de Zn^{2+} , los cuales participan en el plegado del dominio RING, y que se corresponden a 7 residuos de cisteína en las posiciones 43, 46, 56, 62, 65, 76, 79 y

uno de histidina, en la posición 59. Estos residuos se encuentran completamente conservados en la familia viral, indicando una fuerte presión de selección sobre este motivo y su importancia biológica. Por otro lado, se pueden observar residuos altamente conservados en otras posiciones dentro de la región central. Por ejemplo los residuos K₄₄, W₄₇ y L₅₃ están totalmente conservados dentro de la familia, lo que sugiere que estos sitios podrían ser necesarios en el plegamiento de Z, o incluso podrían formar parte de interacciones proteína-proteína. Por ejemplo la interacción con PRH, (Topcu *et al.*, 1999), con eIF4E (Kentsis *et al.*, 2001), o con Z (homologización) (Wang *et al.*, 2012). Por otro lado la secuencia inicial de la región central presenta un dominio característico para cada clado: L[YH]GR[YF]N (37-42) para el Nuevo Mundo y GP[ELQ][FNS] (39-42) para el Viejo Mundo (subrayada y enumerada como 2 en la figura 5.2).

En la región central se observa el motivo tardío YLCL (subrayado en la figura 5.2 y numerado como 3) el cual fue previamente descrito en otros virus (Bieniasz, 2006; Lee *et al.*, 2007; Pornillos *et al.*, 2002) y se encuentra altamente conservado en la familia (posiciones 60 a 63), y mayoritariamente en los miembros del Nuevo Mundo. Un estudio reciente (Shtanko *et al.*, 2011) ha involucrado al dominio YLCL en el reclutamiento de la proteína N y en la interacción con los complejos ESCRT, ALIX/AIP1.

En las posiciones 80 a 87 se observa otro motivo conservado entre la familia viral Kx(0,1)PLPTx[IL] (subrayado y enumerado como 4 en la figura 5.2). Wang y colaboradores (2012) describieron que mutaciones en este sitio afectaban la homologización de la proteína Z, afectando de esta manera su función biológica (Wang *et al.*, 2012). Por otro lado, se sugirió que dentro de esta secuencia la leucina de la posición 83 está implicada en la incorporación de las nucleocápsides y glicoproteínas en las partículas virales (Casabona *et al.*, 2009).

Por último, en la región C-terminal de la proteína Z se encuentran dos tipos de sitios conservados que corresponden a los dominios tardíos característicos de las proteínas de matriz: P[TS]AP y PPPY (sombreados en verde en la figura 5.2) los cuales participan en el proceso de brotación viral (Capítulo 3). Ambos motivos se encuentran presentes en el grupo del Viejo Mundo, mientras que en el grupo del Nuevo Mundo se encuentra mayoritariamente el motivo P[TS]AP. Un caso particular es el virus Tacaribe, la especie del Nuevo Mundo aislada a partir de muestras de murciélagos, el cual no posee los dominios tardíos característicos, sino un motivo ASAP, el que aparentemente no funciona como dominio tardío. Además se ha demostrado que Tacaribe es capaz de producir la brotación viral por una vía independiente de Tsg101, pero si dependiente de la ATPasa Vps4A/B (Urata *et al.*, 2009).

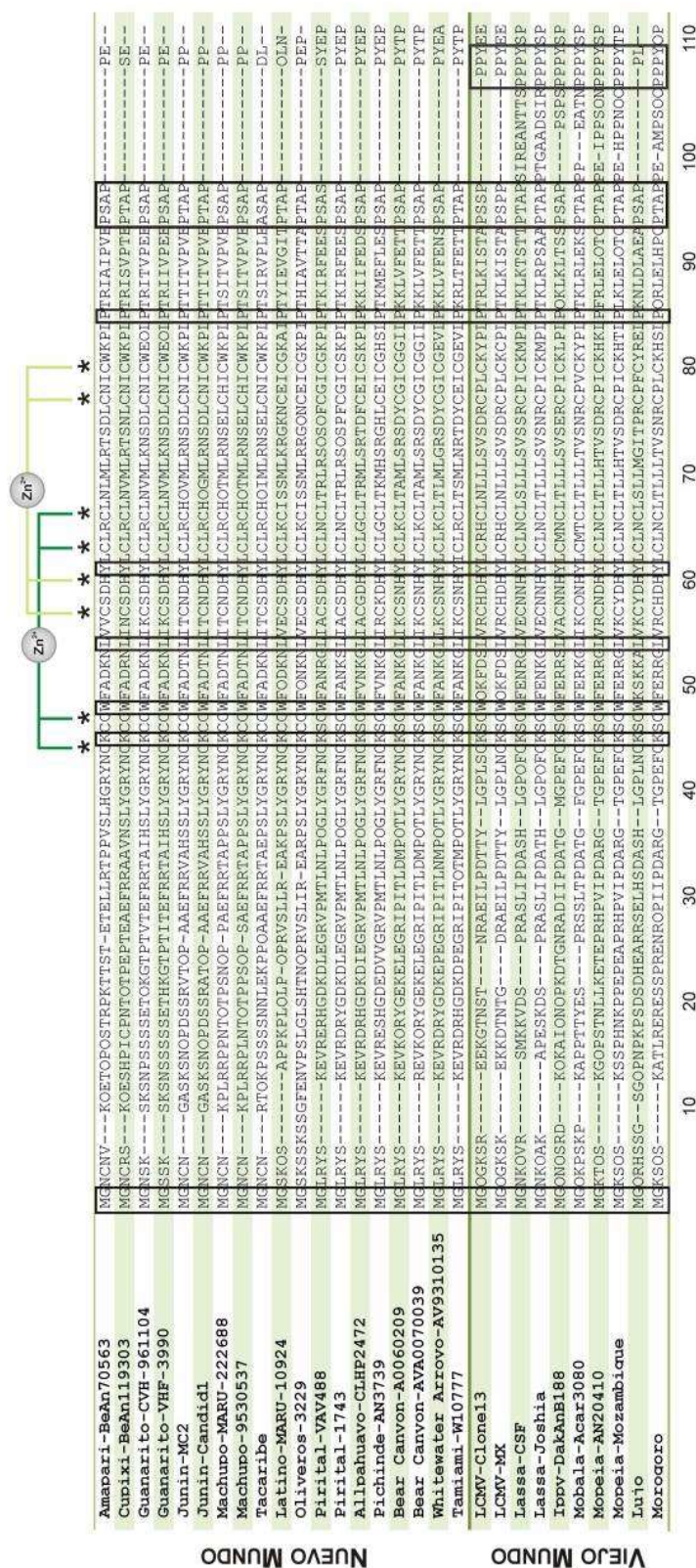
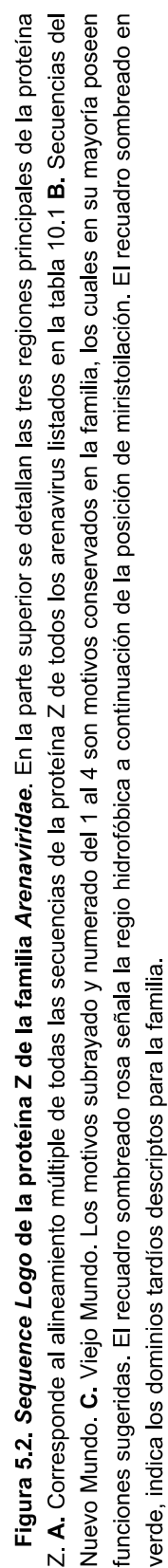


Figura 5.1. Alineamiento de las secuencias aminoácídicas de la proteína Z en la familia *Arenaviridae*. Los miembros del alineamiento se encuentran agrupados en 2 segmentos: Nuevo Mundo y Viejo Mundo. Los residuos señalados con un recuadro se encuentran totalmente conservados, mientras que los dos últimos recuadros destacan la conservación de los sitios tardíos en cada grupo. Los asteriscos superiores señalan los residuos de cisteína e histidina involucrados en el dominio RING, los cuales se encuentran en coordinación con dos átomos de Zn



Existe la posibilidad que estos dominios se encuentren en proteínas celulares implicadas en el transporte de compartimentos membranosos. En el año 2003 se describió la presencia de motivos PTAP-like en la proteína Vps27 de levaduras y su homólogo en humanos, la proteína Hrs (*mammalian hepatocyte receptor tyrosine kinase substrate*) (Pornillos *et al.*, 2003). Ambos son componentes del complejo ESCRT-0, el cual está implicado en el transporte multivesicular. Como se mencionó en el capítulo 3, este transporte está implicado en el direccionamiento de proteínas ubiquitinadas a los endosomas, donde son agrupadas en microdominios que se transforman en pequeñas vesículas. Posteriormente, las vesículas brotan hacia el interior del endosoma tardío, para formar los cuerpos multivesiculares. Estos, se fusionan con los lisosomas, donde finalmente ocurre la degradación de su contenido.

Normalmente, Vps27 es reclutada a la membrana de los endosomas a través de su dominio FYVE. Este motivo interactúa con el fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3P) que se encuentra en la membrana de los endosomas. Desde esa localización Vps27 recluta a otros componentes del complejo ESCRT a partir de su dominio tipo PTAP (PSDP 524–527 y PTPV 581–584). Finalmente el complejo ESCRT será el encargado de la brotación de la vesícula (figura 5.3).

Los dominios tipo PTAP son equivalentes a los dominios tardíos presentes en Gag y en Z. Ambas proteínas se encargan, entre otras funciones, del redireccionamiento de la maquinaria ESCRT celular a la membrana plasmática, donde Gag y Z se encuentran ancladas mediante el ácido mirístico por su extremo N-terminal. Esta modificación postraducciona, permite la unión a membrana, así como los parches de PI3P reclutan a Vps27. De esta manera Gag y Z, mimetizan a Vps27 redireccionando la maquinaria de ESCRT a la membrana plasmática, y promoviendo la brotación viral (figura 5.3) (Katzmann *et al.*, 2003). Esto ha sido empíricamente demostrado para la proteína Gag de HIV, realizando el rescate de un virus de HIV defectivo en el dominio tardío de Gag, a partir de la región homóloga de Hrs. (Pornillos *et al.*, 2003).

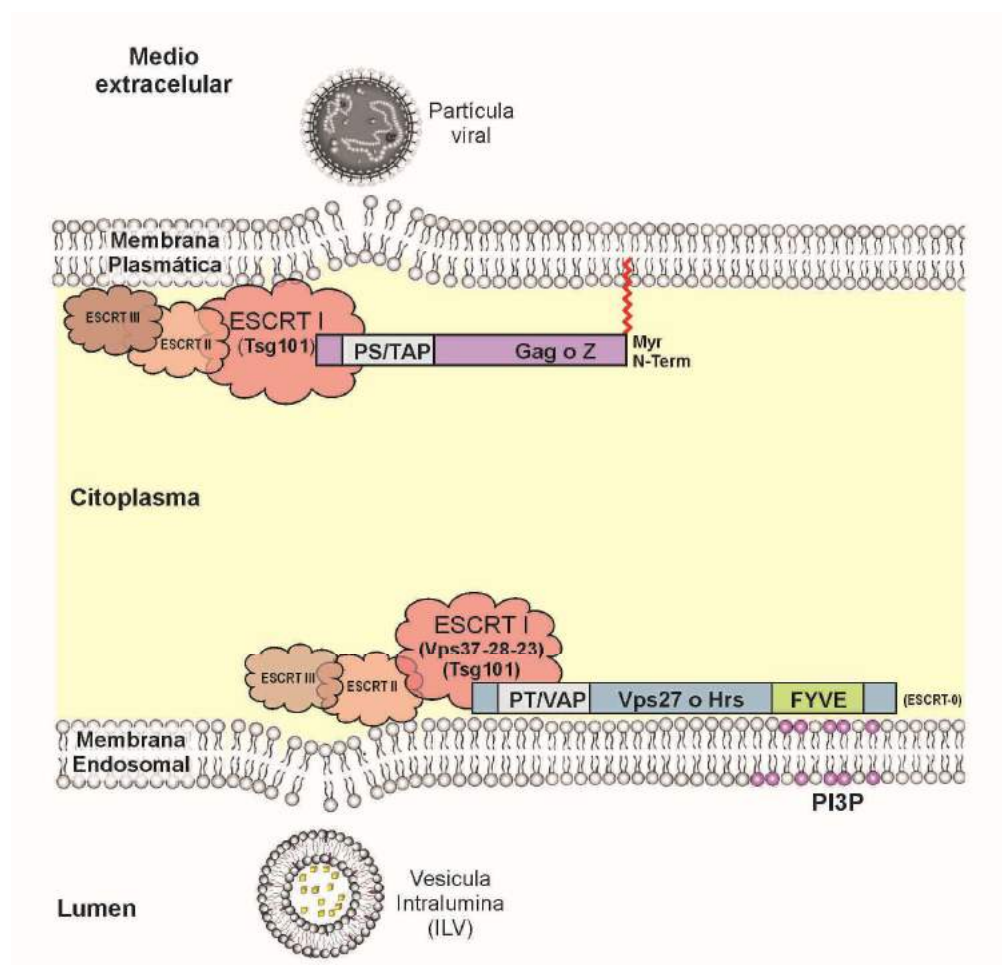


Figura 5.3 Esquema de los procesos de brotación viral y brotación intraluminal. Las proteínas celulares Vps27 y Hrs (ESCRT 0) contienen el dominio tipo PTAP, que producen el reclutamiento de la maquinaria de transporte multivesicular ESCRT I (Vps27 une a Vps37, Vps28 y Vps23, mientras que Hrs interactúa con Tsg101). Tanto Vps27 como Hrs son direccionadas a la membrana endosomal a partir del dominio FYVE, el cual une a PI3P. Los complejos ESCRT I y ESCRT II inducen la curvatura de la membrana y la formación de la vesícula. Finalmente el complejo ESCRT III produce la separación de la vesícula de la membrana, y es reciclado por la acción de una ATPasa.

Las proteínas virales Gag y Z (de la mayoría de los Arenavirus), poseen dominios PS/TAP, los cuales unen a Tsg101 de manera análoga a lo anteriormente descrito, redireccionando la maquinaria de ESCRT I al sitio de brotación viral, y en consecuencia a los complejos ESCRT II y III. Ambas proteínas se localizan en la membrana plasmática, debido al dominio de miristoilación en la región N-terminal.

DISCUSIÓN

Mediante la representación gráfica de *Sequence Logo* (figura 5.2) se describió la conservación aminoacídica de la proteína Z de los miembros de la familia *Arenaviridae*. La misma se dividió en tres regiones principales de manera de facilitar su estudio, y cada una de las regiones conservadas fue analizada en detalle. Si bien muchos de estos dominios han sido previamente descriptos y/o caracterizados, existen otros patrones detallados en el texto para los cuales aún se desconoce su función.

Por ejemplo, el motivo indicado como 2 en la región central es único para cada grupo viral (Nuevo o Viejo Mundo) y está altamente conservado dentro de los mismos. Debido a que los Arenavirus del Nuevo Mundo y del Viejo Mundo poseen huéspedes pertenecientes a dos subfamilias diferentes dentro de los roedores múridos (*Sigmodontinae* y *Murinae*, respectivamente), es probable que el motivo 2, esté relacionado con la definición del rango de huésped de los Arenavirus.

El análisis global de la proteína Z indica un elevado grado de conservación entre grupos virales, más aún entre especie o cepas. Por ejemplo, el análisis de las secuencias de la proteína Z pertenecientes a las cepas de la genealogía vacunal del virus Junín, no presenta ninguna diferencia entre ellas. Claramente, la proteína Z del virus Junín no está involucrada en el proceso de atenuación viral que permitió la generación de la vacuna Candid#1, ya sea por azar, debido a su corta secuencia o, por que existe una fuerte presión de selección sobre esta secuencia que dificulta su modificación sin una alteración significativa de la adaptabilidad viral. Justamente, las diversas funciones asignadas a Z, que requieren de su interacción con distintos factores celulares y virales, abonan esta última posibilidad.

INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presenta el desarrollo de herramientas que luego serán utilizadas a lo largo de este trabajo en ensayos de funcionalidad *in vivo* e *in vitro*. En primer lugar se describe la expresión y purificación de versiones recombinantes de la proteína Z en un sistema procariota y en células de insecto, principalmente para realizar estudios de cristalografía y análisis de la estructura tridimensional. Luego, se muestra la optimización de la expresión de las proteínas recombinantes (Borio, Tesina de licenciatura, 2008). En este trabajo se realizó la optimización de la purificación de las proteínas recombinantes en *E.coli*, en colaboración con el Instituto Pasteur de Paris, en la *Unité de Virologie Structurale* bajo la dirección del Dr. Felix Rey. En el proyecto original, entre otras tareas, se planificó la cristalización de la proteína Z formando un complejo proteico con alguna de las proteínas con las que Z es capaz de interaccionar. Para esto se seleccionó al factor de iniciación de la traducción eIF4E, el cual fue clonado, expresado y purificado en *E. coli*. Sin embargo, previamente a la finalización de nuestros experimentos, Volpon *et al.* (2010) describieron la estructura del complejo mencionado mediante RMN resaltando la flexibilidad del mismo, lo que presentó indicios de que la estrategia de cristalización no era la óptima para este par proteico. A partir de ello, se reestructuraron los objetivos planteados, derivando en los resultados que luego se detallarán en la sección IV de este trabajo.

Por otro lado, en este capítulo se detalla la producción de sueros policlonales contra Z (α -Z) y contra GFP (α -GFP), los cuales serán utilizados en los ensayos presentes en este estudio. Esta producción fue realizada en colaboración con el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Nacional de Quilmes, bajo la dirección de la Dr. Graciela Glikmann.



DESARROLLO DE HERRAMIENTAS

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

El objetivo general de un sistema de expresión heterólogo es obtener una proteína purificada en su conformación nativa, y a veces activa. Z es una proteína viral pequeña (aproximadamente 11 kDa), normalmente expresada en células de mamíferos durante las fase tardía de la infección por arnavirus. Por lo tanto, es esperable que la sobreexpresión de la proteína Z en su forma nativa fuese más fácil de optimizar en un sistema de expresión eucariota (en células de mamíferos, insectos u hongos). Sin embargo, existen algunas aplicaciones para las cuales no es necesario obtener la proteína en la conformación nativa, por ejemplo, para la producción de anticuerpos. Además, se ha reportado que en muchas proteínas las modificaciones post-traduccionales son escasas, por lo tanto, en estos casos los sistemas de expresión bacterianos son realmente ventajosos, debido a los mayores niveles de expresión obtenidos y a la reducción de los costos, en comparación con la expresión en sistemas eucariotas (Demain & Vaishnav, 2009). Por lo tanto, el sistema será seleccionado dependiendo la aplicación del producto final obtenido.

Durante el análisis de la expresión de la proteína Z en bacterias, no fue posible obtener el producto sin la fusión de secuencias heterólogas. Probablemente, esto sea consecuencia de cierto grado de citotoxicidad de la proteína Z.

Varias estrategias de expresión fueron analizadas, incluidas distintas cepas de *E. coli* con diferentes propiedades biológicas, sin embargo, sólo fue posible purificar Z cuando se fusionó una secuencia heteróloga en sus extremos, probablemente debido a que la fusión logró estabilizar la proteína recombinante, mejorando así los niveles de expresión.

En este trabajo, se realizó la sobre-expresión de tres variantes recombinantes de la proteína Z: Tio-Z-V5-His, GST-Z, y His-Z. Estas construcciones tuvieron como objetivo la expresión de las versiones recombinantes para la realización de estudios de cristalografía, mientras que Tio-Z-V5-His también sería utilizada para la obtención de un suero policlonal α -Z.

Tio-Z-V5-His

Para la expresión de la proteína Z de la cepa Candid#1 del virus Junín en *E. coli* se construyó un plásmido de expresión basado en pET102/D-TOPO, que contenía clonado el ORF del gen z, bajo el control del promotor de la ARN polimerasa del fago T7. El mismo se fusionó por el extremo N-terminal al ORF de la proteína Tiorredoxina

(Tio), y al epítipo V5 con un poli histidina (His) por el extremo C-terminal (**figura 6.1**). Por otro lado, el polipéptido de fusión codificado posee un sitio de corte para la proteasa específica enteroquinas (ENK) que permite separar la tiorredoxina del resto de la proteína (Cherñac, Tesina de licenciatura, 2006).

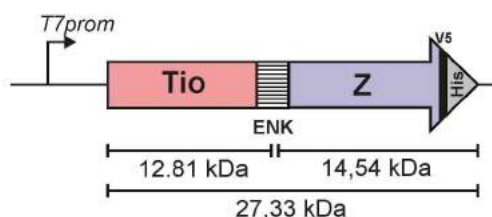


Figura 6.1. Esquema de las construcciones plasmídicas conteniendo el ORF de la proteína Z. Plásmido recombinante que contiene la secuencia para la proteína Tio-Z-V5-His, bajo la regulación del promotor *T7Prom*. Entre el ORF de la proteína Tiorredoxina y el de la Z, se encuentra el sitio para la proteasa Enteroquinas. Y en el extremo C-terminal se encuentran el epítipo V5 y la cola de histidinas.

Expresión de Tio-Z-V5-His

La cepa de *E. coli*, BL21 (DE3), contiene el gen de la ARN polimerasa viral del fago T7 regulado bajo el operador *lac*. La presencia de IPTG en el cultivo celular permite la inducción de la ARN polimerasa y la transcripción de la secuencia clonada en el vector de expresión (pET102/D-TOPO) a partir de su promotor (T7 prom).

Luego de evaluar varias condiciones de inducción y crecimiento del cultivo, los parámetros óptimos para la expresión fueron la inducción del cultivo una vez alcanzada una DO_{600} de 1, utilizando para ello una concentración final 1 mM de IPTG, e incubando a 37 °C y 220 rpm durante 4 h. El perfil de expresión de la proteína recombinante Tio-Z-V5-His obtenido se muestra en la **figura 6.2 A**, donde T_0 indica el momento donde el IPTG fue agregado al cultivo y T_F corresponde al tiempo final del cultivo. Cercano al peso molecular de 30 kDa es posible observar una banda de proteína sobre expresada, la cual se encuentra ausente en los tiempos iniciales. En orden de continuar con los pasos correspondientes a la purificación de la proteína recombinante, es necesario analizar la solubilidad de la misma en el citoplasma bacteriano. Para ello se probaron distintos métodos de ruptura celular, siendo la utilización de ruptura mecánica por presión con el homogenizador *Emulsiflex-C5 homogenizer* (Avestin) a 1000psi la técnica óptima. La muestra una vez procesada, es

centrifugada obteniéndose dos fracciones independientes, la fracción soluble e insoluble. En la **figura 6.2 B** es posible observar la presencia de la proteína sobrepresada en ambas fracciones. A pesar de observarse una proporción considerable de proteína de interés en la fracción insoluble, el porcentaje soluble es suficiente para continuar los estudios.

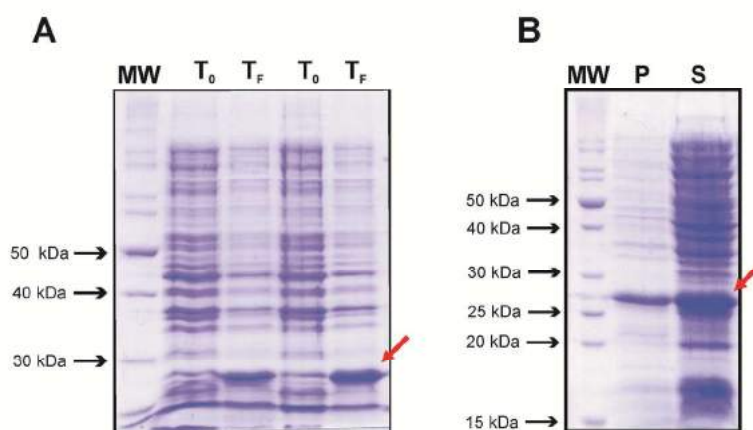


Figura 6.2. Expresión de la proteína Tio-Z-V5-His. **A.** SDS-PAGE 12% de las muestras del cultivo correspondientes al tiempo inicial (T_0) y 4 hs posterior a la inoculación a 37°C (T_F). La flecha roja indica la proteína recombinante Tio-Z-V5-His. **B.** SDS-PAGE 15% de las fracción insoluble (P, *pellet*) y soluble (S) del cultivo expresando Tio-Z-V5-His. La flecha roja indica Tio-Z-V5-His.

Purificación de Tio-Z-V5-His

Teniendo en cuenta la presencia de la cola de histidinas agregada en el extremo carboxilo de la proteína de fusión Tio-Z-V5-His, se utilizó una cromatografía de pseudoafinidad mediante metal inmovilizado (IMAC- Ni^{+2}) para su purificación. La separación fue monitoreada por UV280_{nm} (λ_{abs} fenilalanina) y UV254_{nm} (λ_{abs} triptofano), y la elución fue realizada mediante la aplicación de un gradiente de imidazol desde 20 mM a 500 mM. Como se observa en la **figura 6.3 A**, el perfil cromatográfico presenta dos picos mayoritarios, el primero corresponde a 250 mM de imidazol y presenta valores de absorbancia a 254 nm (curva roja) superiores a los valores de 280 nm (curva azul), mientras que el segundo pico eluye a 450 mM de imidazol y se observa mayor absorbancia a 280 nm. Las fracciones correspondientes a cada pico fueron colectadas y analizadas por SDS-PAGE, el cual se observa en la

figura 6.3 B. En la misma se muestra que la banda mayoritaria en ambos picos corresponde con el peso molecular de Tio-Z-V5-His. (27 kDa).

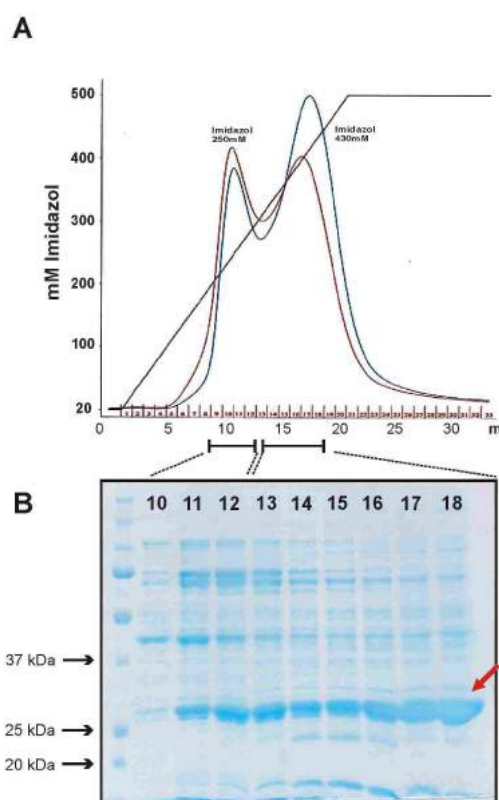


Figura 6.3. Purificación de la proteína Tio-Z-V5-His. **A.** Perfil cromatográfico (IMAC) correspondiente a la elución de la proteína Tio-Z-V5-His mediante la aplicación de un gradiente de imidazol (El eje Y corresponde al porcentaje de imidazol, Línea negra). La línea roja corresponde a los valores de $UV_{254\text{ nm}}$ y la línea azul a $UV_{280\text{ nm}}$. Las fracciones 9 a 12 (señaladas en el eje X) corresponden al primer pico, mientras que las fracciones 13 a 21, al segundo. **B.** SDS-PAGE 12% de las fracciones correspondientes a la elución de la proteína Tio-Z-V5-His. La flecha indica Tio-Z-V5-His.

Para analizar los picos obtenidos y aumentar la pureza de la proteína de interés, las fracciones seleccionadas correspondientes a cada pico fueron concentradas y separadas por filtración en gel en una columna Superdex 200 (Amersham, Ge) (**figura 6.4**). El perfil de elución correspondiente al primer pico muestra la purificación de la proteína de 27 kDa con un máximo valor relativo de absorbancia de 25 mAU, y el análisis por SDS-PAGE evidencia la baja concentración de la misma (**figura 6.4 A**, 1^{er} pico). Por otro lado, en el perfil de elución del segundo pico se observa la purificación de la proteína con un valor máximo de absorbancia de 200 mAU, distribuido en 9

fracciones (figura 6.4 B, 2^{do} pico). En el análisis por SDS-PAGE de estas fracciones observa el nivel de pureza de la proteína Tio-Z-V5-His. Estas fracciones (8-16) fueron agrupadas y dializadas para su posterior tratamiento con enteroquinasa (figura 6.4 C). El rendimiento obtenido de la proteína Tio-Z-V5-His purificada fue de aproximadamente 10-12 mg por litro de cultivo bacteriano.

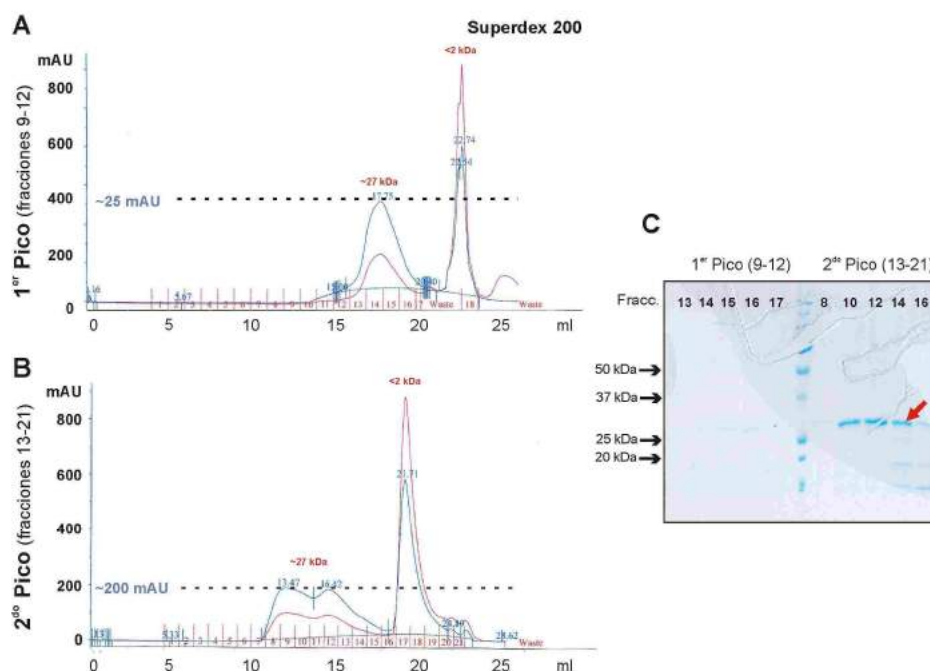


Figura 6.4. Purificación mediante Gel filtración de Tio-Z-V5-His. **A.** Perfil de elución de la muestra correspondiente a las fracciones del 1^{er} pico. **B.** Perfil de elución de la muestra correspondiente a las fracciones del 2^{do} pico. El eje Y representa los valores de absorbancia relativos, mientras que el eje X contiene los tiempos de elución (ml). Las líneas roja y azul indican la absorbancia a 254 nm y 280 nm respectivamente. Los pesos moleculares estimados de cada pico se indican en números rojos. Los mismos fueron determinados utilizando un patrón de peso molecular previo a la filtración de la muestra. (Standard *gel filtration*, BioRad). En números azules se indica el valor máximo de absorbancia de los picos de 27 kDa. **C.** SDS-PAGE 12% de las fracciones de gel filtración de cada pico. La flecha roja indica la proteína Tio-Z-V5-His.

Proteólisis de Tio-Z-V5-His con la enzima Enteroquinasa.

Para obtener la proteína Z sin tiorredoxina, se trató Tio-Z-V5-His con la proteasa Enteroquinasa, la cual reconoce un sitio específico ubicado entre Tiorredoxina y Z permitiendo separar a la tiorredoxina (12,8 kDa) de la proteína Z-V5-His (14,5 kDa).

Para esto, las fracciones 8 a 16 obtenidas de la filtración en gel del segundo pico (**figura 6.4**) fueron colectadas, concentradas (Vivaspin 25,000 MWCO, Sartorius), dializadas y confirmada su pureza mediante SDS-PAGE (**figura 6.5 A**). Luego, la proteína fue incubada con Enteroquinasa durante dos horas y la eficiencia del proceso se evaluó mediante SDS-PAGE (**figura 6.5 B**).

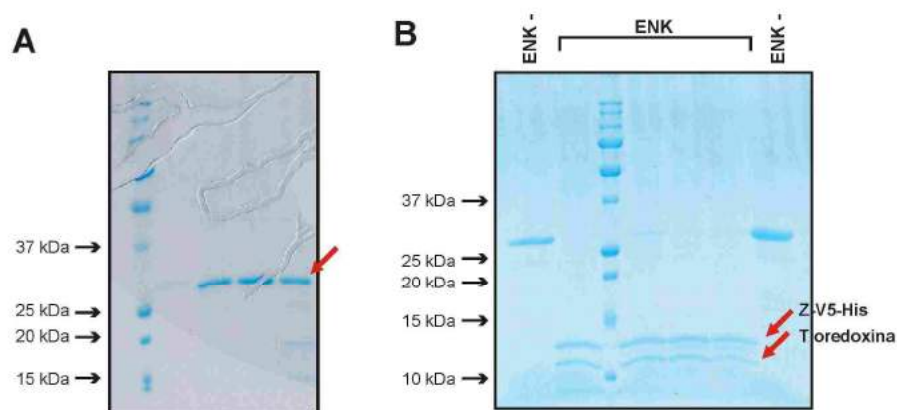


Figura 6.5. Proteólisis de Tio-Z-V5-His y purificación de Z-V5. **A.** SDS-PAGE 12% de las fracciones colectadas de la filtración en gel de Tio-Z-V5-His. Esta fracción es el sustrato de la reacción de proteólisis. La flecha indica Tio-Z-V5-His. **B.** SDS-PAGE 15% de la reacción de proteólisis con enteroquinasa. La primera y última línea corresponde a Tio-Z-V5-His purificada, mientras que las líneas centrales corresponden a la reacción de proteólisis. Las flechas indican los productos de la reacción, tiorredoxina y Z-V5-His.

Purificación de Z-V5-His

Teniendo en cuenta que sólo el fragmento Z-V5-His retiene la capacidad de unirse a la resina de Ni^{2+} inmovilizado, es posible separar ambos productos de la proteólisis mediante una cromatografía IMAC. Para esto, la fracción tratada con Enteroquinasa fue sometida a una cromatografía de afinidad como se describió previamente, y fue posible observar tres picos de absorbancia (**figura 6.6**). El *primero*, en el lavado de la columna correspondiente a la proteína tiorredoxina, el segundo pico fue el correspondiente a Z-V5-His (100mM de imidazol), mientras que el tercer pico

corresponde a Tio-Z-V5-His sin cortar (300mM de imidazol). Las fracciones correspondientes al pico de Z-V5-His fueron colectadas, concentradas y la presencia de la proteína fue confirmada por SDS-PAGE y *western blot* utilizando anticuerpos anti-His (figura 6.6 B y C).

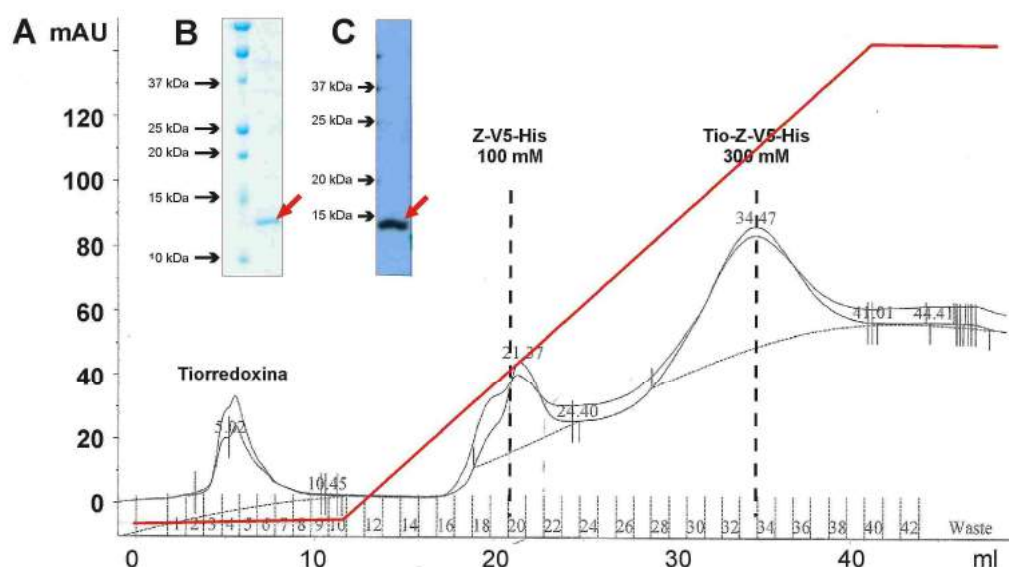


Figura 6.6. Purificación de Z-V5-His. **A.** Cromatografía de afinidad (His-Trap) de la reacción de proteólisis de Tio-Z-V5-His. El *primer* pico corresponde a la proteína tiorredoxina, el segundo a Z-V5-His y el tercero a Tio-Z-V5-His. La línea roja representa el gradiente de imidazol, desde 20mM a 500mM. **B.** SDS-PAGE 15% de Z-V5-His purificada mediante cromatografía de afinidad (His-trap). La flecha indica Z-V5-His. **C.** *Western blot* de la purificación de Z-V5-His, utilizando anticuerpos anti-His. La flecha indica Z-V5-His.

GST-Z

El ORF de z de la cepa Candid#1 fue clonado (Cherñac, Tesina de licenciatura, 2006) en el vector pGEX-B (GE Healthcare). De esta manera, la secuencia codificante de interés quedó fusionada por su extremo carboxilo con el extremo 3' del ORF que codifica para la enzima Glutación-S-Transferasa (GST) presente en el vector (plásmido pGST-Z)

Expresión de GST-Z

A partir del plásmido pGST-Z (Cherñac, Tesina de licenciatura, 2006), que contenía el ORF de *gst* fusionado al ORF de *z* de la cepa de Candid#1, bajo el control del promotor híbrido *tac*, se llevó a cabo la optimización de la expresión y purificación de la proteína GST-Z (figura 6.7).

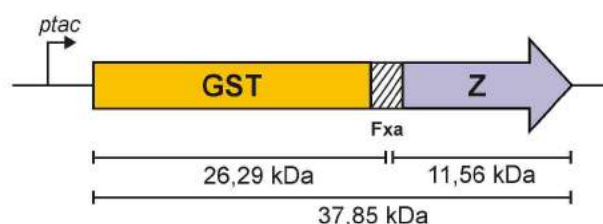


Figura 6.7. Esquema de la proteína recombinante GST-Z regulada por el promotor de *ptac*. Entre la secuencia de GST y Z se encuentra la secuencia de reconocimiento de la proteasa específica, Factor Xa la cual produce dos péptidos de 26,29 kDa y 11,56 kDa

Como se describió anteriormente, se ensayaron varias condiciones de expresión (Borio, Tesina de licenciatura, 2008), y se escogieron como óptimas la temperatura de cultivo: 37 °C; velocidad de rotación del cultivo: 220 rpm; concentración de inductor (IPTG): 1 mM; y densidad del cultivo al momento de inducir: $DO_{600\text{ nm}} = 1$.

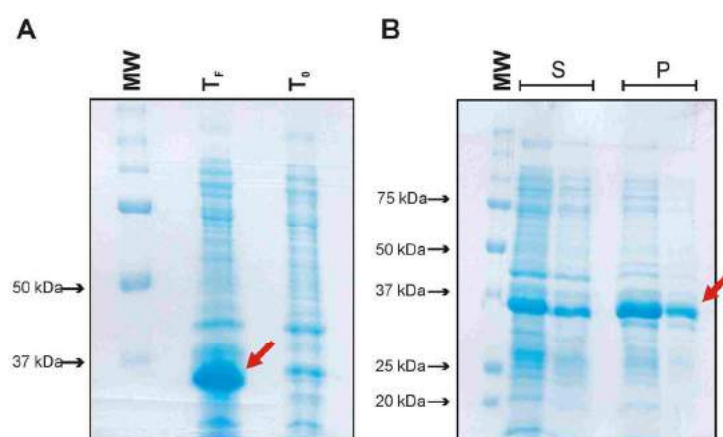


Figura 6.8. Expresión de GST-Z. **A.** Análisis mediante SDS-PAGE 12% del perfil de expresión de la proteína GST-Z, donde T_0 representa el tiempo inicial de inducción del cultivo y T_F el cultivo inducido luego de 20 hs a 20°C. **B.** Análisis mediante SDS-PAGE 12% de la ruptura celular (S, fracción soluble; P, fracción insoluble).

La expresión luego de 20 hs post-inducción muestra la presencia de una banda sobrepresada con un peso molecular aproximado al de GST-Z (37 kDa) (**figura 6.8 A**), ausente en la muestra control (tiempo 0 de inducción). La solubilidad de la proteína fue un parámetro importante para su posterior purificación, por lo que se analizaron las fracciones solubles e insolubles luego de la lisis celular (**figura 6.8 B**).

Purificación de GST-Z

Luego de la ruptura celular, la fracción soluble fue utilizada para purificar GST-Z en *batch* utilizando una resina *Gluthathione Sepharose 4B* (Amersham). Como se observa en la **figura 6.9 A**, una parte de la proteína de interés se obtuvo en el sobrenadante de la incubación de la resina con el lisado celular (V_0), lo que indicaría una posible saturación de la resina para la muestra utilizada. Por otro lado, se obtuvo la proteína deseada en las etapas de elución con glutatión (E1, y E2). También se observan dos bandas que co-purifican con GST-Z de aproximadamente 29 kDa y 25 kDa. Al ser eluidas junto a la proteína de interés GST-Z, luego del agregado del glutatión, podría asumirse que las mismas poseen sitios de interacción con la resina cromatográfica, y su presencia podría deberse a productos de degradación de la proteína de interés. La cantidad de proteína GST-Z obtenida fue aproximadamente de 5-8 mg por litro de cultivo procesado. La proteína GST utilizada como control de los experimentos fue expresada y purificada de la misma manera que GST-Z, a partir del plásmido pGEX-b.

Las fracciones eluidas fueron unificadas, concentradas y separadas mediante una resina de filtración en gel (*Superdex 200*, Amersham).

Como se observa en la **Figura 6.9 B** se obtuvieron dos picos mayoritarios, de aproximadamente 700 kDa y 40 kDa. Este último corresponde a la fracción de la proteína GST-Z monomérica, mientras que la otra fracción podría deberse a agregados o multímeros de la proteína. El análisis por SDS-PAGE muestra mayor presencia de la proteína GST-Z a partir de las fracciones correspondientes al primer pico (~700 kDa), y por otro lado que las bandas de 29 kDa y 25 kDa co-purifican en ambos picos (**figura 6.9 C**).

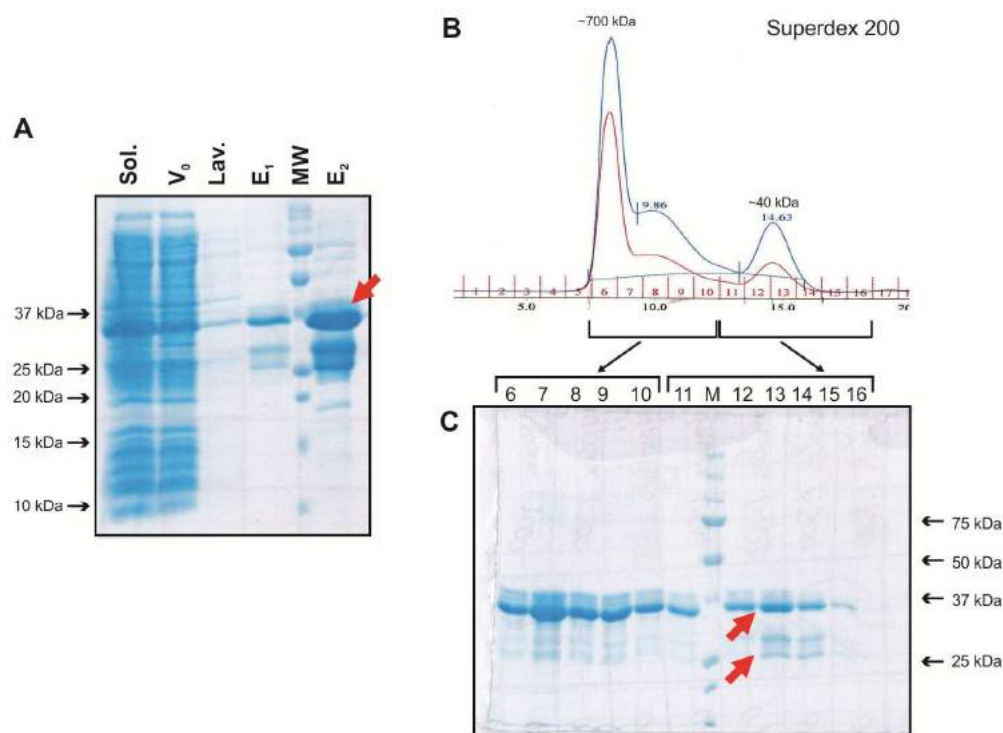


Figura 6.9. Purificación de GST-Z. **A.** Análisis mediante SDS-PAGE 12% de la purificación de GST-Z utilizando la resina *Gluthathione Sepharose 4B* (Amersham). S, fracción soluble; V₀, frente de columna; Lav., Lavado de la columna con PBS; E₁ y E₂, fracciones de elución con PBS 1X y 25 mM de glutatión reducido respectivamente. En todos los casos la flecha roja indica la proteína GST-Z. **B.** Purificación de GST-Z utilizando una resina de filtración en gel. Las líneas roja y azul corresponden a los valores de absorbancia a 254 nm, y 280 nm respectivamente. En el eje x se indican los números de las fracciones obtenidas. Los pesos moleculares de cada fracción se correlacionaron con los valores de elución de un patrón de peso molecular (*Gel filtration Standard, BioRad*). **C.** Análisis mediante SDS-PAGE 12% de las fracciones 6-16 obtenidas a partir de la cromatografía. Las flechas rojas indican la banda correspondiente a GST-Z, y las dos bandas que co-purifican con ella.

Proteólisis de GST-Z con la enzima Factor Xa

Con el objetivo de obtener Z sin el dominio de GST, la proteína purificada fue dializada e incubada con la proteasa Factor Xa. Los productos esperados luego del tratamiento, GST (25 kDa) y Z (12 kDa) fueron observados mediante SDS-PAGE (figura 6.10 A) y confirmados mediante *western blot* (figura 6.10 B).

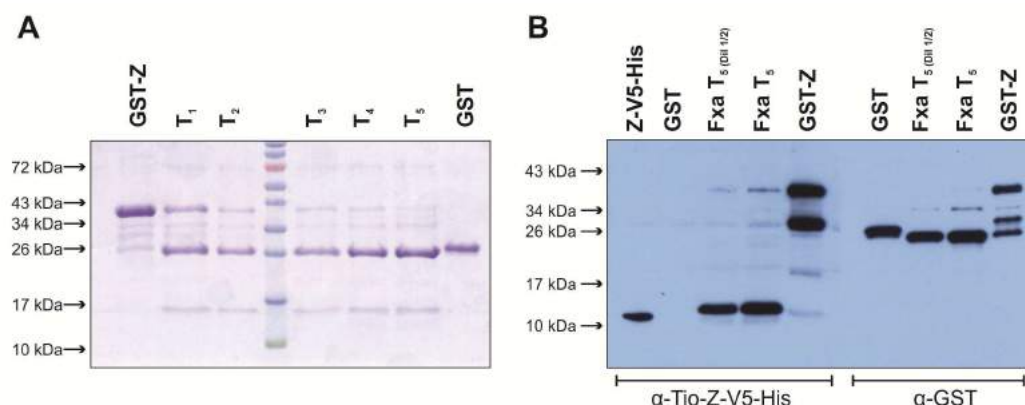


Figura 6.10. Proteólisis de GST-Z con el Factor Xa. **A.** Análisis mediante SDS-PAGE 16% de la cinética de reacción de proteólisis. T₁-T₅ representan 1 h, 2 hs, 4 hs, 6 hs y 16 hs. En la primera y última línea del gel (GST-Z y GST) se encuentran los controles de la proteína GST-Z, sin tratamiento, y GST purificada. **B.** Análisis mediante *western blot* de la reacción de proteólisis, utilizando anticuerpos α-Z y α-GST (Santa Cruz Biotechnology). En los extremos de la figura se encuentran las proteínas control Z-V5-His y GST-Z sin tratamiento.

Como se muestra en la **figura 6.10 A** fue posible detectar una banda de aproximadamente 12 kDa correspondiente a Z, la cual se observa de manera muy tenue en el SDS-PAGE como también una mínima proporción de GST-Z sin cortar, la cual se observa en la parte superior de las calles de las muestras tratadas con FXa. También se detectan las bandas de 29 kDa y 25 kDa en la muestra sin procesar. El análisis mediante *western blot* confirma la identidad de cada banda (**figura 6.10 B**). La visualización de una única banda de 12 kDa (utilizando anticuerpos anti Z) indicaría que las bandas de degradación de GST-Z (29 kDa y 25 kDa) se estarían obteniendo a partir de la degradación del extremo N-terminal, donde se encuentra GST.

Ensayos de proteólisis limitada

La técnica de proteólisis limitada es comúnmente utilizada para analizar la presencia de dominios conformacionales protegidos o menos accesibles a proteasas. Esto último permite determinar dominios estructurados, que suelen ser mejores sustratos para la purificación y posterior cristalización. Como se mencionó anteriormente, durante la expresión y purificación de GST-Z se observó la presencia de dos péptidos de menor tamaño, posiblemente productos de degradación de la proteína completa. Con el objetivo de eliminar estos co-productos se analizó la posibilidad de identificar dominios de mayor estabilidad mediante esta metodología.

A partir de GST-Z purificada se realizó un ensayo de proteólisis limitada con distintas concentraciones de tripsina (Try) y quimiotripsina (Chy). Como se observa en la **figura 6.11 A** la utilización de la enzima tripsina produce la desaparición de la banda correspondiente a GST-Z y un aumento de la banda de 25 kDa, mientras que la proteólisis con quimiotripsina parece conservar varias estructuras de distintos pesos moleculares. En base a este resultado se escogió a la quimiotripsina para análisis posteriores.

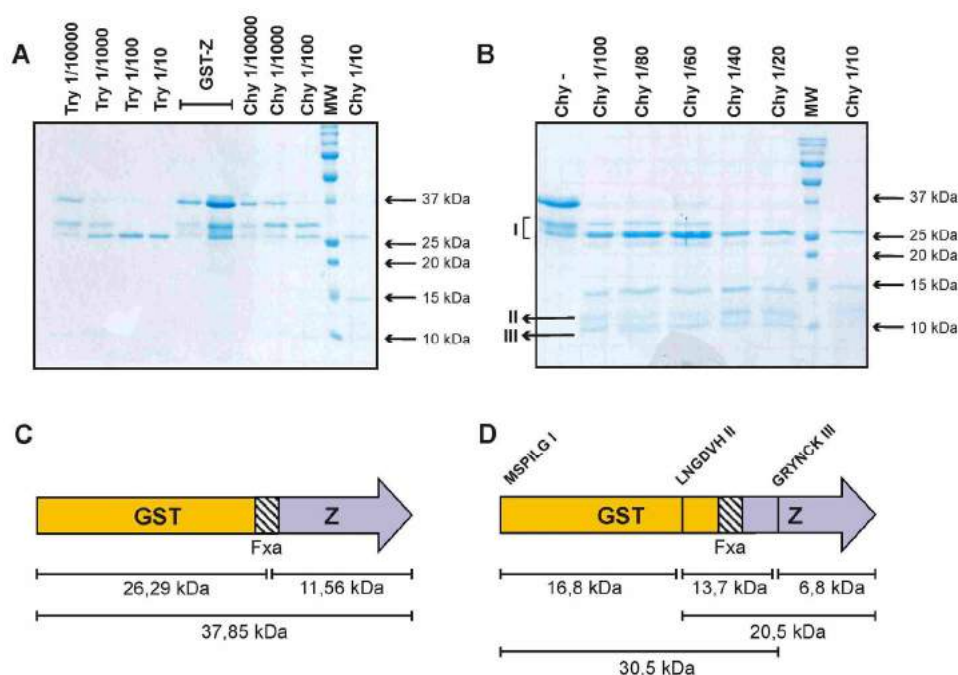


Figura 6.11. Proteólisis limitada de GST-Z. **A.** SDS-PAGE 15% de las muestras de la proteólisis limitada de GST-Z con las enzimas tripsina y quimiotripsina en distintas diluciones. **B.** SDS-PAGE 15% de la proteólisis limitada con quimiotripsina en diferentes diluciones. En el grafico se indican los péptidos secuenciados (I, II y III). **C.** Esquema de la proteína recombinante GST-Z y sus productos de proteólisis con el FactorXa. **D.** Esquema de GST-Z donde se indican los primeros seis aminoácidos de los péptidos I, II y III, junto con su localización en la secuencia aminoacídica. También se indican los pesos moleculares de la proteína completa, y luego de la proteólisis con el Factor Xa.

Los péptidos co-purificados y los obtenidos luego del tratamiento con quimiotripsina, (**figura 6.11 B**) fueron analizados mediante secuenciación de la porción N-Terminal (*Applied Biosystems Sequencer AB1494*). Las secuencias se indican en la figura, y como puede observarse la banda I (fragmentos co-purificados) comienza con los primeros 6 aminoácidos de GST (MSPILG), confirmando la hipótesis de degradación

de GST-Z, mientras que las bandas II y III (productos de la incubación con quimiotripsina) concuerdan con la porción C-terminal de GST (LNGDVH) y la región central de Z previa el motivo RING (GRYNCK), respectivamente. Por último, no fue posible reconocer un dominio significativamente estructurado, por lo que no se modificó la secuencia de la proteína de interés (figura 6.11 C).

His-Z

Para la expresión de la proteína Z en células de insecto se utilizó el sistema *Bac-to-Bac*. El ORF de *z* fue clonado en el vector pFastBac-HTa (Invitrogen) fusionado a una cola de histidinas en su extremo N-terminal (como se muestra en la figura 6.12), la cual puede ser removida mediante la acción de la proteasa (Cherñac, Tesina de licenciatura, 2006) (pFast-Z). El vector con el inserto de interés es transformado en una cepa de *E. coli* que contiene el genoma modificado (bácmido) del baculovirus AcMNPV (*Autographa californica multiple nuclear polyedrosis virus*). Mediante un mecanismo de transposición *in vivo* se transfiere el *cassette* conteniendo el gen de interés al genoma viral. El genoma recombinante es aislado y transfectado en células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (Sf9). Luego de 120 hs de incubación, se recuperó el sobrenadante de las células transfectadas, donde se encontraban presentes los baculovirus brotantes correspondientes a la primer progenie de baculovirus recombinantes (Ac-Z). Con el fin de obtener un stock viral de mayor título, y posteriormente ensayar la expresión de la proteína recombinante, el sobrenadante fue utilizado como inóculo para la reinfección de cultivos de células Sf9. El stock viral obtenido fue titulado por ensayo en placa obteniéndose un título aproximado de $1,7 \cdot 10^7$ pfu/ml.

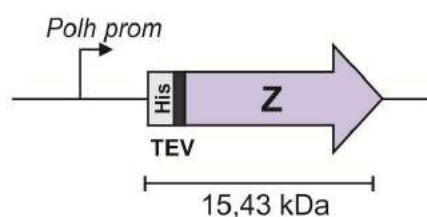


Figura 6.12. Esquema de la construcción del que codifica para la proteína de fusión His-Z. El gen está regulado por el promotor de poliedrina (*pol prom*). En el extremo N-terminal se encuentra una cola de histidinas y el sitio para la proteasa TEV.

Expresión de His-Z

A partir de los virus recombinantes obtenidos, se infectaron cultivos de células *Sf9* a distintas MOI (*multiplicity of infection*, 10, 5 y 1). Se analizó el nivel de expresión para cada condición de infección y se observó un leve aumento a medida que se incrementó la MOI. Se seleccionó la MOI de 5 como condición de infección (Datos no mostrados).

La expresión de His-Z se analizó mediante *western blot* (figura 13). Se detectaron dos bandas mayoritarias, posiblemente producto de inicio de traducción internos en la región reguladora del gen de fusión. Las mismas no se detectaron en los controles negativos (fracción celular de células *Sf9* sin infectar (figura 6.13, línea 3) o la fracción de células infectadas con el bácmido *Wild type* (figura 6.13, línea 4). Como control positivo del ensayo se utilizó la proteína Z-V5-His previamente purificada.

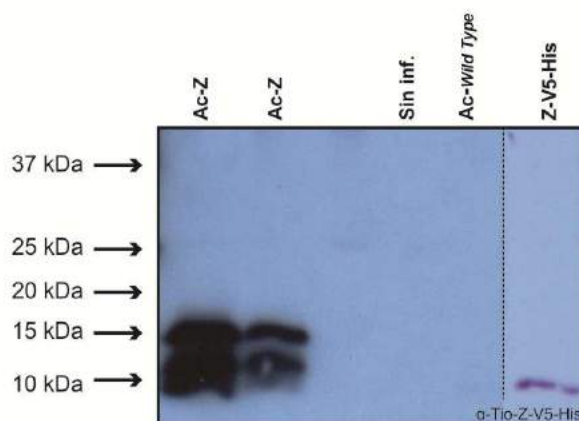


Figura 6.13. Detección de la expresión de His-Z en la fracción celular. A. *Western blot* de la fracción celular de células *Sf9* infectadas con Ac-Z, utilizando anticuerpos α -Tio-Z-V5-His. Las líneas 1 (Ac-Z) y 2 (Ac-Z) corresponden a la infección con Ac-Z, la línea 3 corresponde a células *Sf9* sin infectar (Sin Inf.), mientras que la línea 4 son células *Sf9* infectadas con el bácmido *wild type* (Ac-WildType). En la línea 5 (Z-V5-His) se encuentra el control de la técnica, la proteína Z-V5-His.

eIF4E

Expresión de eIF4E

El factor eIF4E es una proteína integrante del complejo de iniciación traduccional en células de mamíferos. Este proceso comienza con la identificación del codón de inicio al cual se une el complejo de pre-iniciación 43S, conteniendo el ARN_i para el aminoácido metionina y los factores eIF1, 1A, 2, 3 y 5, los que se unen con el extremo

CAP 5' del ARNm (m^7GpppN). Esta interacción es facilitada por eIF4E, quien interacciona directamente con el CAP, eIF4G (proteína de andamiaje) y eIF4A (ARN helicasa) (Sonenberg & Hinnebusch 2009). Estudios previos demostraron que la proteína Z de algunos arnavirus pose la capacidad de interaccionar, mediante su motivo RING *finger*, con el factor eIF4E, disminuyendo su afinidad por el CAP, inhibiendo de esta manera la traducción proteica (Marcotrigiano *et al.*, 1997; Campbell Dwyer *et al.*, 2000; Kentsis *et al.*, 2001; Volpon *et al.*, 2008). Aprovechando la propiedad de Z de interactuar con eIF4E se planteó como objetivo cristalizar la proteína Z en conjunto con una de las proteínas con las que interacciona. Esta estrategia permite tener complejos proteicos más estables permitiendo una mejor cristalización de la proteína. En este sentido, a continuación se describe el clonado expresión y purificación del factor eIF4E, y en el siguiente capítulo los ensayos *in vitro* que se realizaron para formar el complejo Z-eIF4E, con el objetivo final de obtener cristales.

Para analizar la expresión del factor celular eIF4E, el ORF fue sintetizado y clonado en el vector de expresión pET-28a+ bajo el promotor *plac*. De esta manera se obtuvo una construcción plasmídica adecuada para la expresión de eIF4E en *E. coli* sin secuencias heterólogas agregadas (figura 6.14).

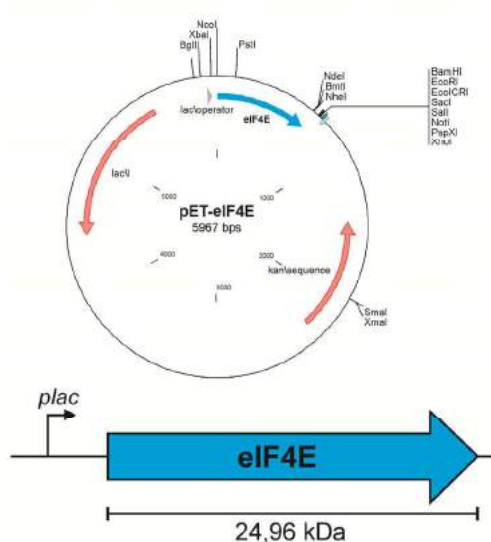


Figura 6.14. Esquema del plásmido pET-eIF4E. En el esquema se indica los sitios que se utilizaron para clonar el ORF eIF4E, y los elementos más importantes que contiene el plásmido de expresión. (pT7: promotor del fago T7, *lacI*: gen del represor lac; *kan*: gen de resistencia a kanamicina; operador lac: secuencia de unión al represor LacI). Por otro lado se indica el PM teórico de la proteína que codifica el ORF eIF4E.

Las bacterias transformadas con la construcción pET-eIF4E fueron inducidas con 0,4 mM de IPTG durante 4 hs. La muestra previa a la inducción (T_0) y la correspondiente al tiempo final del cultivo (T_F) fueron analizadas mediante SDS-PAGE, al igual que las muestras correspondientes a la fracción soluble e insoluble (**figura 6.15**). Es importante destacar la conveniencia de utilizar un sistema procariota para la producción de eIF4E, dado que las bacterias son incapaces de sintetizar m^7 GTP (7-metilguanosina trifosfato, m^7 GTP), por lo que la proteína producida estará libre de CAP, permitiendo su posterior purificación mediante esta interacción.

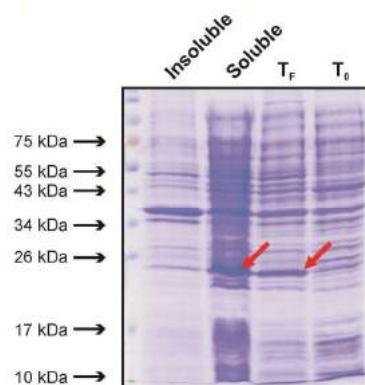


Figura 6.15. Expresión de la proteína eIF4E. SDS-PAGE 15% de las muestras correspondientes al inicio de la inducción del cultivo (T_0) y al final de la incubación (T_F), junto con las muestras de las fracciones soluble e insoluble. Las flechas rojas indican la banda sobreexpresada de aproximadamente 25 kDa, también presente en la fracción soluble.

Purificación de eIF4E

Con el objetivo de purificar la proteína eIF4E sin la adición de secuencias heterólogas, se aprovechó la capacidad de la misma para unir a m^7 GTP, utilizando una resina unida a m^7 GTP (m^7 GTP-*Sepharose*, Amersham). Como material de partida de la purificación se utilizó la fracción soluble obtenida (**figura 6.15**). Las fracciones obtenidas conteniendo eIF4E fueron agrupadas, concentradas y cargadas en una columna *Superdex 200* (**figura 6.16 A y B**). Este último paso confirmó que la proteína de interés se encontró mayoritariamente en su forma monomérica (no agregada) (**figura 6.16 C**).

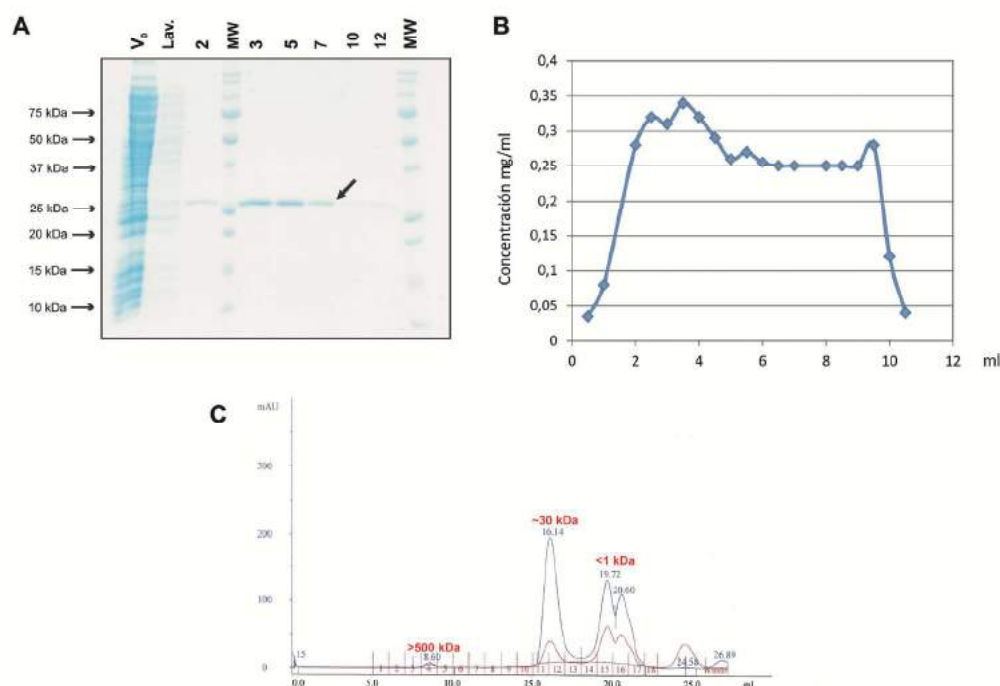


Figura 6.16. Purificación de eIF4E. **A.** Análisis mediante SDS-PAGE 15% de la purificación mediante columna de afinidad de la proteína eIF4E. (V_0), volumen muerto de la columna de afinidad; (Lav.), muestras correspondiente al lavado con *buffer* de equilibrio; (2 – 12), fracciones luego de la elución con GDP. **B.** Cuantificación de cada fracción obtenida mediante el método de Bradford. **C.** Perfil de elución de la purificación de eIF4E mediante columna de filtración en gel.

PRODUCCIÓN DE SUEROS POLICLONALES

Titulación del suero policlonal α -Tio-Z-V5

Se produjo suero policlonal α -Tio-Z-V5-His a partir de la inoculación de conejos con la proteína purificada Tio-Z-V5-His (Cherñac, Tesina de licenciatura, 2006), en colaboración con el Laboratorio de Virología de la Universidad Nacional de Quilmes). Para su titulación, se determinó el valor de corte del ensayo utilizando un panel de sueros policlones heterólogos (cedidos por la Dra. Graciela Glikman). Este valor es equivalente al promedio de los valores de absorbancia, sumado a dos desvíos estándar (DE). (Valor de corte = Promedio + 2 * DE)

Para llevar a cabo el análisis se realizó un ensayo de EIE indirecto utilizando como antígeno a la proteína de fusión GST-Z, cuya producción y purificación fue descrita previamente. Luego de la optimización de las condiciones, el suero policlonal

heterólogo fue ensayado en una dilución de 1/300, mientras que el anticuerpo secundario (suero de cabra α -IgG de conejo) se utilizó en una dilución de 1/16000. Para el cálculo del valor de corte, se sembraron 36 puntos conteniendo la misma cantidad de antígeno. El promedio del valor de absorbancia obtenido en el ensayo fue de 0,143 y el Desvío Estándar calculado de $\pm 0,011$. De esta manera, el valor de corte obtenido fue de 0,165, y utilizando este número fue posible determinar el título de anticuerpos del suero policlonal obtenido contra la proteína Tio-Z-V5-His.

El título de anticuerpos, se definió como la inversa de la última dilución de suero que da reacción positiva; tomando como reacción positiva los valores que superan el valor de corte. Para la determinación del título de los anticuerpos obtenidos se llevó a cabo un EIE en las mismas condiciones del ensayo de determinación de valor de corte. A partir del suero policlonal se realizaron diferentes diluciones seriadas, comenzando con la dilución 1/1000. De esta manera, el título de anticuerpos en el suero policlonal α -Tio-Z-V5-His de conejo obtenido fue de 128000.

Purificación de Inmunoglobulinas tipo G

A partir del suero α -Tio-Z-V5-His se purificaron las inmunoglobulinas de tipo G mediante cromatografía de afinidad con la resina *Protein G - Sepharose Fast Flow* (Amersham Pharmacia). Las fracciones obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE (figura 6.17) y cuantificadas por el método de Bradford, utilizando una curva de calibración de IgGs de cabra. En la Figura se observan dos bandas correspondientes a la cadena pesada y liviana de las IgGs obtenidas. Se colectaron las fracciones de mayor absorbancia, se concentraron y se determinó la concentración final (3,19 mg/ml).

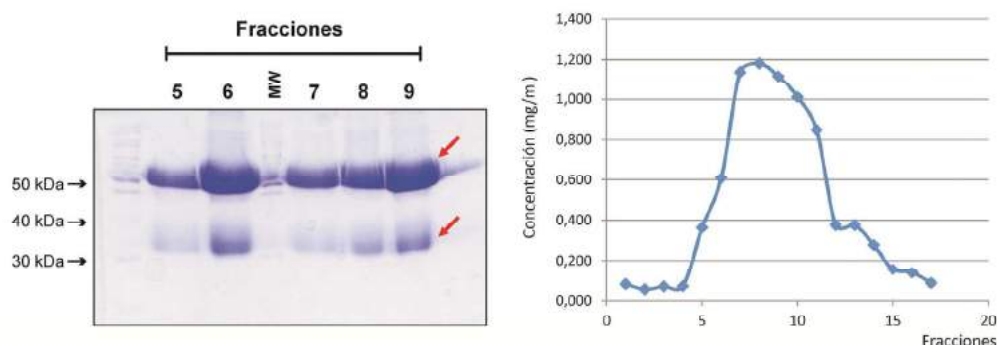


Figura 6.17. Purificación de Inmunoglobulinas tipo G. A. SDS-PAGE 12% de la purificación de IgG por cromatografía de afinidad. Línea 1 y 4. Marcador de peso molecular (Fermentas); 2.

Fracción 5. **3.** Fracción 6; **5.** Fracción 7; **6.** Fracción 8; **7.** Fracción 9. Las flechas rojas indican las bandas correspondientes a la cadena pesada y liviana de las inmunoglobulinas. **B.** Perfil de elución de la purificación de IgG realizando el seguimiento de absorbancia a 595nm (Bradford) de las diferentes fracciones, y extrapolando los datos a mg/ml, utilizando una curva de calibración de Inmunoglobulinas de cabra.

Producción del suero policlonal α -GFP

Para la obtención de un suero policlonal α -GFP se inocularon 10 μ g de proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*) purificada con adjuvante completo de Freund en ratones Balb/C. Se realizaron refuerzos a los 21 días. Se tomaron muestras cada 7 días de suero de ratón y se analizaron mediante enzimo-inmuno ensayo (EIE). A partir del día 14 se observó el máximo de producción de anticuerpos y se mantuvo hasta el día 42 (**figura 6.18**). Los sueros colectados al día 42 serán posteriormente utilizados en ensayos de inmunodetección.

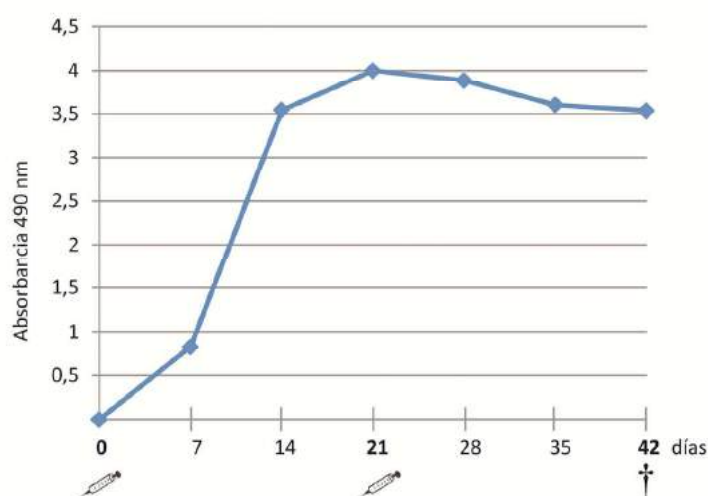


Figura 6.18. Producción de suero α -GFP. Detección de IgG α -GFP mediante EIE de los sueros de los días 0, 7, 14, 21, 35 y 42. El suero policlonal se utilizó en una dilución 1/50, mientras que el suero α -IgG de ratón se utilizó en una dilución 1/2000. Los datos graficados son un promedio de los 3 ratones del grupo.

Titulación del suero policlonal α -GFP

Para la titulación del suero policlonal α -GFP se utilizó nuevamente el cálculo del valor de corte (*cutoff*) previamente mencionado. Para esto se realizó un EIE indirecto utilizando como antígeno a la proteína GFP, y sueros policlonales heterólogos en una

dilución 1/200, junto con el suero α -IgG de ratón en una dilución 1/2000. De esta manera el valor promedio de absorbancia obtenido fue de 0,016 con una desviación estándar de 0,015. Por lo tanto, se obtuvo un valor de corte de 0,047.

Luego de haber calculado el *cutoff* para el EIE, se realizó un nuevo EIE indirecto donde la última dilución del suero α -GFP en otorgar un valor de absorbancia superior al *cutoff* fue 1/25600. Por lo tanto el título estimado para el suero policlonal α -GFP obtenido de ratón fue 25600.

Discusión

En este capítulo se describió el desarrollo de la mayoría de las herramientas necesarias (producción y purificación de proteínas recombinantes, generación de virus recombinantes, generación de distintos anticuerpos, obtención de virus, etc.) para realizar los ensayos que nos permitieron alcanzar los objetivos de esta tesis.

En primer lugar, se obtuvo la proteína recombinante Tio-Z-V5-His expresada en *E. Coli*, con buenos rendimientos y en su forma soluble. Durante el primer paso de purificación utilizando una columna de IMAC, el perfil observado presentó dos picos mayoritarios indicando la purificación de dos especies conformacionales indistinguibles en el análisis por SDS-PAGE. Ambos picos fueron analizados por gel filtración, y se concluyó que el primero de ellos contenía muy bajos niveles de Tio-Z-V5-His en comparación al segundo pico. En consecuencia, los estudios se continuaron con las fracciones del segundo pico agrupadas y concentradas. Una vez purificada Tio-Z-V5-His se eliminó la porción correspondiente a Tioredoxina mediante el tratamiento con Enteroquinasa y se purificó Z-V5-His. El tratamiento con la proteasa específica permitió la obtención de Z con una menor proporción de secuencias heterólogas, sin embargo esto produjo una disminución significativa de la eficiencia de producción.

Se utilizó la proteína completa para la producción de anticuerpos, dado que para la producción de un suero policlonal la presencia de Tioredoxina no resultó ser excluyente, y facilitó los pasos de producción y purificación. Finalmente, utilizando Tio-Z-V5-His se logró obtener un suero policlonal de conejo α -Tio-Z-V5-His con un título aproximado de 128000. A partir del suero se purificaron Inmunoglobulinas G, las cuales serán utilizadas en ensayos de inmunodetección (*Western blot*, *Dot blot*, EIE, *immunogold*, inmunocitoquímica).

Para obtener la proteína Z purificada en su conformación nativa, sin el agregado de secuencias heterólogas para su posterior cristalización, se construyó la proteína recombinante GST-Z y se la expresó en *E. Coli*. La adición de Zn^{+2} en el medio de cultivo y en la solución de lisis, previamente descrita por (Volpon *et al.*, 2008), permitió la obtención de la proteína en la fracción soluble, en una proporción significativa. Sin embargo mediante el análisis por gel filtración de GST-Z purificada, fue posible observar la presencia de dos variantes mayoritarias, la proteína en su forma polimérica o monomérica. Este fenómeno de agregación fue previamente reportado por (Kentsis *et al.*, 2002b), donde se detectó a la proteína de fusión GST-Z (LCMV) en la formación de agregados amorfos. Los autores interpretaron que la presencia de GST podría interferir en el ensamblado de la proteína Z, posiblemente inhibiendo estéricamente la formación de los intermediarios durante el ensamblado, lo

que podría explicar lo obtenido en este trabajo. Para el estudio estructural por difracción de rayos X se purificó la fracción monomérica. Por otro lado, luego de la purificación de GST-Z, se observó la presencia de dos proteínas adicionales, producto de la degradación o procesamiento sitio específico de GST-Z y confirmada mediante secuenciación del extremo N- terminal. Este mismo perfil de co-purificación y procesamiento proteolítico fue observado por Hayashi y Kojima en la publicación de un vector de expresión inducible por frío basado en la fusión de GST a las proteínas en estudio (Hayashi & Kojima, 2008).

Debido a estas irregularidades observadas durante los pasos de purificación, se evaluó la modificación de la secuencia proteica, de manera de continuar los estudios con la expresión de dominios conformacionales estables. Para esto se analizó la presencia de regiones conformacionales protegidas del ataque de proteasas utilizando un ensayo de proteólisis limitada con las enzimas tripsina y quimiotripsina. A partir de los datos obtenidos fue posible inferir que el dominio más estructurado, correspondiente al péptido de aproximadamente 25 kDa correspondía a la proteína GST, la cual no fue proteolizada aún en las concentraciones más altas de las proteasas. También fue posible detectar otros fragmentos preservados de la proteólisis, los cuales fueron secuenciados. Uno de estos fragmentos (6,8 kDa) poseía en su extremo N-terminal los aminoácidos GRYNCK. Como se observa en la **figura 5.1** del capítulo 5, esta región corresponde a una secuencia totalmente conservada entre los miembros del Nuevo Mundo, la cual se encuentra en el comienzo del dominio RING. Estos resultados son compatibles con lo previamente descrito sobre la estructura de Z determinada por RMN (Volpon *et al.*, 2008), donde se observó una mayor estructura alrededor del dominio RING y una mayor flexibilidad en la regiones terminales. Por esta razón, en 2010 Volpon repitió la estructura de Z con mayor detalle, utilizando el complejo proteico formado por el factor eIF4E y Z, el cual estabiliza ambas estructuras (Volpon *et al.*, 2010). Por último, la obtención de Z sin el agregado de GST resultó ser un proceso poco eficiente, por lo que sería necesario el procesamiento de grandes cantidades de cultivo transformado para la obtención de cantidades significativas de Z, tal que sea posible realizar ensayos de cristalización.

Por otro lado con el objetivo de expresar Z en un sistema eucariota, la proteína His-Z fue expresada en células de insecto Sf9 utilizando el sistema Bac-to-Bac. Si bien este sistema permite la obtención de grandes cantidades de la proteína recombinante (hasta un 30% de las proteínas totales) no fue posible visualizar una banda de sobreexpresión. Sin embargo fue posible detectar His-Z por *western blot* con IgG α -Tio-Z-V5-His en la fracción celular, aunque la misma se vió acompañada de una banda de menor peso molecular, quizá un producto de degradación de la misma.

Por otro lado, para los estudios de funcionalidad *in vitro* e interacción con Z, se realizó la expresión y purificación del factor eIF4E. Esto último se realizó de manera eficiente utilizando la propiedad intrínseca del factor de interactuar con el m⁷GTP.

Además, con el objetivo de producir herramientas que posibiliten futuros estudios, se realizó la producción de un suero policlonal α -GFP en ratones. La obtención de las proteínas recombinantes y de herramientas que permitan la inmunodetección, serán fundamentales para los posteriores estudios *in vivo* e *in vitro*.

SECCIÓN III
ESTUDIOS DE
FUNCIONALIDAD *IN VITRO*



INTERACCIÓN Z-eIF4E

CAPÍTULO 7

INTRODUCCIÓN

Actualmente es de interés conocer en profundidad los procesos moleculares que ocurren durante la infección por arenavirus, particularmente para la búsqueda de blancos antivirales. Los blancos de mayor interés residen en los mecanismos de brotación viral.

Como ya se mencionó en el capítulo 3, en los arenavirus este proceso es dirigido principalmente por la proteína Z, por lo que se ha convertido en un blanco de drogas antivirales muy estudiado.

Para el estudio de Z, es necesaria la expresión y purificación de la proteína. En este capítulo se describe la metodología utilizada para la purificación de la proteína nativa, sin agregados de dominios de purificación, utilizando su capacidad de unión al factor de traducción eIF4E. Si bien, es posible desarrollar resinas de este tipo utilizando anticuerpos contra Z, la interacción de Z con los anticuerpos no asegura el mantenimiento de su conformación nativa.

Por otro lado, en base a las características encontradas en Z en esta sección se propone el desarrollo de un sistema de purificación de proteínas recombinantes general (fusionadas a Z) utilizando una matriz de sefarosa unida al factor eIF4E

RESULTADOS

Pulldown de GST-Z y eIF4E

La interacción Z-eIF4E ha sido descrita y caracterizada para el virus LCMV (Kentsis 2001, Campbell dwyer 2000) y LASV (Volpon *et al.* 2010), ambos representantes del clado de Arenavirus del Viejo Mundo. Si bien es de esperar que esta característica se conserve a través de los miembros del Nuevo Mundo también, se realizó un ensayo de recuperación por atracción (*pulldown*) para confirmar esta hipótesis con la proteína Z del Virus Junín (figura 7.1). Para este ensayo se ligó a la resina *glutathione Sepharose* 4B (GE Healthcare) la proteína recombinante GST-Z, cuya producción fue previamente descrita en el capítulo 6, y se determinó la capacidad de esta resina modificada de retener a la proteína eIF4E (expresada en *E. coli* y purificada, capítulo 6).

La proteína GST-Z fue ligada a la resina utilizando un sistema en *batch*, luego para evaluar la retención de eIF4E se incubó la resina-GST-Z con el factor purificado, se realizaron lavados y se detectó la presencia de las proteínas mediante *Western blot*.

Si bien GST-Z se visualiza a través de la presencia de 3 bandas (37, 30 y 28 kDa) la identidad de las mismas fue previamente caracterizada, demostrando que las bandas adicionales son productos de degradación secuencial a partir del C-terminal de la proteína recombinante, por lo que van perdiendo secuencias de Z (capítulo 6). Por otro lado, la expresión del factor eIF4E previa a la purificación contiene tres bandas detectadas con anticuerpos monoclonales α -eIF4E, sin embargo luego de su purificación se obtiene la banda de 25 kDa, identificada como eIF4E por secuenciación de Edman, que es la que utilizamos en este experimento.

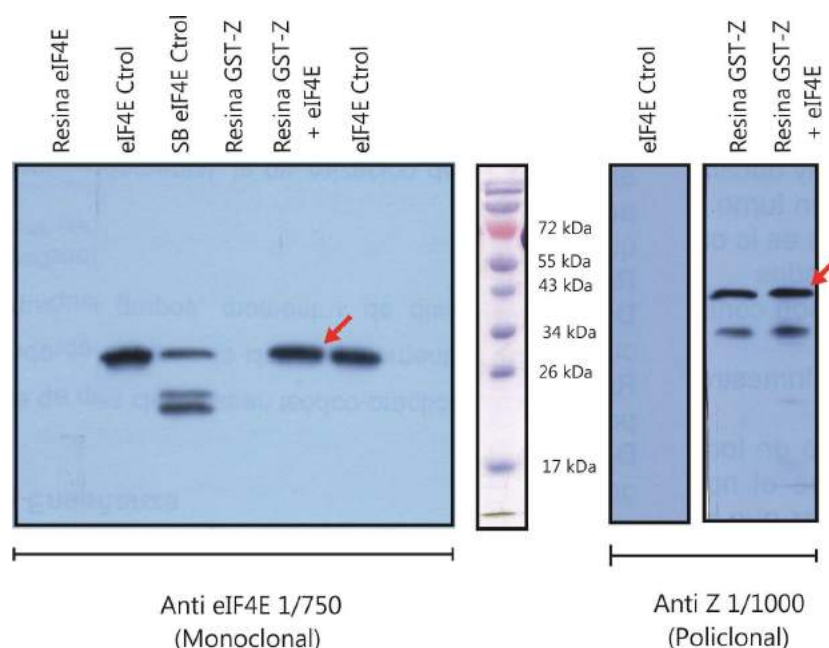


Figura 7.1. *Western blot* con anticuerpos monoclonales α -eIF4E y policlonales α -Z (según se indica en la figura) del ensayo de *pull-down* de GST-Z y eIF4E. De izquierda a derecha, la primer línea corresponde a la incubación de la resina *Gluthathion Sepharose 4B* con el factor eIF4E. A continuación el control positivo del inmunoensayo correspondiente a eIF4E purificada y luego, la fracción celular de la lisis de bacterias expresando eIF4E. La siguiente línea corresponde a la resina unida a GST-Z y a continuación, la resina unida a GST-Z incubada con eIF4E. Por último, se sembró nuevamente el control positivo de eIF4E. El siguiente panel, revelado con IgG α -Z, contiene en la primer línea eIF4E purificado (control), en la siguiente línea, la resina unida a GST-Z y finalmente, la resina unida a GST-Z incubada con eIF4E. Las flechas rojas indican la señal en las calles donde se evidencia la unión de GST-Z a eIF4E.

Como se observa en la **figura 7.1**, luego de la incubación del factor eIF4E con la resina modificada, es posible detectar la presencia del factor eIF4E luego de los lavados, utilizando anticuerpos α -eIF4E y α -Z. Por otro lado el control de incubación de la resina sin modificar con eIF4E no fue capaz de retener al factor, no evidenciando señal para eIF4E, al igual que el control negativo, la resina modificada con GST-Z sin contacto con el factor. El control de incubación de eIF4E con la resina unida a GST (sin Z) no fue realizado en este ensayo, ya que previamente se reportó que eIF4E no es capaz de unir a GST (Kentsis *et al.*, 2001). Estos resultados indicarían que la proteína eIF4E es capaz de interaccionar con la proteína Z del Virus Junín, de la cepa Candid#1.

Desarrollo de un sistema de purificación basado en la proteína Z

A partir de los resultados obtenidos de la interacción de Z y el factor eIF4E, y teniendo en cuenta las características de Z (tamaño, estructura), se pensó en la utilización de la misma como dominio de purificación de proteínas recombinantes.

A lo largo de este trabajo, en diferentes ensayos pudimos comprobar que es posible fusionar péptidos por el extremo N-terminal (GST-Z) o C-terminal (Tio-Z-V5-His, Z-EGFP) de Z, sin afectar su actividad de unión al factor eIF4E; y fusiones en el extremo C-terminal tampoco interfieren con la actividad de brotación en células de mamífero o insecto. Por otro lado, Z presenta un tamaño relativamente pequeño, lo cual permite su manipulación de forma sencilla.

En base a estas características se desarrolló un sistema para expresar proteínas recombinantes y purificarlas mediante una matriz de afinidad. Por otro lado el sistema permitiría la expresión de proteínas en células eucariotas y su recuperación del sobrenadante, a través de la purificación las VLPs derivadas.

Para el desarrollo del sistema se construyó una matriz de sefarosa unida covalentemente al factor eIF4E previamente purificado (colaboración con el Dr. M. Graselli, Laboratorio de Materiales Biotecnológicos - UNQ), y a partir del clon conteniendo el plásmido pET-Z se obtuvo la proteína recombinante Tio-Z-V5-His. Esta fue utilizada para evaluar la capacidad de unión de la matriz previamente armada, y ensayar la purificación de la proteína recombinante Tio-Z-V5-His. Inicialmente el ensayo fue diseñado en *batch* utilizando la resina unida a eIF4E y Tio-Z-V5-His purificada. Luego de la purificación fueron analizadas las fracciones mediante SDS-PAGE, y como se muestra en la **figura 7.2** se obtuvo una alta eficiencia de unión del factor eIF4E a la resina (calle 1 y 2), dado que la proporción de eIF4E antes y después de la incubación es significativamente menor. El siguiente gel mostrado en la **figura 7.2** indica la eficiencia del sistema de purificación basado en Z. La muestra control (**figura 7.2**, Sep. control) corresponde a la incubación de Tio-Z-V5-His con la resina *Sepharose* no unida a eIF4E, realizando el protocolo en paralelo a la muestra ensayada. Se observa que a pesar de que una fracción importante de la proteína se mantuvo en el volumen muerto (V_0), la proteína Tio-Z-V5-His fue efectivamente retenida por la resina modificada (eIF4E Sep. + Tio-Z-V5-His) y que una proporción muy baja de la proteína fue separada por los lavados (Lavado 1). La muestra control (Sep. Control) no evidencia la presencia de Tio-Z-V5-His.

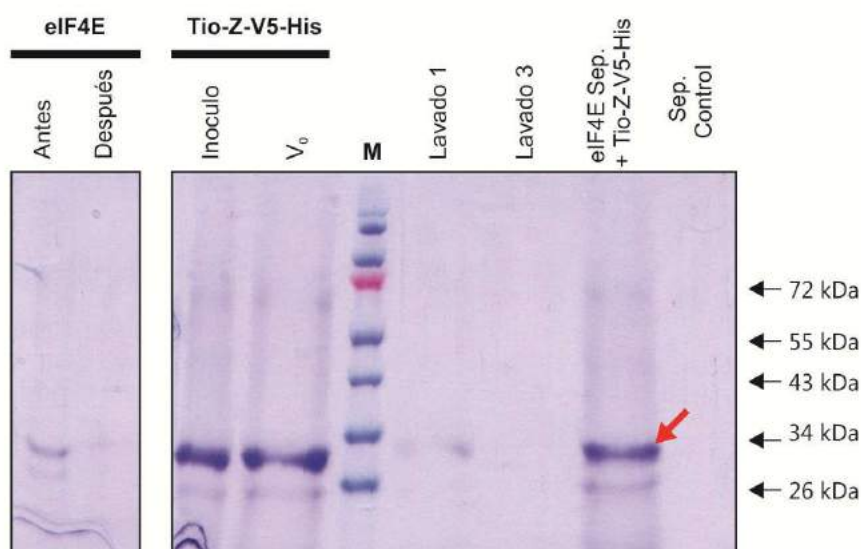


Figura 7.2. Análisis de la interacción de Tio-Z-V5-His con la resina eIF4E-Sepharose mediante SDS-PAGE. El primer panel corresponde a la muestra de eIF4E purificado antes y después de ser incubada con la resina Sepharose activada. El siguiente panel corresponde al ensayo de interacción, donde la primera línea corresponde a Tio-Z-V5-His previamente purificada y a la fracción del volumen muerto de la columna (V_0). La resina incubada con Tio-Z-V5-His fue lavada 3 veces con PBS 0,5M KCl 1% NP-40, y una fracción del sobrenadante de cada lavado fue analizada. A continuación del marcador de peso molecular (M) se muestran el primer y tercer lavado de la resina. Por último, se encuentran la muestra correspondiente a la resina eIF4E Sepharose incubada con Tio-Z-V5-His indicando la proteína retenida después de los lavados (señalado con la flecha roja), y a la resina Sepharose (sin estar unida a eIF4E) incubada con Tio-Z-V5-His (Sep. control).

Estos resultados evidencian que fue posible retener la proteína recombinante Tio-Z-V5-His en la resina eIF4E Sepharose. Como se puede ver en la calle donde se sembró solo la proteína (inóculo) comparada con la del volumen muerto obtenido luego de la interacción con la matriz (V_0), mucha de la proteína no fue retenida. Esto puede ser debido a la saturación de la resina o las condiciones de unión, las cuales deben ser optimizadas.

DISCUSIÓN

El ensayo de *pulldown* entre GST-Z y eIF4E demostró que, igual que lo que ocurre para el virus LCM, la proteína Z del virus Junín interacciona con el factor eIF4E. Esto coincide con el elevado grado de conservación de la secuencia de Z observado en los análisis realizados *in silico* (capítulo 5) y se encuentra directamente asociado a la función de interacción con proteínas celulares altamente conservadas. Esto permitiría inferir que esta propiedad quizá se conserve también para otros miembros del grupo del Nuevo Mundo.

La metodología ensayada en este capítulo representa una importante herramienta para el estudio de Z y la identificación de las proteínas y moléculas con las que interacciona durante el ciclo viral.

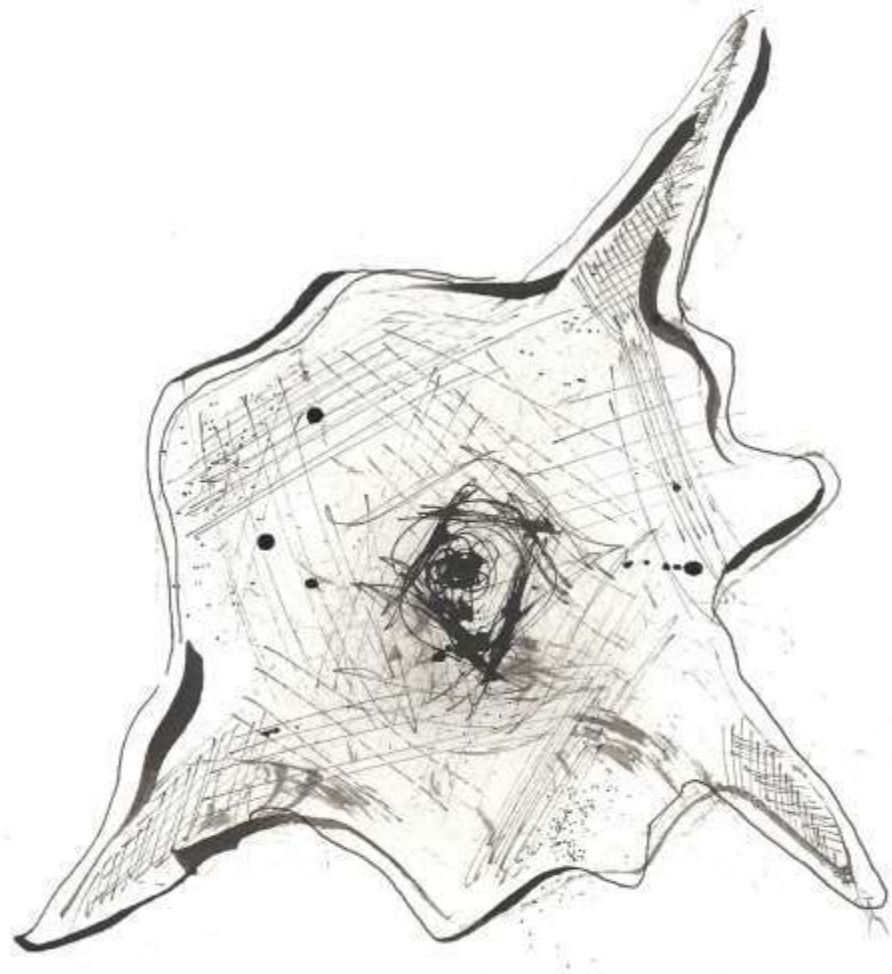
Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas encontradas para Z, se planteó aplicarlas al desarrollo de un sistema de purificación de proteínas recombinantes general. Para ello se construyó una matriz unida al factor eIF4E y se evaluó la interacción con una proteína fusionada a Z. Los resultados obtenidos de la utilización de Z como dominio de purificación de proteínas recombinantes mostraron que es posible unir el factor a la resina de sefarosa (sin modificar su actividad de interacción con Z), y que Z fusionada por el extremo N-terminal es capaz de unir al factor mediante su afinidad con el mismo.

Si bien estos resultados son preliminares nos indican que es posible el desarrollo de este sistema. Sin embargo, resta determinar la eficiencia del mismo, las constantes de afinidad, la capacidad de unión de la resina, y los parámetros óptimos para la interacción proteína-matriz y su elución.

Por otro lado, el sistema general fue diseñado con varios componentes. Entre ellos un plásmido que permite la expresión de proteínas en células de mamíferos y bacterias, dependiendo las necesidades de las etapas de *downstream*. En el diseño del sistema está contemplada la utilización de la actividad de Z para inducir la brotación de VLPs en células de mamíferos (ver capítulo 9) y purificar las proteínas del medio de cultivo. Para ello, el vector de expresión permite generar proteínas fusionadas por el extremo N o C-terminal de Z, dependiendo como será su purificación, entre otras cosas.

Este sistema presenta ventajas asociadas a la flexibilidad de elección de las células de expresión que se utilizaría, sería el primero descrito basado en las actividades de la proteína Z y representa la aplicación de parte de la información obtenida en este trabajo de tesis.

SECCIÓN IV
ESTUDIOS DE
FUNCIONALIDAD *IN VIVO*



MECANISMOS DE EVASIÓN DE LAS
DEFENSAS CELULARES
CAPÍTULO 8

INTRODUCCIÓN

Los familia *Arenaviridae* se caracteriza por incluir virus de ARN simple cadena de polaridad ambisentido. La estrategia de replicación de estos virus incluye intermediarios doble cadena, los cuales son blanco de detección para los sistemas de defensa celulares contra virus de estas características. Esta familia viral contiene varios miembros causantes de fiebres hemorrágicas en humanos, en particular la fiebre hemorrágica Argentina causada por el virus Junín, lo que nos indica la presencia de sistemas de evasión de la respuesta inmune del huésped, más específicamente del sistema de ARNi

La célula hospedadora posee una amplia variedad de mecanismos de detección viral y de sus intermediarios de la replicación, los cuales en última instancia, desencadenan en la producción de interferón (IFN) (Kanneganti, 2010). Esta cascada de señalización comienza con varias clases de los receptores de reconocimiento de patrones (RRP), incluyendo los receptores tipo Toll (TLR), *RIG-I-like receptors* (RLRs), y con los dominios de unión a nucleótidos *NOD-Like receptors* (NLRs), entre otros. La señalización a través de estas moléculas conduce a la activación de NF- κ B, IRF3, IRF-5 e IRF7, quienes promueven la expresión de IFN α y β . Sin embargo, numerosas especies virales han adquirido mecanismos de evasión que les permiten hacer efectivo el ciclo viral, y perdurar su progenie. Influenza y HBV poseen proteínas capaces de inhibir la ubiquitinación de RIG-I, lo que altera su función, e interfiere con la cascada de inducción de IFN. El virus de la diarrea viral bovina (BVDV), los rotavirus y el virus de la fiebre clásica del cisne (CSFV) incluyen en su genoma factores que inducen la degradación de IRF-3 e IRF-7. Estos y otros tantos ejemplos de mecanismos de evasión se encuentran citados por Gustin *et al.*, (2011), los cuales pueden ser clasificados según su blanco de acción.

En virus capaces de realizar infecciones persistentes es de fundamental importancia poder inhibir la expresión de interferón o su cascada de señalización. Los arenavirus han sido ampliamente estudiados como modelo de infección persistente, y como se ha descrito recientemente, la nucleoproteína viral de LCMV y la de otros miembros de los Arenavirus del Nuevo Mundo, es capaz de modular la producción de interferón en la célula hospedadora.

Otro de los mecanismos de defensa de la célula ante la infección viral es la maquinaria de ARN de interferencia (ARNi). Este es un mecanismo de silenciamiento génico específico de secuencia, que en células eucariotas es inducido por la presencia de ARN de doble cadena. Actualmente se conoce que la maquinaria de ARNi funciona en dos procesos distintos. En primer lugar, durante la regulación post-transcripcional

de la expresión de genes celulares mediante los microARN (miARNs), y en segundo lugar, en la inhibición de infecciones virales o en el silenciamiento de elementos transponibles mediante la generación de pequeños ARN de interferencia (o *small interfering ARNs* de 20-21 nt, siARN). Estos siARNs pueden ser originados a partir de estructuras secundarias presentes en el genoma viral o de intermediarios de replicación de ARN de doble cadena.

Interesantemente, ambos procesos de miARN y de siARN comparten algunos componentes proteicos, como Dicer y RISC, lo que induce a pensar que operan de manera similar. En particular, la maquinaria de ARNi además de poseer la función regulatoria, posee una función antiviral, y es de esperar que los virus capaces de completar el ciclo viral hayan adquirido mecanismos de evasión a esta estrategia de defensa celular. Se supone que estos mecanismos incluyen la expresión de proteínas supresoras de ARNi que inactivan mediante distintos blancos de acción a la maquinaria de ARNi.

En el año 2001 Carthew postuló que el ARNi fue inicialmente desarrollado como una forma temprana de la inmunidad innata celular dirigida al reconocimiento y silenciamiento de los ácidos nucleicos potencialmente dañinos (por ejemplo, virus y transposones) (Carthew, R. W. 2001). Lo que indicaría que estos mecanismos de defensa han sido conservados desde el inicio de la vida en la Tierra y han co-evolucionado con los agentes infecciosos.

La interacción entre los virus y la maquinaria de ARNi como un sistema de defensa antiviral fue primeramente descrita en plantas, a partir de la presencia de factores necesarios para la infección viral que se convertían en dispensables al afectar el mecanismo de ARNi del hospedador. Sin embargo, actualmente se encuentran numerosos reportes de proteínas o ARNs supresores de la maquinaria de ARNi (RSS) en virus de nematodos, insectos y mamíferos (ver **tabla 8.1**)

Para poder comprender el mecanismo de acción de los supresores de la maquinaria de ARNi, primero es necesario describir su funcionamiento como mecanismo de defensa celular. El proceso comienza cuando moléculas de ARN de doble cadena son introducidas en un organismo (por infección viral o por transfección), y las mismas son reconocidas por la célula y unidas a una enzima llamada DICER. Esta enzima cataliza el corte del ARNdc en fragmentos de alrededor de 20-21 nt. Estos pequeños ARNdc (siARNs) se incorporan en un complejo compuesto por varios factores, entre ellos las proteínas Ago y TRBP, llamado RISC el cual produce la separación de las hebras de ARN. Luego este complejo utiliza la hebra antisentido del siARN como molde para seleccionar el ARNm blanco, el cual quedará unido por complementariedad al siARN presente en el complejo. Finalmente, el complejo RISC cataliza el corte del ARN

blanco, provocando la supresión de la expresión del gen. En el caso de la transfección celular de siARNs, estas moléculas de aproximadamente 22nt son directamente incorporadas en el complejo RISC, evitando el paso de acortamiento del ARNdc mediado por DICER (figura 8.1).

Proteína viral o ARN	Cita
HIV-1 Tat	Bennasser & Jeang, 2006; Qian <i>et al.</i> , 2009
Influenza NS1	de Vries <i>et al.</i> , 2009, Li <i>et al.</i> , 2004
HCV core	Wang <i>et al.</i> , 2006
HCV E2	Ji <i>et al.</i> , 2008
Ebola VP35	Hasnoot <i>et al.</i> , 2007
Vaccinia E3L	Li <i>et al.</i> , 2004
PVF-1 Tas	Bannert <i>et al.</i> , 2004
LACV NSs	Soldan <i>et al.</i> , 2004
Adenovirus VA1 (ARNdc)	Andersson <i>et al.</i> , 2005
WNV y DENV ARNs	Schnetzler <i>et al.</i> , 2012
Nodamura virus B2	Sullivan & Ganem 2005
SARS 7a	Karjee <i>et al.</i> , 2010

Tabla 8.1. Supresores proteicos y no proteicos de la maquinaria de ARNi hallados en virus de nematodos, insectos y mamíferos.

Siendo los miembros de la familia *Arenaviridae* especies con genomas de gran estructura secundaria, podría hipotetizarse que este pueda ser sustrato de DICER y activar la maquinaria de ARNi, tal que así se inhiba la infección viral. Sin embargo, numerosos miembros de esta familia son capaces de completar el ciclo viral, lo que podría ser el indicio de que existen mecanismos virales que permiten evadir las defensas celulares mediadas por ARNi.

El objetivo del presente capítulo fue estudiar la presencia de mecanismos de evasión a las defensas celulares en el virus Junín. Para esto se evaluaron a las proteínas N y Z, debido a la información previa de la nucleoproteína involucrada en la modulación de la expresión de interferón y la alta conservación en la secuencia de la proteína de matriz. Esto último podría inferir la interacción con elementos conservados, como los son los factores celulares. En particular se evaluó la capacidad de N y Z para revertir

el silenciamiento de un gen reportero a partir de siARN específicos, en la línea celular 293T, mediante transfección.

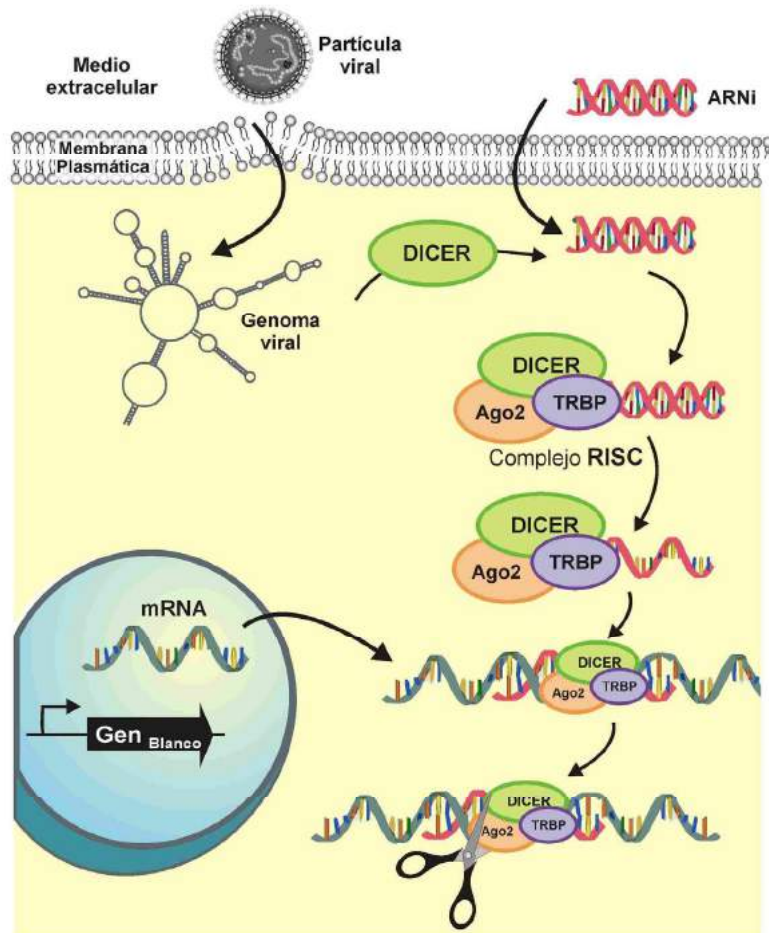


Figura 8.1. Esquema del mecanismo de acción de la maquinaria de ARNi como defensa antiviral. En la figura se muestran dos posibles vías de ingreso de ARN de doble cadena. Una de las vías comienza con la infección viral, y la liberación del genoma viral en el citoplasma. Las regiones de estructura secundaria pueden ser sitios de unión a la enzima DICER, y esta cataliza el corte del ARNdc en fragmentos de 22nt de ARNdc. Otra de las vías de ingreso es mediante la transfección de siARNs de aproximadamente 22nt, los cuales se unen a DICER y al complejo RISC el cual induce la separación de las hebras de ARN. Luego la hebra antisentido, aún unida al complejo, es utilizada como molde para unir al mRNA blanco. Una vez que ocurre la unión, RISC cataliza el corte del intermediario de ARN de doble cadena, inhibiendo así la traducción del mismo.

RESULTADOS

Silenciamiento de EGFP

Para evaluar la respuesta del sistema de silenciamiento de ARN (ARNi) de la célula y optimizar los parámetros de transfección, sensibilidad e interferencia, se realizaron ensayos de transfección transitoria en cultivos de células 293T utilizando el plásmido indicador (pCAGGS-EGFP), el cual posee el promotor fuerte C que combina el promotor del gen Ac de gallina y el promotor CMV-IE (Niwa *et al.*, 1991) permitiendo una expresión aún más intensa que con CMV-IE; el siARN sintético del gen *egfp* (Ambion, EGFP silencer, Cat#AM4626) y el plásmido pSuperRetro-EGFP.

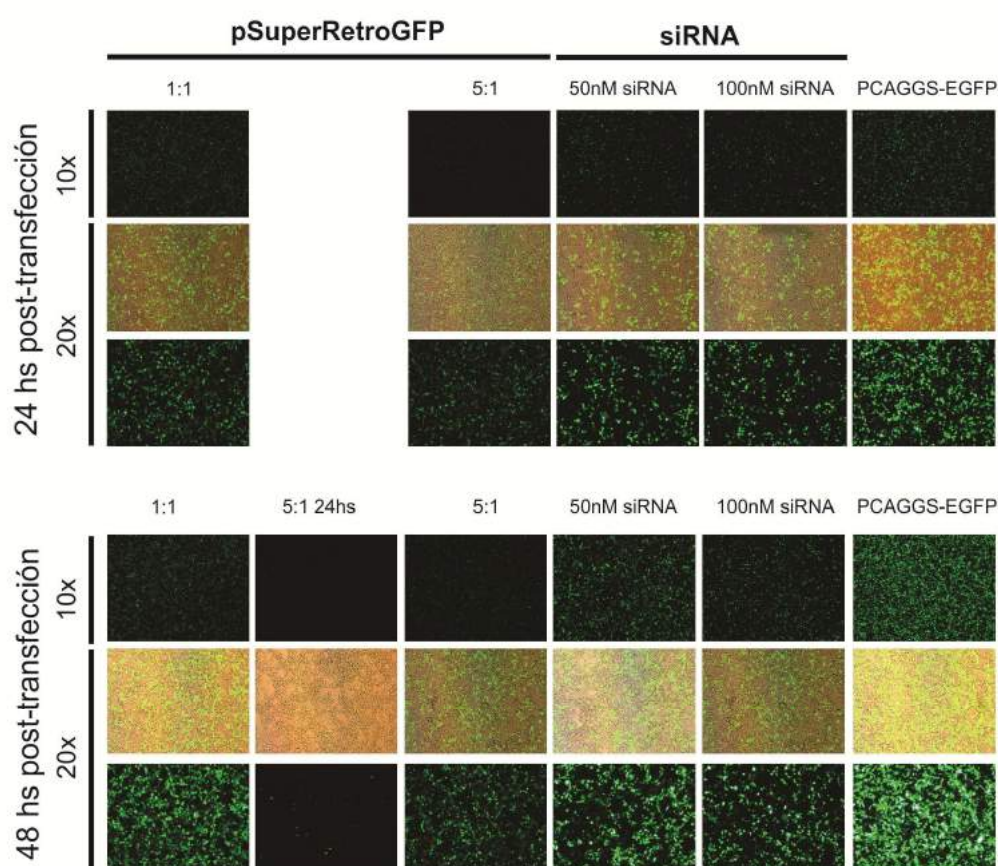


Figura 8.2. Optimización de las condiciones de silenciamiento de EGFP utilizando siARNs sintéticos específicos para EGFP y el vector pSuperRetro-EGFP. En el panel superior se muestra la fluorescencia luego de 24 hs post-transfección con el plásmido pSuperRetro-EGFP y pCAGGS-EGFP en relación 1:1 y 5:1. También se muestra la transfección de pCAGGS-EGFP junto con 50nM y 100nM de siARN contra EGFP. La última columna corresponde al control de transfección sin silenciar, pCAGGS-EGFP. En el panel inferior se observan las

mismas condiciones luego de 48 hs de expresión, y además se adicionó la condición de realizar la transfección de pCAGGS-EGFP 24 hs luego de haber transfectado el plásmido pSuperRetro-EGFP con una masa cinco veces mayor a la utilizada con pCAGGS-EGFP.

El vector pSuperRetro-EGFP codifica para un mARN con estructura secundaria (*Hairpin*) tal que sea sustrato del complejo DICER, produciendo de esta manera siARNs de aproximadamente 21 nt (gentilmente cedido por el Dr. Ariel Rodriguez (figura 8.2). También se incluyó en los controles del ensayo al siRNA Control Negativo #1 (Ambion) el cual no evidenció interferencia sobre la expresión de EGFP (datos no mostrados)

Si bien se obtuvieron niveles significativos de la inhibición de la expresión de EGFP utilizando los siARNs sintéticos o el vector pSuperRetro-EGFP (ver figura 8.3), en el caso del vector los mejores resultados de silenciamiento se obtuvieron mediante la transfección del vector pSuperRetro-GFP con una masa 5 veces mayor al vector pCAGGS-EGFP, lo que incrementó demasiado la masa de ADN a transfectar, pudiendo esto producir artefactos en los resultados. Dado que resultados similares se obtuvieron mediante la adición de 100nM del siARN sintético (70% de inhibición de la expresión de EGFP), se continuaron los estudios utilizando esta condición.

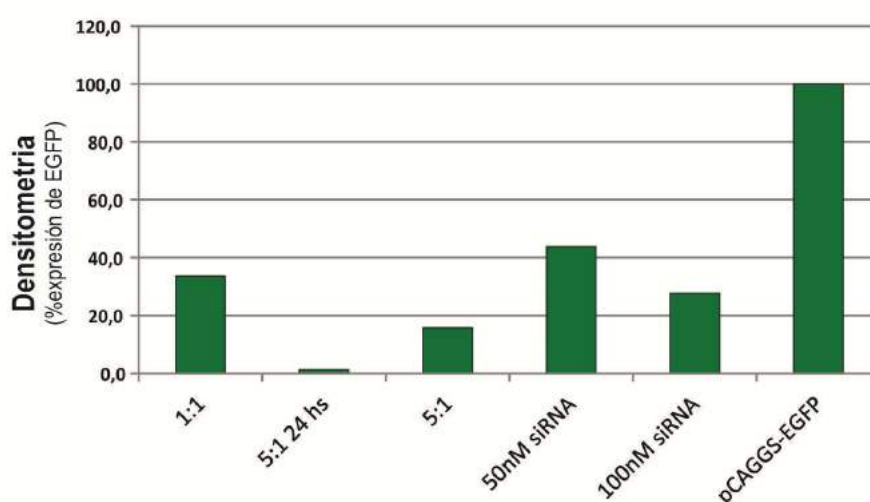


Figura 8.3. Densitometría de la optimización de las condiciones de silenciamiento de EGFP utilizando siARNs sintéticos específicos para EGFP y el vector pSuperRetro-EGFP, figura 8.2. Los valores del eje Y corresponden a unidades arbitrarias de fluorescencia, relativizando el 100% al control positivo de transfección pCAGGS-EGFP.

Evaluación de la actividad supresora de ARNi de las proteínas N y Z

Para el análisis del efecto producido por la expresión de las proteínas Z y N del virus Junín, se construyeron plásmidos de expresión conteniendo los ORF cada una de las proteínas mencionadas del virus Junín, bajo la regulación de los promotores que permitieran su expresión en diferentes sistemas. Se utilizó el promotor de CMV para ensayos en células de mamífero y el promotor 35S para ser utilizado en ensayos con plantas. A partir de estos vectores se realizaron ensayos de transfección transitoria para evaluar la actividad de las proteínas Z y N en la supresión del mecanismo de ARN de interferencia de la célula. (El plásmido pT-Rex-N fue producido por el Dr. Javier Iserte en nuestro laboratorio).

Los ensayos en células de mamífero consistieron en la co-transfección del plásmido pCAGGS-EGFP, el vector conteniendo el ORF de N o Z junto con el siARN de EGFP en células 293T, para luego comparar los niveles de expresión de EGFP en cada condición, contrastando con la condición control, es decir en ausencia de Z o N. (figura 8.4)

A partir de lo observado en la **figura 8.4** es posible confirmar que la presencia del siARN en una concentración de 100nM es capaz de disminuir la expresión de EGFP, y que ese efecto es más evidente luego de 48 hs. Por otro lado, se observó un efecto contundente en la inhibición de la expresión de EGFP en presencia de la proteína Z en las dos condiciones ensayadas. Mientras que en presencia de la proteína N fue posible detectar una expresión significativa de EGFP en presencia del siARN, en comparación a la condición control (pCAGGS + 100nM siARN), el cual fue levemente mayor en la condición de 10:1 con respecto al vector reportero. Este resultado implica que N estaría interfiriendo con el proceso de la inhibición de la expresión de EGFP realizada por el siRNA. Datos cuantitativos aproximados por densitometría de las imágenes de fluorescencia obtenidas, se muestran en la **figura 8.5**.

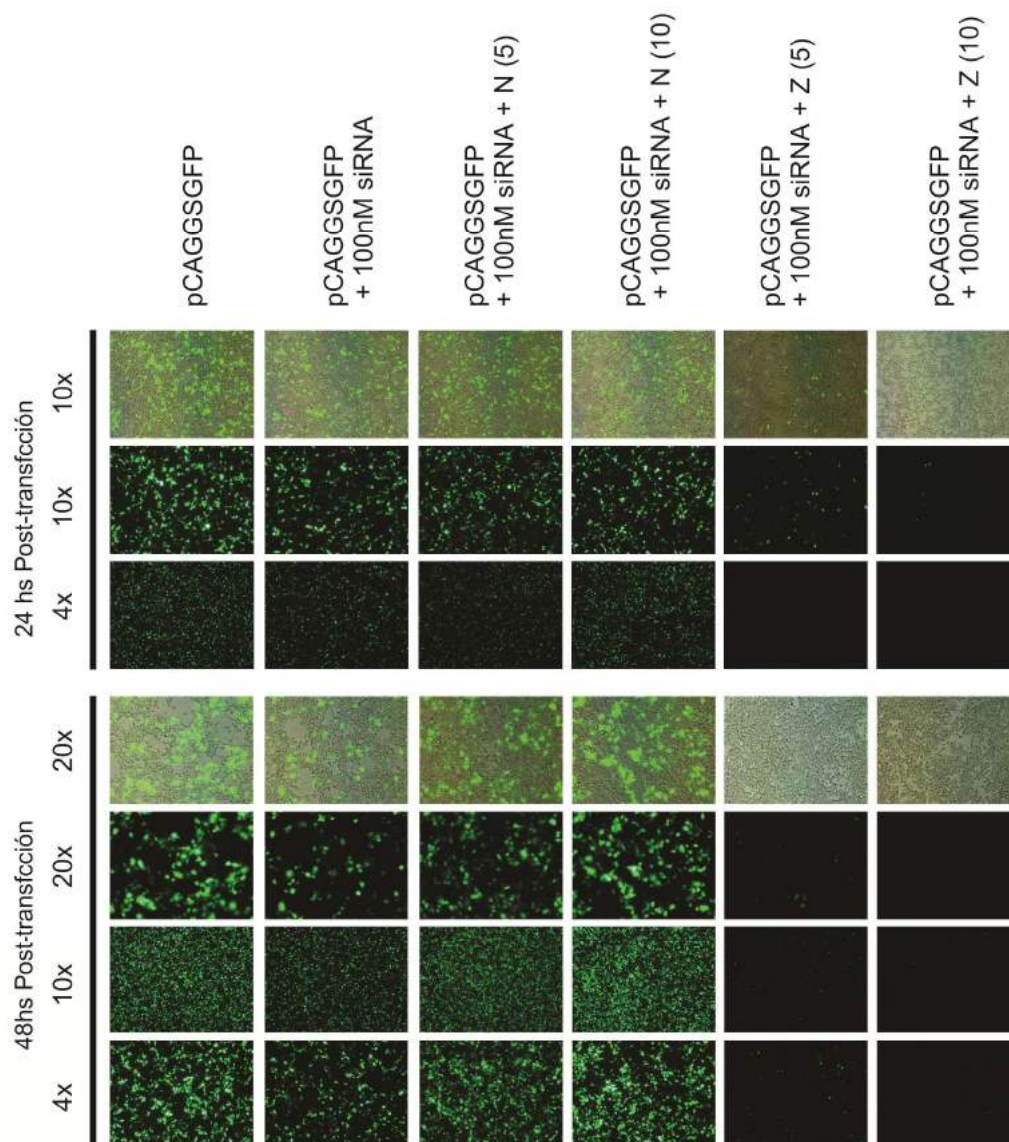


Figura 8.4 Ensayos de evaluación de la actividad supresora de la maquinaria de ARNi en células 293T. El panel superior evidencia los resultados obtenidos luego de 24 horas de expresión, mientras que el panel inferior muestra los resultados obtenidos luego de 48 hs post-transfección. En ambos paneles se incluye a la muestra control de la transfección, pCAGGS-EGFP, y a la muestra control del silenciamiento mediante los siARNs, pCAGGS + 100nM siARN. Las siguientes cuatro condiciones incluyen al vector reportero pCAGGS-EGFP, al siARN y a los vectores de expresión para las proteína Z o N. El número entre paréntesis indica la cantidad de veces que fue multiplicada la masa de los vectores conteniendo Z o N con respecto al vector pCAGGS-EGFP, la cual se utilizó para transfectar.

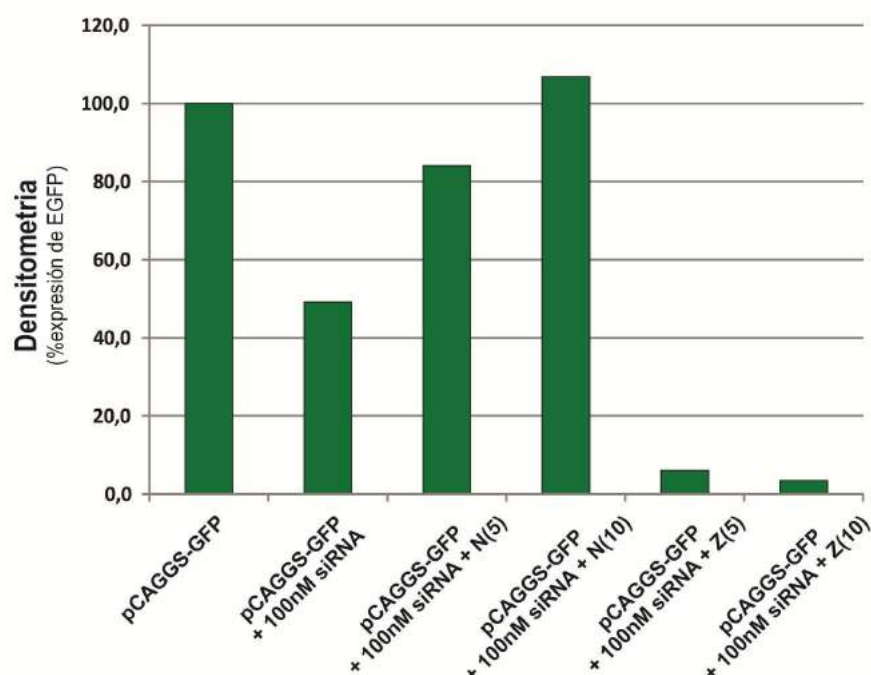


Figura 8.5. Densitometría de los ensayos de evaluación de la actividad supresora de la maquinaria de ARNi en células 293T, correspondiente a la **figura 8.4**. La unidad arbitraria de fluorescencia mostrada en el eje Y, es relativa al control positivo de transfección pCAGGS-EGFP.

En todos los casos la expresión de la proteína N en la fracción celular fue confirmada mediante *Western Blot* con un suero policlonal anti-N (gentilmente cedido por el Dr. Victor Romanowski, IBBM - Universidad Nacional de La Plata) como se muestra en la **figura 8.6**. En el caso de la proteína Z no fue posible confirmar la expresión mediante *Western blot*, dado que no se evidenció señal en ninguna de las muestras ensayadas.

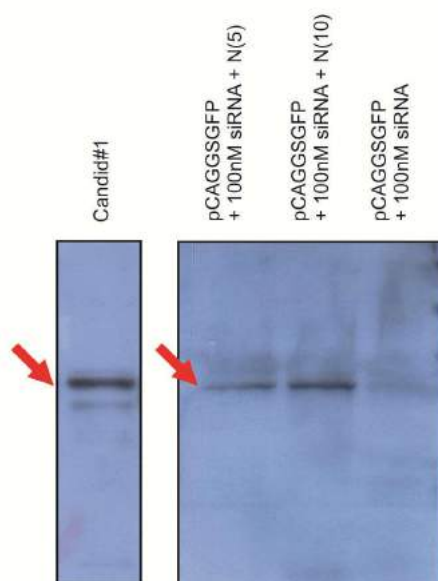


Figura 8.6. Western blot α -N de las fracciones celulares de células 293T transfectadas con pCAGGS-EGFP, 100nM siARN (silenciador de EGFP) y pT-Rex-N. Este último se transfectó en una relación 5:1 y 10:1 con respecto al plásmido reportero, (5) y (10) respectivamente. En la primer línea se señala el control positivo del ensayo, el cual consiste en partículas virales de la cepa vacunal Candid#1, mientras que la última línea corresponde al control negativo del ensayo, el cual consiste en células 293T transfectadas con pCAGGS-EGFP y 100nM de siRNA. Las flechas rojas señalan a la detección de la nucleoproteína.

Debido a la importancia de la actividad de ARNi en plantas y a que en numerosos reportes de la evaluación de posibles supresores virales se utilizan ensayos en plantas, se procedió a verificar si los resultados de interferencia con el sistema de inhibición de la expresión de genes, se mantenían en un sistema diferente, utilizando como modelo plantas de tabaco, incorporando los genes mediante la infiltración con *Agrobacterium* (figura 8.7). Este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Adrián Valli del Centro Nacional de Biotecnología CSIC, de la Universidad Autónoma de Madrid. En estos ensayos se utilizó como control positivo de la represión del sistema siARN intrínseco de la planta a la proteína P1b del ipomovirus *Cucumber Vein Yellowing virus*, cuya actividad fue descrita previamente (Valli *et al.*, 2007).

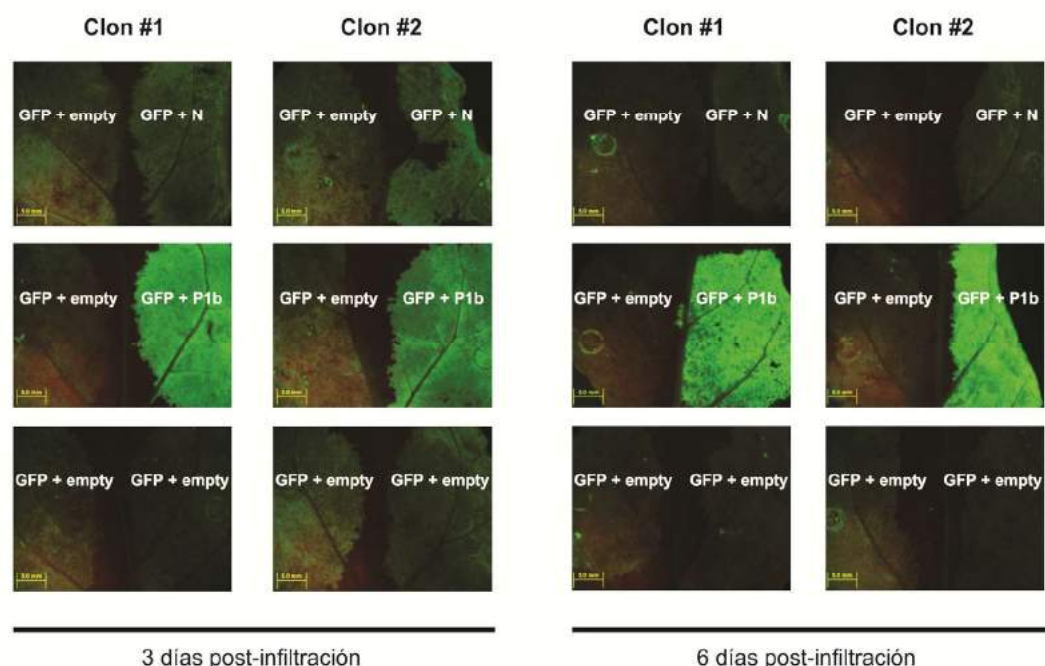


Figura 8.7 Ensayos de evaluación de la actividad supresora de la maquinaria de ARNi en hojas de tabaco. En la figura se muestra la fluorescencia de cada condición ensayada (N, P1g y el Control o *empty*), para dos clones independientes, 3 y 6 días luego de la infiltración.

Como control de los ensayos se utilizó plásmido para la expresión de EGFP junto con el vector vacío en una mitad de la hoja, mientras que en la otra mitad se infiltró el plásmido para EGFP junto con el vector de la proteína N o Z, con el supresor P1b o con el mismo vector que se usó como esqueleto para el clonado de N, Z y P1b. En todas las condiciones se observó la expresión de EGFP a los 3 y 6 días luego de la infiltración.

A partir de lo observado del ensayo en hojas de tabaco, se confirma que la maquinaria de ARNi en plantas es altamente eficiente, disminuyendo ampliamente la expresión de EGFP. Además se observa que N es capaz de revertir ligeramente este silenciamiento, así como se observó en células 293T, pero este efecto es marcadamente menor que el que se observa cuando se utiliza el supresor proteico del ipomovirus de plantas P1b. También es posible decir que el esqueleto utilizado para la expresión de P1b, Z y N no interfiere con la supresión de la expresión de EGFP, lo que indicaría que los efectos observados son exclusivamente producto de los genes expresados. En esta figura no se muestran los resultados obtenidos para la proteína Z, dado que no se observó ningún efecto en la supresión de la expresión de EGFP.

Citotoxicidad de la expresión de la proteína Z

En el ensayo de evaluación de la actividad supresora de la maquinaria de ARNi en células 293T, donde Z no fue capaz de revertir la supresión de la expresión de EGFP, se observó el efecto contrario, produciendo una inhibición casi completa de la fluorescencia. Para analizar en mayor profundidad estos datos se realizó un ensayo de interferencia de la expresión de EGFP mediante la expresión de la proteína Z. En este ensayo se adicionó a la microscopía de fluorescencia una técnica cuantitativa, como lo es la citometría de flujo, para poder obtener datos numéricos de la expresión de EGFP. Esta se aplicó a monocapas de células 293T transfectadas con el vector reportero pCAGGS-EGFP y el vector de expresión para Z (pEZ-N3) en relaciones 1:1, 1:3 y 1:5. Para evitar artefactos producidos por la transfección de distintos valores de masa en cada una de las condiciones, se normalizó la masa total transfectada completando la misma con el vector comercial pBlueScript, en los casos que fueron necesarios (esto se indica en la **figura 8.6** con las barras de color verde a la derecha de la figura)

A partir del análisis por microscopía de fluorescencia se observó una disminución de la expresión de EGFP dependiente de la cantidad de pZ-N3 transfectada (**figura 8.8**). Esto mismo se observó a partir de los resultados obtenidos por citometría de flujo, donde puede detectarse una disminución significativa del número de eventos fluorescentes. En particular, resulta evidente la disminución de eventos de mayor fluorescencia, junto con el consecuente aumento de los eventos de menor fluorescencia.

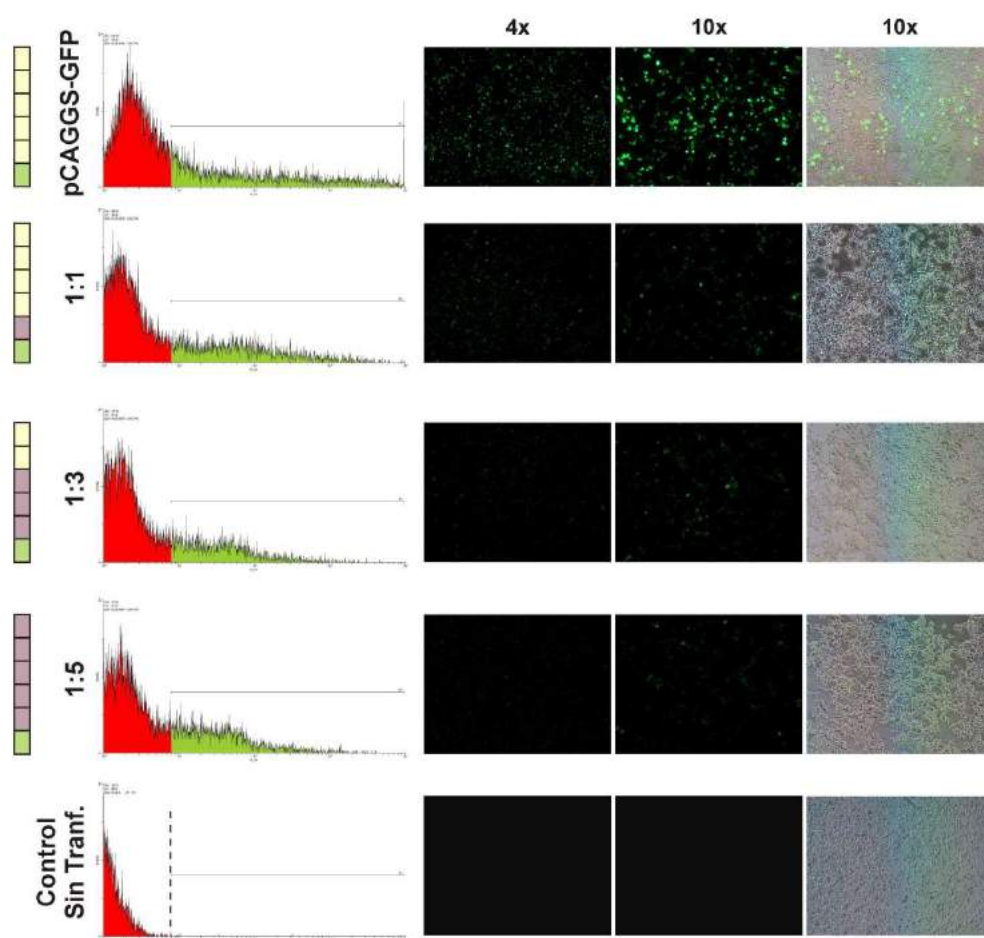


Figura 8.8. Ensayo de interferencia de pZ-N3 en 293T – Citometría de flujo y microscopía d fluorescencia. En el margen izquierdo de la figura se observan los perfiles de citometría de flujo para cada condición, junto con la proporción de plásmidos transfectados (Verde: pCAGGS-EGFP, Violeta: pZ-N3, Amarillo: pBS). La porción del histograma marcada en rojo, indica los eventos contabilizados como negativos, mientras que la porción verde, corresponde a los valores de fluorescencia positivos. Este valor de corte se obtuvo a partir de la muestra control de células sin transfectar. El eje X de los histogramas corresponde al valor de intensidad de absorbancia (FLH-1), mientras que el eje Y corresponde al número de eventos detectados. En la porción derecha de la figura se observan las microscopías de fluorescencia correspondientes a cada condición, en el aumento 4x, 10x y la superposición del campo fluorescente y de luz blanca a un aumento de 10x. El histograma superior (pCAGGS-EGFP) corresponde al control positivo del experimento y el inferior al control negativo de células sin transfectar, mientras que las demás condiciones corresponden a las proporciones de pCAGGS-EGFP:pZ-N3, siendo este último el que varía con respecto a pCAGGS-EGFP.

Si bien el valor promedio de fluorescencia depende del porcentaje de transfección, el mismo se evaluó calculando el porcentaje de células con fluorescencia positiva con respecto al total mediante citometría de flujo. Estos datos fueron comparados con el análisis densitométrico de las imágenes de microscopía (**figura 8.9**), lo que permitió concluir que la disminución de la fluorescencia no se debe a una disminución en el porcentaje de transfección o a la muerte celular, sino a una disminución en la intensidad de expresión de EGFP. Esto mismo puede verse en los histogramas de citometría de flujo, donde se observa un corrimiento de la fluorescencia hacia menores valores de intensidad.

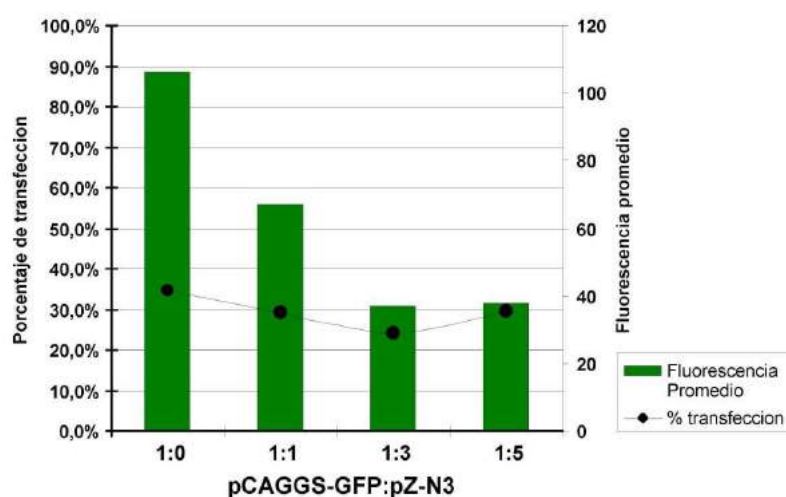


Figura 8.9. Ensayo de interferencia de pZ-N3 en 293T. En el eje Y se muestra la medición del porcentaje de células transfectadas, obtenido a partir de los datos de la citometría de flujo (la línea de puntos continua), y la densitometría de la intensidad de fluorescencia, medida en valores arbitrarios de fluorescencia (representado por las barras de color verde). En el eje X se detallan las proporciones de pCAGGS-EGFP:pZ-N3 ensayadas, donde este último es el que varía su proporción con respecto a pCAGGS-EGFP.

Al realizar un ensayo equivalente en células VERO se observó un efecto similar al observado en 293T, sin embargo la baja eficiencia de transfección y la ausencia de replicación del vector en esta línea celular dificultaron la cuantificación del efecto observado (**figura 8.10**).

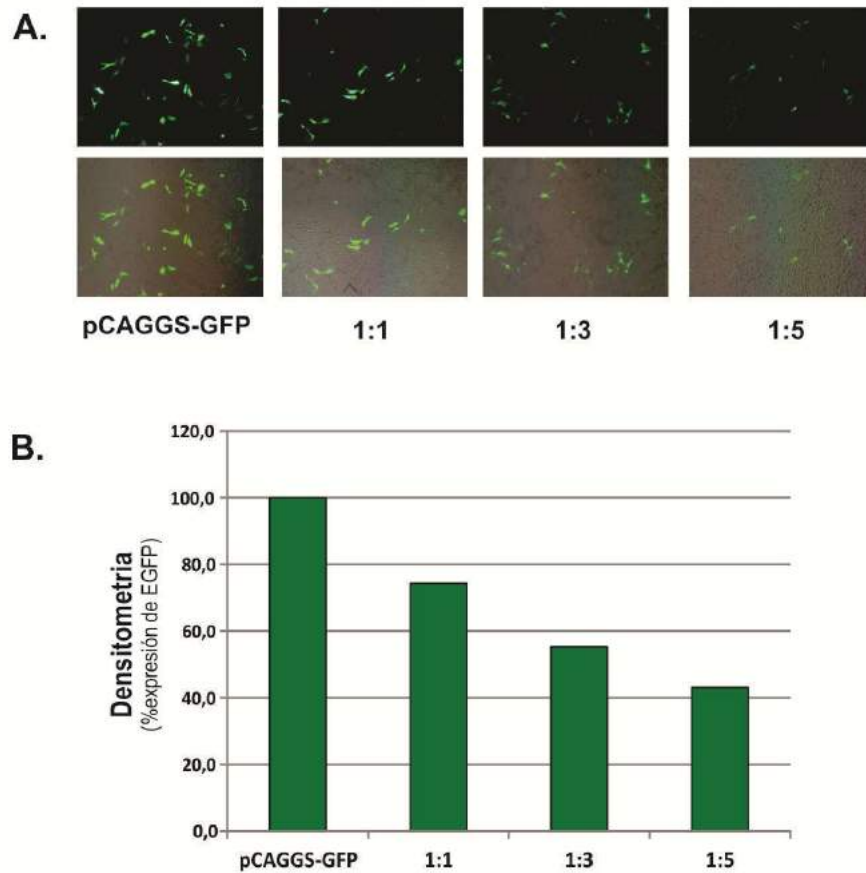


Figura 8.10 Ensayo de interferencia de pZ-N3 en células Vero. A. Microscopía de fluorescencia de células vero transfectadas con pCAGGS-EGFP:pZ-N3 en las proporciones indicadas luego de 48hs de incubación. Aumento 10x. **B.** Densitometría de las imágenes de fluorescencia, donde las unidades arbitrarias de fluorescencia son relativas al control de transfección pCAGGS-EGFP.

DISCUSIÓN

La utilización de un gen reportero como EGFP para la evaluación de los efectos de silenciamiento y/o represión del silenciamiento, ha sido ampliamente utilizada en el estudio de supresores de los mecanismos de ARNi, junto con la proteína luciferasa. En estos estudios generalmente se cuantifica el efecto de cada una de las condiciones por densitometría de imágenes de fluorescencia, actividad luciferasa, citometría de flujo y *Northern Blot*. Si bien esta última técnica no fue utilizada en nuestros estudios, la misma ésta planificada para los futuros ensayos.

La estrategia inicial de utilizar el plásmido pSuperRetro-EGFP y los siARN sintéticos para EGFP, fue diseñada para permitir la identificación del sitio de inhibición de la supresión. Por un lado, para que el vector pSuperRetro-EGFP silenciara la expresión de EGFP era necesaria la acción de DICER en conjunto con la maquinaria de RISC. En cambio, para que los siARNs sintéticos fueran eficientes solo era necesaria la acción de RISC. Por lo mismo, el aspecto diferencial entre ambos hubiera permitido identificar el blanco de acción entre DICER y RISC. En la **figura 8.2** se muestra la optimización de las condiciones del ensayo, donde se observó aproximadamente un 70% de inhibición de la expresión de EGFP para la condición de 100nM siRNA y 55% para 50nM siRNA. En las muestras silenciadas mediante el vector pSuperRetro-EGFP en relación 1:1 y 5:1 con respecto al vector pCAGGS-EGFP, se detectó una disminución de la expresión del gen reportero de un 66% y 84%, respectivamente. Si bien los resultados obtenidos mediante ambas estrategias son significativos, se continuaron los estudios utilizando los siRNA sintéticos, para evitar incluir la variable correspondiente al volumen de reactivo de transfección utilizado, el cual debe ser utilizado en proporción a la masa total de ADN a transfectar. En la condición 5:1 del vector pSuperRetro-EGFP, el cual fue inicialmente transfectado y 24 hs después se transfectó pCAGGS-EGFP (5:1 24 hs) se observó un silenciamiento total. Nuevamente no se seleccionó esta condición para futuros ensayos, de manera de evitar la variable de eventos de transfección independientes.

Si bien en este trabajo no se profundizó en los efectos del silenciamiento mediante vectores pSuperRetro, en el futuro se podrían optimizar las condiciones de transfección para abordar esta estrategia, utilizando líneas estables para la expresión de EGFP.

Los estudios de silenciamiento fueron evaluados a través de microscopía de fluorescencia y densitometrías de las mismas. En la figuras, junto con las imágenes de fluorescencia, se muestra el campo claro correspondiente a cada una de ellas, para evidenciar la integridad de la monocapa y no confundir disminución de la fluorescencia

con una menor confluencia celular. Además, las imágenes mostradas (y utilizadas para la cuantificación por densitometría) fueron las correspondientes a 48 hs post-transfección.

En el ensayo de reversión del silenciamiento para las proteínas Z y N de la **figura 8.4** se logró evidenciar efectos contrarios de cada una sobre la expresión de EGFP. En primer lugar, la proteína N fue capaz de revertir el silenciamiento de EGFP casi totalmente, para la condición de 10:1 de pT-Rex-N respecto de pCAGGS-EGFP, y en menor medida para la condición 5:1. Estos resultados sugieren un efector supresor del silenciamiento a cargo de N, aunque es necesario destacar que el efecto se produce cuando N está presente en una proporción muy grande con respecto al vector reportero. Esto sin embargo podría simular las condiciones de la infección viral, donde N es la proteína viral de mayor expresión y en estadios tempranos del ciclo.

Por otro lado, para evitar la transfección del vector de expresión de N en proporciones mayores al del vector reportero, sería interesante evaluar la utilización de una versión inestable de EGFP (ds-EGFP), la cual permitiría una mayor sensibilidad del sistema (Sullivan & Ganem 2005). En el presente trabajo se utilizó el vector reportero pCAGGS-EGFP el cual posee un promotor muy fuerte, lo que pudo haber provocado una menor sensibilidad del sistema, es decir una minimización de los efectos del silenciamiento y su inhibición. Este hecho fue evidente dado la necesidad de incorporar a la célula 5 o 10 veces mayor cantidad del plásmido silenciador (pSuperRetro-EGFP) con respecto al vector reportero, y en el moderado efecto silenciador de los siARNs. Sin embargo, la variación en la relación de vector reportero:silenciador ha sido utilizada en otros estudios, como en la evaluación de la proteína B2 del virus Nodamura como RSS (*RNAi supresor*), permitiendo observar efectos dosis dependientes en la supresión del gen reportero (Sullivan & Ganem 2005).

Si bien la actividad de supresión del silenciamiento observado para la proteína N requirió de la transfección de una mayor masa del vector con respecto al elemento silenciador, sería interesante evaluar este mismo efecto en otras líneas celulares, pero utilizando cantidades menores del vector para la expresión de N. Se ha descrito previamente que las líneas celulares de mamíferos han sido optimizadas para alcanzar altos niveles de expresión de proteínas recombinantes, lo que en consecuencia produce defectos en la eficiencia de la respuesta de INF y/o ARNi. Esto podría explicar los bajos efectos de silenciamiento y supresión del silenciamiento observados. Albini *et al.* (1995) describieron un subtipo de células dendríticas especializadas en producir IFN- α , las cuales podrían simular más correctamente el entorno de una infección viral, de modo que sería adecuado evaluar a una potencial proteína supresora de la

maquinaria de ARNi (RSS) en este tipo celular. Por otro lado, es de esperar que el efecto de una RSS no sea total, dado que de otra manera sería altamente citotóxico, y esto se resalta aún más en el caso de virus capaces de establecer infecciones persistentes, donde los efectos virales deben ser minimizados para no estimular la muerte celular.

Numerosos RSS fueron identificados inicialmente como antagonistas de interferón, dado la superposición entre la vía de IFN y ARNi. Este podría ser el caso de la Nucleoproteína de los arenavirus (excepto para la especie Tacaribe), la cual ha sido previamente descrita como involucrada en la evasión inmune (a través de su actividad exonucleasa, Qi *et al.*, 2010; Hastie *et al.*, 2010, o de la región 382-386, Martínez-Sobrido *et al.*, 2007, o mediante su interacción con RIG-I y MDA5, Zhou *et al.*, 2010, o por la inhibición de la translocación nuclear de IRF-3, Pythoud *et al.*, 2012; Rodrigo *et al.*, 2012). Nuevamente, una manera de diferenciar estas actividades es la utilización de células primarias (como células dendríticas), las cuales poseen la maquinaria de ARNi intacta.

Muchas veces mutaciones o deleciones en los RSS participan en la atenuación viral, por lo que sería interesante evaluar las mutaciones diferenciales presentes en la región C-terminal de la secuencia de la proteína N de la cepa patógena XJ#44 vs. Candid#1 (Goñi *et al.*, 2010), para evaluar si están implicadas en la modulación de la inhibición de la respuesta de ARNi

En un trabajo reciente se menciona que es posible predecir proteínas RSS basándose en las características de otras proteínas virales previamente descritas como RSS en vertebrados y plantas (Bivalkar-Mehla *et al.*, 2011). En el artículo se destaca la presencia de motivos GW/WG y/o motivos de unión al ARN como elementos capaces de predecir una posible actividad RSS. Como se mencionó previamente, la nucleoproteína de los arenavirus es capaz de unir a ARNdc y ss, sin embargo la presencia de motivos GW / WG no ha sido reportada aún.

Los motivos WG / GW fueron descritos por primera vez en la proteína GW182 humana (Eystathiou *et al.*, 2003), y se caracterizan por unir a las proteínas Argonautas. Como se mencionó previamente durante la replicación viral se producen intermediarios ARNdc, los cuales se procesan en fragmentos de 21-24 nt por acción de la enzima Dicer. Estos siARNs se ensamblan con las proteínas Argonauta (Ago) en RISC para luego permitir la degradación del ARNm blanco. En virus de plantas se ha descrito que los motivos GW/WG en proteínas virales juegan un papel crítico en la desactivación de RISC mediante el secuestro de las proteínas Ago. Un ejemplo de esto es la proteína P1 de *Sweet potato mild mottle virus*, la cual es capaz de interactuar con AGO1 (Giner *et al.*, 2010).

Utilizando un servidor de búsqueda de motivos GW/WG (AGOS: *A composition-based WG/GW Argonaute-binding domains detector*, Karlowski *et al.*, 2010; Zielezinski *et al.*, 2011) sobre la secuencia de la proteína N del virus Junín de la cepa XJ#44 y candid#1, se detectó en ambos casos un motivo GW/WG entre los aminoácidos 305-321 (LCLSGDGWPYIGSR**S**Q**I**) con un *p-value* de 3.96×10^{-1} . Este podría ser un motivo interesante para mutar y evaluar el efecto inhibitorio del silenciamiento. Este mismo análisis se realizó sobre las otras proteínas arenavirales (GPC, L y Z), no encontrándose ningún motivo GW/WG.

Volviendo al ensayo correspondiente a la **figura 8.4**, en particular a los resultados obtenidos para la proteína Z, no se observó una disminución en la inhibición del gen reportero, sino que se observó un efecto contrario, aumentando el efecto silenciador de los siARN y del plásmido silenciador. Este mismo efecto, como se muestra en la **figura 8.8** se observó en ausencia de elementos silenciadores y de manera dosis dependiente de Z. La cuantificación por citometría de flujo de este efecto permitió confirmar que la disminución en la fluorescencia no fue consecuencia de una menor eficiencia de transfección, sino que fue a causa de una menor tasa de expresión de EGFP. Esto se evidencia en los histogramas de la citometría de flujo, en el corrimiento de los eventos con altos valores de fluorescencia hacia valores menores, manteniéndose estable el número de eventos con fluorescencia mayores al umbral control (**figura 8.9**). Este efecto es consistente con la previamente descrita actividad de la proteína Z arenaviral como inhibidor de la traducción dependiente de eIF4E.

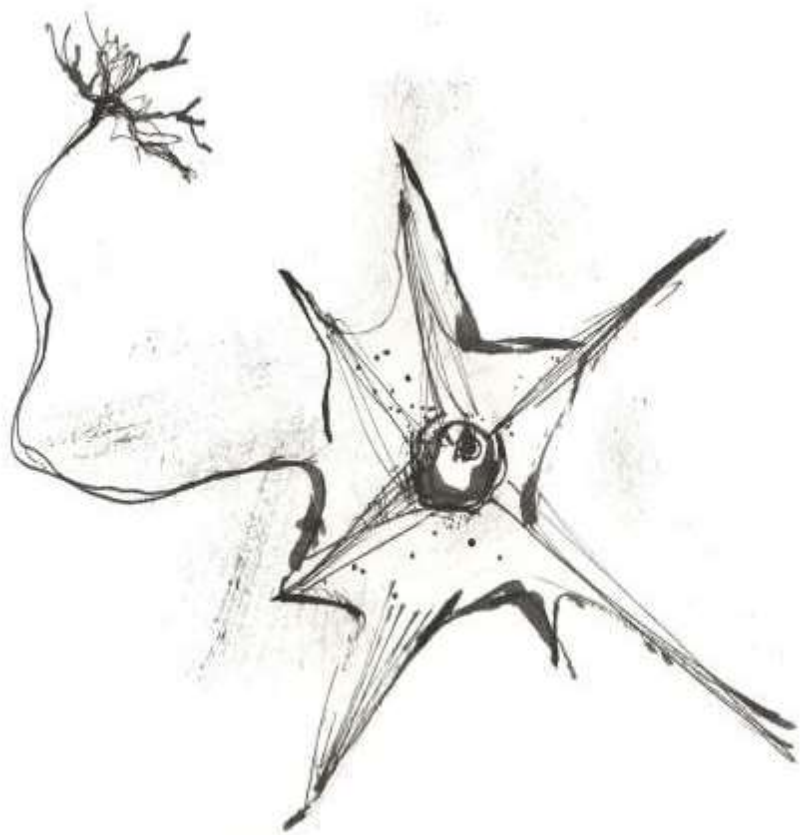
Si bien se observó un efecto sobre la expresión de EGFP en presencia del plásmido pZ-N3, no fue posible detectar por *western blot* a la proteína Z, como así se hizo con N. Sin embargo, los resultados obtenidos en células 293T en conjunto con lo observado en VERO (**figura 8.10**), permitiría hipotetizar que la disminución en la expresión de EGFP se debe a la presencia de la proteína Z, la cual está siendo efectivamente expresada en cantidades no detectables por *western blot* en las condiciones ensayadas. Esta hipótesis concuerda con la actividad inhibidora de la traducción CAP dependiente descrita para Z, haciendo posible la detección de la expresión de la proteína Z del virus Junín mediante su actividad. Esto también es consistente con lo mencionado en el capítulo 6, donde no fue posible la expresión de Z en sistemas bacterianos sin el agregado de secuencias heteróloga.

Un aspecto interesante de los resultados mostrados en este trabajo, fue la evaluación del efecto de las proteínas virales Z y N en el sistema de hojas de planta de Tabaco. Si bien los péptidos evaluados son proteínas de virus que infectan mamíferos, es común que potenciales factores (proteicos y no proteicos) supresores de ARNi sean evaluados en plantas, donde la maquinaria de ARNi es altamente efectiva (Sullivan &

Ganem 2005; Schnettler *et al.*, 2012). En este sistema, el efecto represor del silenciamiento de EGFP por la presencia de N fue menor al observado en 293T, y obviamente también fue menor que al producido por la proteína de acción homóloga al sistema, la proteína P1b del ipomovirus *Cucumber Vein Yellowing virus*. Sin embargo aún es posible optimizar las condiciones del ensayo para evaluar diferentes versiones mutantes de N.

Estos resultados, si bien aún son preliminares, sugieren que la nucleoproteína N estaría involucrada directa o indirecta en la supresión de la respuesta celular vía ARNi, mediante un mecanismo genérico dado que afecta tanto a células de mamífero como vegetales. Sería interesante evaluar si existe interacción entre la proteína N de los arenavirus y algunos de los componentes del complejo DICER, RISC o de las proteínas sensoras de la infección viral como son MDA-5, RIG-I, entre otras.

Por otro lado, es posible observar que la proteína Z del virus Junín no estaría implicada en mecanismos de supresión de la maquinaria de RNAi, por el contrario, la proteína Z parece poseer una función antagonista de la expresión proteica, probablemente asociada al cambio de estructura en eIF4E mediado por su interacción con Z.



LA PROTEÍNA Z COMO FUERZA
IMPULSORA DE LA BROTAÇÃO VIRAL
CAPÍTULO 9

INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos más interesantes del ciclo de vida viral es la forma en que los virus envueltos adquieren sus membranas. El ensamblaje de las proteínas virales y la consecuente formación de la partícula viral madura requieren de la deformación de la membrana de la célula huésped para luego culminar en un proceso de separación de la partícula viral naciente de la membrana celular. Este mecanismo viral simula algunos procesos celulares, como son la citoquinesis, la formación de vesículas intraluminales u obtenidas a partir de los compartimentos membranosos, como el Golgi o el retículo endoplasmático (McDonald & Martín-Serrano 2009). Estos procesos comparten gran parte de la maquinaria celular (por ejemplo, los complejos ESCRT), y es de esperar que la infección viral utilice y secuestre a la misma, para producir un fenómeno equivalente durante la brotación viral. En los arenavirus esta función es llevada a cabo por la proteína de matriz Z, la cual como se describió en el capítulo 3, es capaz de interactuar con algunos factores de los complejos ESCRT, y de esta manera dirige la brotación viral.

El objetivo de este capítulo es estudiar a la proteína Z del virus Junín como la fuerza impulsora de la brotación viral, a partir del estudio de su actividad aislada de la infección viral. También se incluirá en este estudio una versión recombinante de la proteína Z, fusionada a EGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*), para estudiar la localización intracelular. Por último, se analizará la expresión de la proteína Z y su versión recombinante en un sistema de expresión de células de insecto, mediante la utilización de baculovirus recombinantes.

RESULTADOS

EXPRESIÓN DE Z-EGFP BAJO EL CONTROL DE PROMOTORES DE VIRUS DE MAMÍFEROS

Con el objetivo de analizar la expresión de la proteína Z de la cepa Candid#1 del virus Junín en células de mamífero, se realizó el clonado del ORF que codifica la proteína Z en un vector de expresión para dicho sistema, tal como se esquematiza en la **figura 9.1**. El vector utilizado (pEGFP-N3 Clontech, Genbank #U57609) posee un origen de replicación del virus SV40, que permite la replicación del plásmido en presencia de la proteína denominada “antígeno T” de origen viral. En este estudio se utilizará la línea celular 293T, que como se mencionó previamente, expresa constitutivamente el antígeno T. Por otro lado, este vector presenta el promotor CMV-IE, que genera altos niveles de transcritos del inserto clonado en células de mamífero.

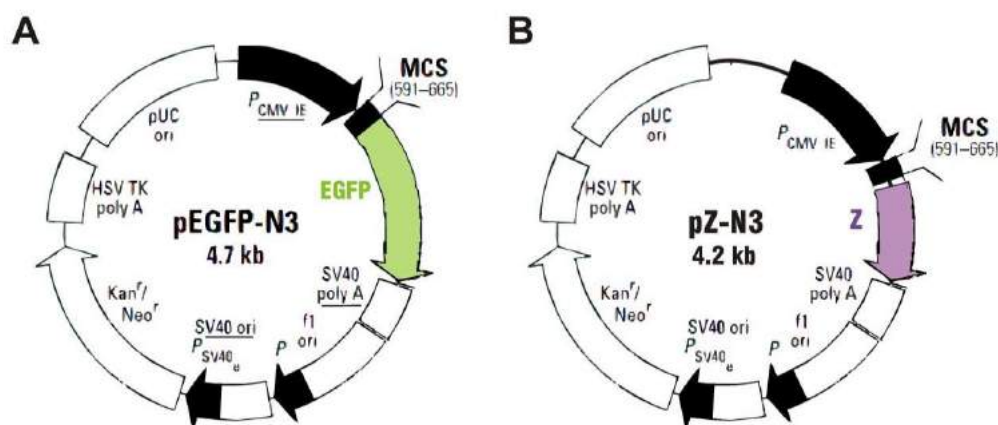


Figura 9.1. A. Esquema del vector comercial pEGFP-N3 (Clontech). El mismo posee el ORF de EGFP regulado por el promotor de CMV, el origen de replicación de SV40, una secuencia de poliadenilación de SV40 y un gen de resistencia a kanamicina. **B.** Esquema del vector pZ-N3 el cual deriva del pEGFP-N3, pero con el ORF de EGFP intercambiado por el de la proteína Z.

Utilizando el vector pZ-N3 se transfectaron células 293T utilizando el protocolo especificado en la sección de materiales y métodos. Las mismas fueron analizadas mediante *Western blot*, utilizando el suero α -Z, 24 hs y 48 hs post-transfección. No se

logró detectar la proteína Z tanto en la fracción celular como en el sobrenadante de cultivo. (Datos no mostrados). Teniendo en cuenta la sensibilidad de la inmunodetección, es posible pensar en una baja o nula expresión de la proteína. Sin embargo, debido a las funciones citotóxicas de Z dentro de la célula, no se descarta que una mínima expresión de Z (no detectable mediante *western blot*) sea suficiente para arrestar el metabolismo celular, incluyendo el proceso de traducción (ver capítulo 8, Citotoxicidad de la expresión de la proteína Z).

Expresión de Z-EGFP (CMV) en 293T por transfección

Para obtener un vector que permita la fácil detección de Z sin alterar sus funciones, se construyó una versión recombinante de Z (figura 9.2 A). En nuestro laboratorio se habían realizado experimentos de producción de Z en bacterias, y análogamente, resultó muy difícil detectar la expresión de la proteína sin modificaciones. En este caso, la adición de secuencias heterólogas en los extremos permitió la expresión de Z. Por ello, se probó si la misma estrategia podía mejorar los resultados de expresión de Z en células de mamífero. La secuencia heteróloga, que corresponde al gen de la proteína EGFP se adicionó en el extremo C-terminal de Z, de manera de permitir el proceso de miristoilación en el extremo N-terminal. Como control de los experimentos se utilizó el vector comercial pEGFP-N3, el cual expresa la proteína EGFP (figura 9.2 B)

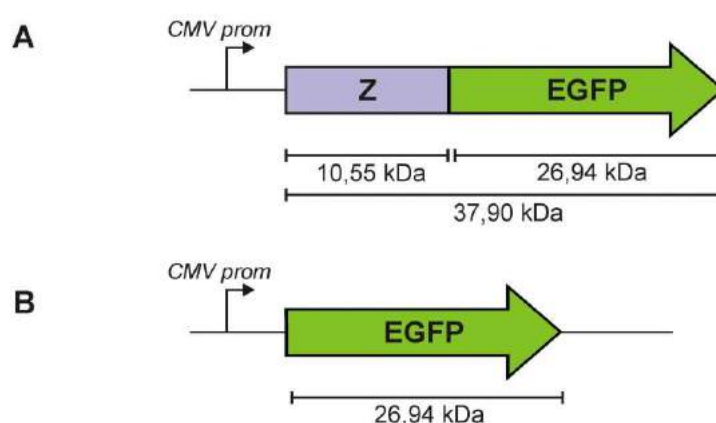


Figura 9.2. A. Utilizando como base el vector pEGFP-N3, se realizó la construcción pZ-EGFP, donde se introdujo el ORF que codifica para la proteína Z del virus Junín entre la secuencia del promotor de CMV y EGFP. **B.** El plásmido comercial pEGFP-N3 que expresa EGFP se utilizó para los controles de los ensayos.

Se transfectaron células 293T con el vector pZ-EGFP, y luego de 48 hs se detectó por microscopía de fluorescencia la expresión de Z-EGFP. Como puede verse en la **figura 9.3 A** se obtuvo alta intensidad y gran porcentaje de transfección. La identidad de Z-EGFP fue confirmada mediante inmuno detección de Z a partir de la fracción celular y por estimación de su peso molecular (**figura 9.3 B**). Estos mismos resultados fueron observados también en células BHK, aunque con menor eficiencia de transfección e intensidad de fluorescencia (datos no mostrados).

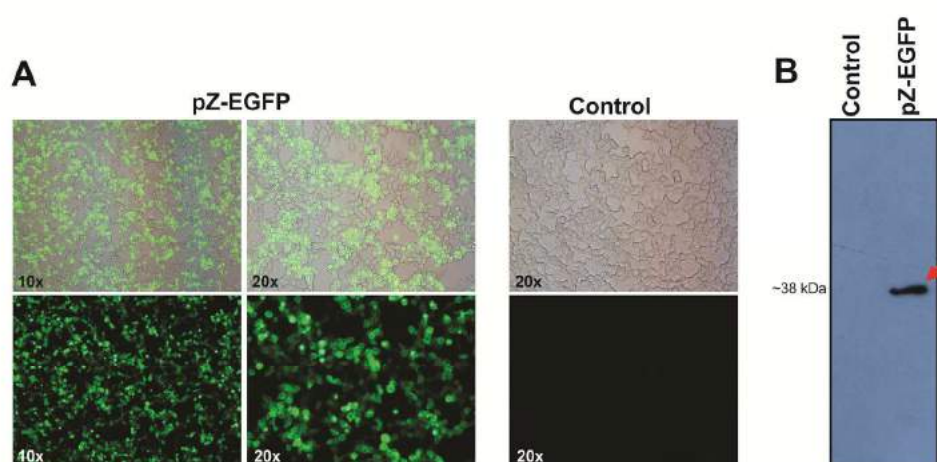


Figura 9.3. Expresión de Z-EGFP. **A.** Microscopía de fluorescencia 48 hs post transfección con pZ-EGFP (aumentos 40x y 20x). El control corresponde a células 293T sin transfectar. **B.** Western blot de la fracción celular de células transfectadas con pZ-EGFP y sin transfectar (control) detectado con el anticuerpo α -Z.

Para estudiar la localización de Z en la célula con más detalle, se transfectaron células 293T con pZ-EGFP y luego se analizó la distribución de la fluorescencia mediante microscopía confocal. Como puede visualizarse en la **figura 9.4**, se encontraron importantes diferencias entre las células expresando Z-EGFP con respecto al control negativo (células transfectadas con pEGFP-N3). Lo primero que se puede observar es que la distribución de fluorescencia entre las dos condiciones es similar. En general se distribuye alrededor de la membrana plasmática, retículo endoplasmático y en menor medida por el citoplasma. Sin embargo, en las células que expresan la versión recombinante de Z se pueden ver gránulos de Z-EGFP en el citoplasma (resaltado con flechas rojas en la **figura 9.4**) que no están presentes en el control. Esto mismo se puede apreciar en detalle en los cortes ópticos de cada

muestra (anexo, figuras xiii y xiv), donde se observa que el patrón punteado se mantiene a lo largo del eje Z.

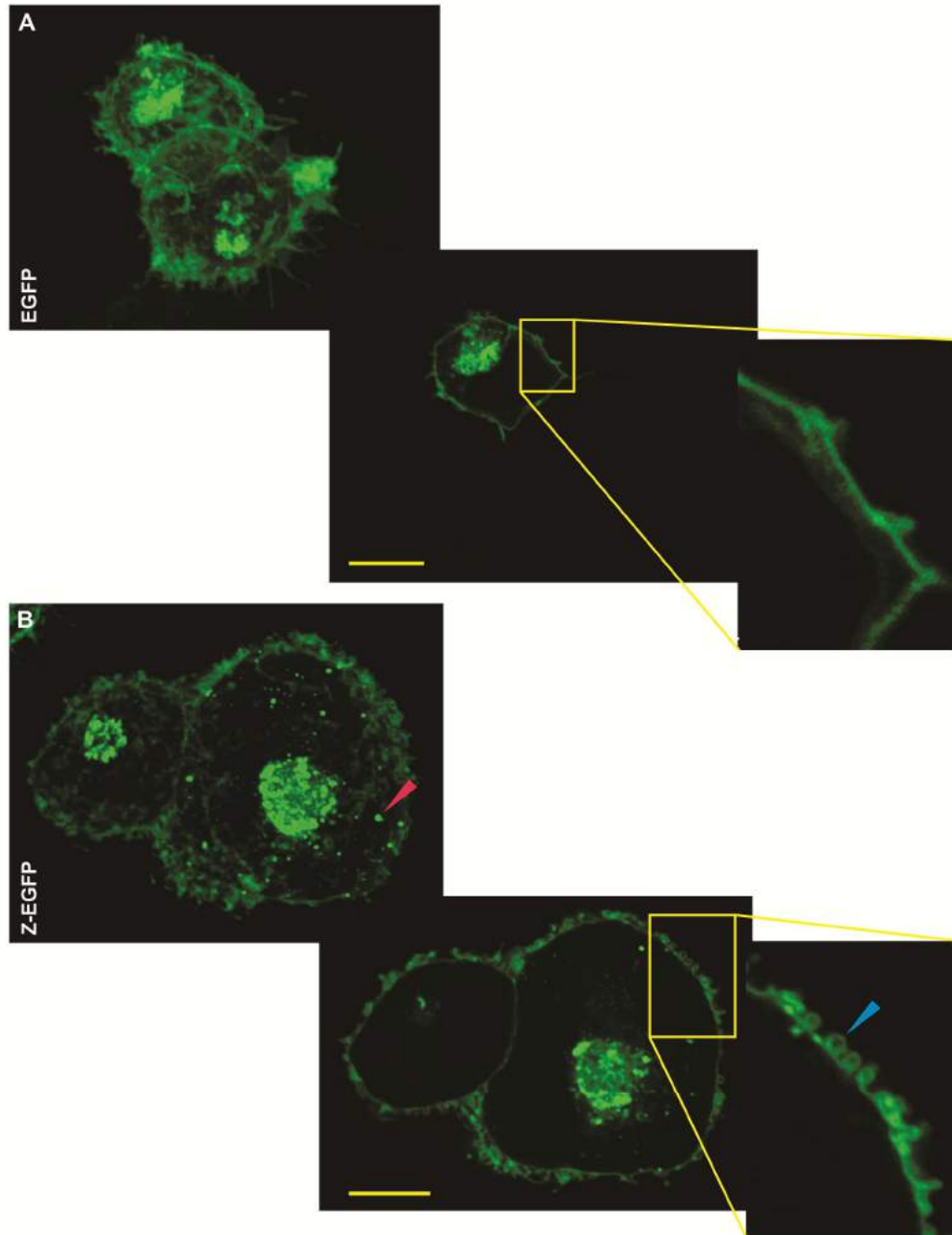


Figura 9.4. Microscopía confocal de células 293T. A. Serie Z de células 293T control transfectadas con pEGFP-N3, seguida por una sección óptica y zoom digital de la región delimitada por el rectángulo amarillo. **B.** Serie Z de células 293T transfectadas con pZ-EGFP, seguida por una sección óptica y el zoom digital. Las flechas rojas indican los sitios de acumulación de Z-EGFP en el citoplasma y con flecha azul se indica las estructuras vesiculares

formadas en la membrana plasmática. En cada figura la barra de tamaño representa 10 μm . (Ver ampliación de las secciones ópticas en el anexo II)

Por otro lado, el rearmado de las imágenes en tres dimensiones (**figura 9.4**, cuadros A y B) evidencia una interesante diferencia respecto de filipodios y extensiones de la membrana plasmáticas presentes en el control negativo y no en las células expresando Z-EGFP. En su lugar se pueden ver estructuras “esféricas” sobre la membrana. Al realizar la ampliación de una sección de la figura, se evidencia claramente la abundante formación de estructuras vesiculares en la membrana de las células transfectadas con pZ-EGFP, que no están presentes en las células control, donde se observan membranas plasmáticas “lisas”.

Búsqueda de vesículas extracelulares conteniendo Z-EGFP

La forma semiesférica de las evaginaciones, detectadas por microscopía confocal sólo en presencia de Z-eGFP, sugiere la presencia de un proceso de brotación de vesículas debido a las propiedades de la proteína Z. Por ello, se analizó la posibilidad de que se estuvieran produciendo vesículas que contengan Z-eGFP anclada en su membrana.

Detección de Z-EGFP en el sobrenadante del cultivo

Inicialmente, a partir de células 293T transfectadas con pZ-EGFP se analizó la presencia de Z-EGFP asociada en estructuras macromoleculares en el sobrenadante de cultivo. Para esto se colectó el sobrenadante de cultivo a las 48 hs post-transfección, se clarificó y ultracentrifugó en colchón de sacarosa. Las muestras obtenidas, y el control de células sin transfectar, fueron analizadas mediante *western blot*, utilizando anticuerpos contra Z. La detección de una única banda de aproximadamente 37 kDa en el *western blot* (**figura 9.5 A**) evidencia la presencia de Z-EGFP en partículas capaces de precipitar por ultracentrifugación obtenidas a partir del sobrenadante de cultivo.

Ensayo de protección a Proteinasa K

Si bien la técnica de ultracentrifugación permite sedimentar partículas, como vesículas o virus, también suelen precipitar agregados proteicos de gran volumen. Por este motivo, fue necesario analizar si la señal observada en el sobrenadante era

consecuencia de la sedimentación de un agregado proteico que incluya Z-EGFP o de partículas conteniendo la misma. Para esto se realizó un ensayo de protección a proteinasa K (**Figura 9.5 B**). Las muestras obtenidas de la ultracentrifugación fueron tratadas con proteinasa K en presencia y ausencia de Tritón X-100, el cual permeabiliza membranas lipídicas. En consecuencia, las proteínas aisladas serán sustrato de la proteasa, mientras que aquellos péptidos contenidos dentro de membranas lipídicas serán protegidos de la misma. Por otro lado, en presencia de detergentes, los péptidos contenidos en estructuras membranosas estarán expuestos a la degradación por la proteinasa K.

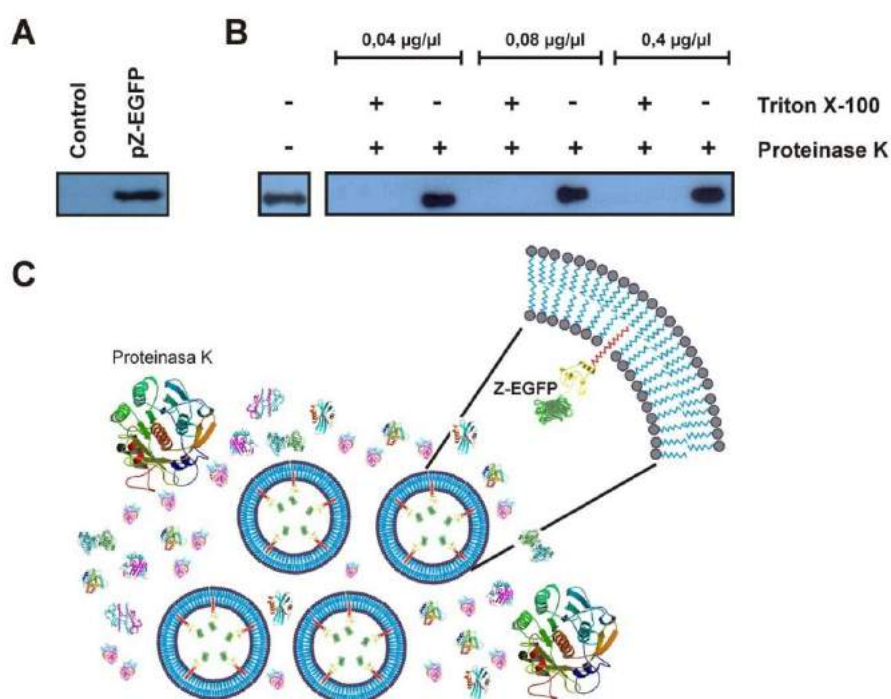


Figura 9.5. Purificación de VLPs. **A.** *Western blot* del pellet obtenido a partir de la ultracentrifugación del sobrenadante de cultivo de células transfectadas con pZ-EGFP. El control corresponde al pellet obtenido a partir del sobrenadante de células 293T sin transfectar. **B.** Ensayo de protección a proteinasa K del pellet obtenido de la ultracentrifugación del sobrenadante de cultivo de células transfectadas con pZ-EGFP. El esquema indica si la muestra se encuentra en presencia o ausencia de proteinasa K o Tritón X-100 utilizando los símbolos + y -. Además se indica la concentración de proteasa utilizada en cada caso. **C.** Esquema del modelo propuesto para la localización de Z en el interior de las VLPs.

En la **figura 9.5 B** se observa que el tratamiento con proteinasa K en distintas concentraciones no tuvo efecto sobre la proteína Z-EGFP, mientras que en presencia

de Tritón-X100 la misma no se detecta. Estos resultados son compatibles con la presencia, en el sobrenadante de cultivo, de partículas tipo virales que contienen Z-EGFP en su membrana lipídica y que esta se encuentra orientada hacia el interior de las mismas, preservada de la degradación por proteasas tal como se esquematiza en la **Figura 9.5 C**.

Determinación de la presencia de vesículas fluorescentes en el sobrenadante de cultivo mediante citometría de flujo

Por otro lado, se demostró la presencia de Z-EGFP en las VLPs purificadas mediante citometría de flujo de la muestra obtenida luego de la ultracentrifugación del sobrenadante de cultivo (**figura 9.6**). En la muestra de células transfectadas con pZ-EGFP se observa un corrimiento de la nube de puntos hacia la región de partículas de mayor tamaño (FSC-H) y mayor complejidad (SSCH), 6999/50000 (**figura 9.6 A**), comparado con los valores determinados para el control, 571/50000 (**figura 9.6 B**). Además en las células que expresan Z-EGFP se evidencia un mayor número de eventos detectados con fluorescencia positiva respecto a la muestra control (**figura 9.6 C**).

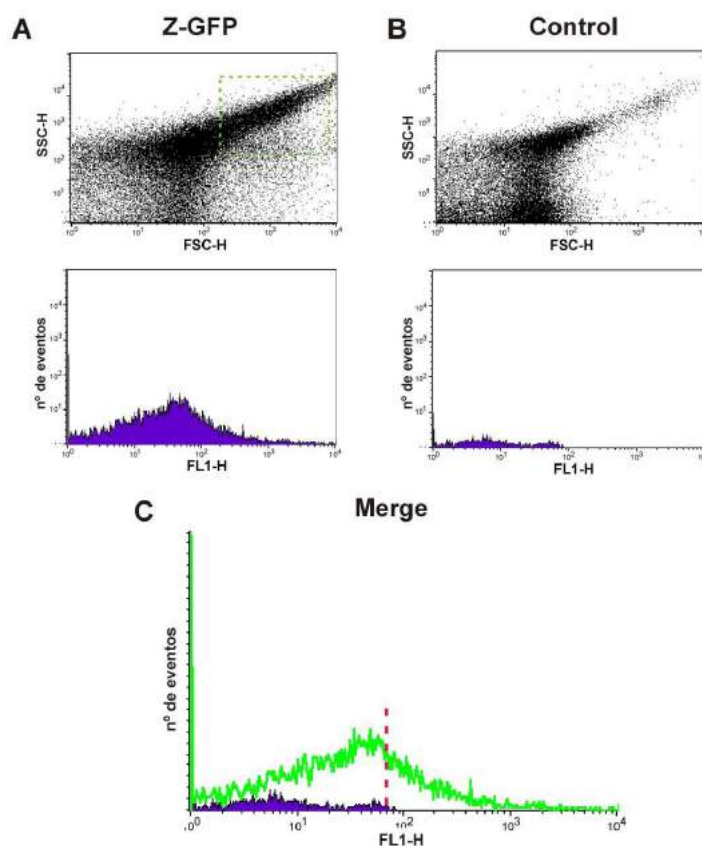


Figura 9.6. Citometría de Flujo del sobrenadante de cultivo de células 293T. **A.** Células transfectadas con pZ-EGFP y **B.** Células control. (Gráfico superior: Parámetro Y: SSCH (log) , parámetro X: FSCH (log). Gráfico inferior, parámetro Y: número de eventos, parámetro X: fluorescencia en FL1-H, 530 ± 15 nm. **C.** Superposición de los perfiles de fluorescencia. La línea roja indica el valor de fluorescencia basal de las células control. Los valores de fluorescencia superiores son anotados como positivos.

Detección de vesículas en el sobrenadante del cultivo por microscopía electrónica de transmisión

Con el objetivo de caracterizar la estructura de las partículas tipo virales que contiene Z-EGFP, la muestra obtenida de la ultracentrifugación del sobrenadante de células transfectadas con pZ-EGFP fue analizada mediante microscopía electrónica de transmisión acoplada a la inmuno detección de Z con partículas de oro coloidal. En la **figura 9.7** es posible observar la presencia de estructuras irregulares electrodensas, de entre 40 y 150 nm de diámetro, donde fue posible detectar a la proteína Z-EGFP mayoritariamente en asociación a las partículas. Las partículas mencionadas no fueron observadas en la muestra control, de células sin transfectar o transfectadas con pEGFP-N3 (Datos no mostrados).

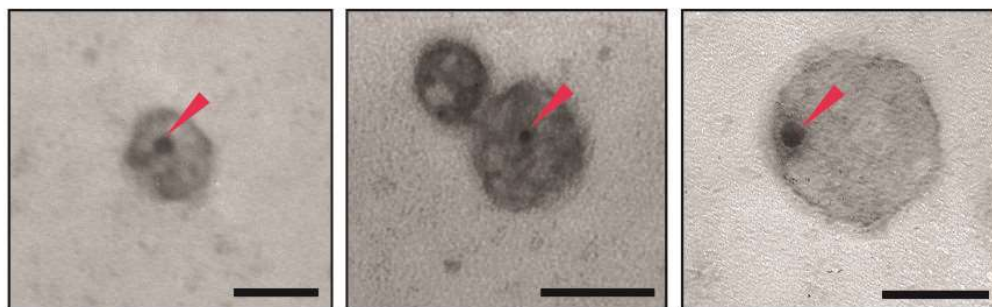


Figura 9.7. Microscopía electrónica de transmisión con *immunogold* (α -Z) del pellet obtenido luego de la ultracentrifugación del sobrenadante de células 293T transfectadas con pZ-EGFP. La barra de tamaño indica 50nm en todos los casos. Las flechas rojas indican la marca de oro coloidal.

Caracterización proteica de las VLPs

Teniendo en cuenta que aún no se encuentra completamente descripto cual es el contenido proteico dentro de las partículas virales, y por otro lado, sabiendo que Z

posee la capacidad de unir directa e indirectamente a factores celulares, se analizó la presencia de proteínas en las VLPs purificadas.

Para ello, se realizó un SDS-PAGE de la muestra obtenida a partir de la ultracentrifugación del sobrenadante de cultivo, previa y posterior al tratamiento con proteinasa K. En la **figura 9.8** se observa la presencia de un patrón de proteínas para las dos muestras (con y sin tratamiento con proteinasa K). Sin embargo, luego del tratamiento con proteinasa K, se puede ver la eliminación de algunas de las proteínas como por ejemplo la correspondiente a la banda mayoritaria de aproximadamente 70 kDa (de acuerdo al peso molecular y a la cantidad, posiblemente corresponda a BSA, presente en medio de cultivo). Por otro lado, una gran cantidad de proteínas, junto con Z-EGFP, parecen haber sido protegidas del tratamiento con proteinasa K, por lo que se puede suponer que la mayoría han sido incluidas en el interior de la VLPs.

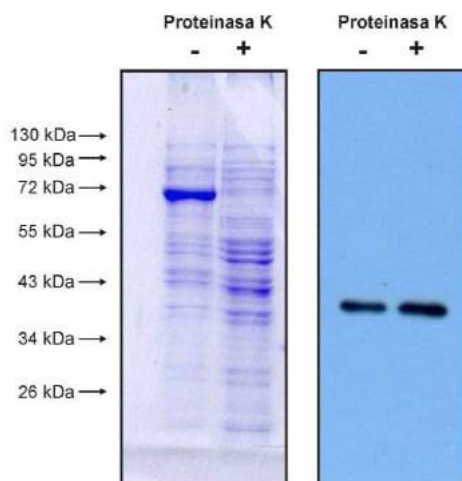


Figura 9.8. Análisis proteico de las VLPs de Z-EGFP. SDS-PAGE con tinción de *Coomassie blue* y *western blot* (α -Z) de la muestra obtenida luego de la ultracentrifugación del sobrenadante de células 293T transfectadas con pZ-EGFP, tratada con proteinasa K (+) y sin tratar (-).

Control de VLPS con pEGFP-N3

La actividad celular basal es capaz de secretar vesículas al exterior celular. Estas pequeñas vesículas envueltas de membrana lipídica, llamadas exosomas., son secretadas al medio extracelular por la mayoría de los tipos celulares e interviene en la comunicación intercelular (Ludwig & Giebel, 2012). Estas se forman por gemación de la membrana de endosomas tardíos, los cuales son liberados al lumen del endosoma.

Cuando este último se fusiona con la membrana plasmática libera su contenido al medio extracelular, incluyendo los exosomas lumbinales.

Teniendo en cuenta la actividad de secreción de exosomas, fue necesario comprobar que las VLPs detectadas fueran realmente producto de la expresión de Z-EGFP, y no exosomas que contuvieran aleatoriamente a la proteína heteróloga. Para esto se transfectaron células 293T con el plásmido control pEGFP-N3, el cual expresa la proteína EGFP (25 kDa) y se analizó la presencia de la misma en el sobrenadante de cultivo. La muestra se sometió al mismo tratamiento utilizado para la purificación de las VLPS de Z-EGFP, incluyendo el tratamiento con proteinasa K. Los resultados fueron analizados mediante SDS-PAGE e inmunodetección con el suero policlonal α -GFP.

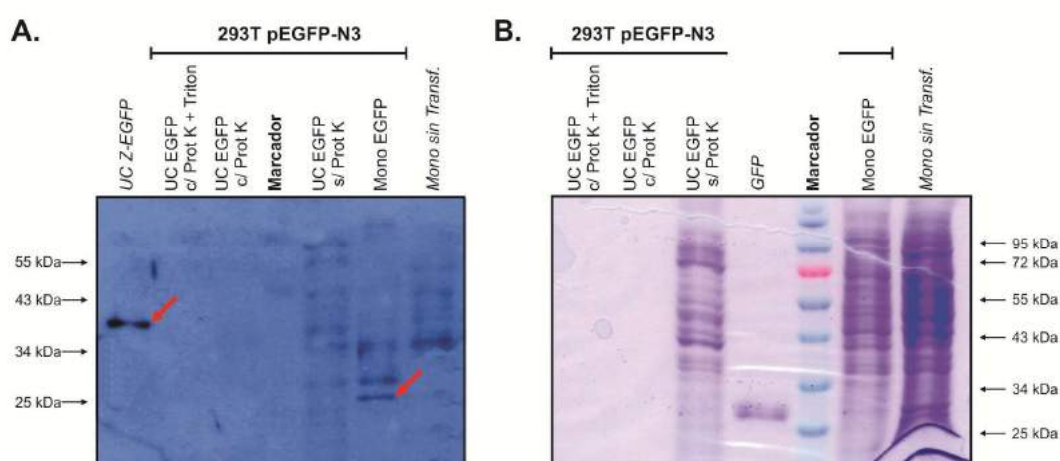


Figura 9.9. A. Western blot de la fracción celular y extracelular de células 293T transfectadas con el plásmido control pEGFP-N3. La primera línea corresponde al control positivo de la técnica, la ultracentrifugación (**UC Z-EGFP**) del sobrenadante de cultivo de células transfectadas con pZ-EGFP. A continuación la UC de células transfectadas con pEGFP-N3 tratadas con proteinasa K + Tritón X-100 (**UC EGFP c/ Prot K + Tritón**), solo con Proteinasa K (**UC EGFP c/ Prot K**), un marcador de peso molecular, y luego la misma muestra sin tratar (**UC EGFP s/ Prot K**). Las dos últimas líneas de este panel corresponden a las fracciones celulares transfectadas con pEGFP-N3 (**Mono EGFP**) y sin transfectar (**Mono sin Transf.**). **B.** Detección mediante SDS-PAGE con tinción de *coomassie blue* de las siguientes muestras: UC de células transfectadas con pEGFP-N3 tratadas con proteinasa K + Tritón X-100 (**UC EGFP c/ Prot K + Tritón**), solo con Proteinasa K (**UC EGFP c/ Prot K**) y sin tratar (**UC EGFP s/ Prot K**). Luego el control positivo de GFP purificada (**GFP**), el marcador de peso molecular, y la fracción de células transfectadas con pEGFP-N3 (**Mono EGFP**) y sin transfectar (**Mono sin Transf.**).

En la **figura 9.9** se observa la ausencia de señal para GFP en las muestras obtenidas de la ultracentrifugación (UC) del sobrenadante e cultivo tratadas con proteinasa K. Si bien se observan señales inespecíficas en la muestra de UC sin tratamiento con la proteasas, las mismas desaparecen luego de la incubación con proteinasa K. Lo mismo se observa en el análisis por SDS-PAGE, donde la muestra sin tratamiento contiene un alto contenido proteico, el cual desaparece luego de la exposición a la proteasa. Este resultado indica la presencia de agregados proteicos no protegidos por una envoltura lipídica, los cuales precipitan durante el proceso de ultracentrifugación. Por lo tanto, si bien fue posible detectar la presencia de EGFP en la fracción celular de células transfectadas con pEGFP-N3, no hubo evidencia de la presencia de EGFP dentro de partículas lipídicas.

EXPRESIÓN DE Z-EGFP BAJO EL CONTROL DE PROMOTORES BACULOVIRALES

Teniendo en cuenta que uno de los principales objetivos de esta tesis es la utilización de las VLPs para el desarrollo de un sistema de vehiculización y presentación de antígenos específicos, en este apartado del capítulo se describe el estudio de sistemas celulares de insectos para la producción de las mismas.

Las razones principales por la que se escogió este sistema celular de producción fueron la disminución de los costos productivos, el precedente de la aprobación de este sistema en la formulación de vacunas para humanos, y la experiencia previa en la manipulación de sistemas similares.

A partir de la construcción pZ-EGFP, que contiene el promotor de CMV, se realizó la construcción del plásmido ple1-Z-EGFP, el cual posee el promotor del gen baculoviral temprano *ie1* de AgMNV (*Anticarsia gemmatilis multiple nuclear virus*) en tándem con el promotor CMV (**figura 9.10**). El promotor *ie1* es el encargado de la regulación del gen *Immediate early 1* (*ie1*) presente en el genoma baculoviral. Es una secuencia reconocida por la maquinaria celular sin la necesidad de otros factores virales y genera la producción de transcritos a tiempos muy tempranos (2 hs post-infección) (Bilen *et al.*, 2007). El objetivo de utilizar este vector es evaluar la expresión de la proteína Z-EGFP y la producción de VLPs en células de insecto. En este estudio se analizarán las líneas de insecto Sf9 y UFL-Ag 286.

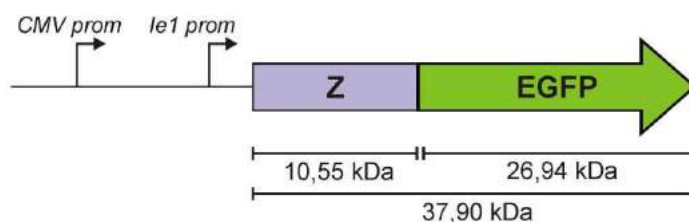


Figura 9.10. Construcción de ple1Z-EGFP. En base al vector pZ-EGFP se realizó la construcción ple1Z-EGFP, donde se introdujo la secuencia del promotor del gen baculoviral *le1* entre la secuencia del promotor de CMV y Z.

Expresión de Z-EGFP (*le1*) en 293T por transfección

La posibilidad de utilizar una única construcción plasmídica para varios sistemas de expresión brinda numerosas ventajas, por lo que se decidió ensayar su actividad en células 293T. En este caso el plásmido utilizado posee los promotores CMV e *le1* en tándem, regulando la expresión de Z-EGFP, lo que permitirá ensayar la hipótesis de sinergismo entre ambos promotores. Para esto se transfectaron células 293T con el vector ple1Z-EGFP, y luego de 48 hs se analizó la fluorescencia en las mismas (figura 9.11). Si bien se logró observar Z-EGFP en ambas condiciones, la construcción regulada por CMV resultó en una mayor intensidad de fluorescencia.

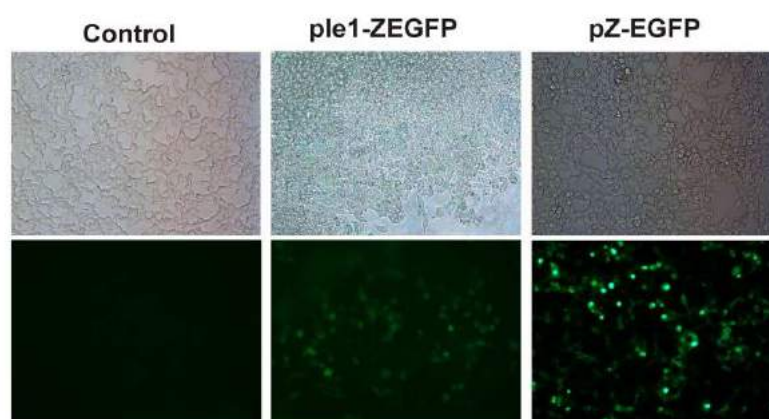


Figura 9.11. Microscopía de fluorescencia de células 293T. El control corresponde a células sin transfectar mientras que la siguiente columna corresponde a la transfección del vector que expresa Z-EGFP bajo la regulación del promotor *le1*. La última columna corresponde al control de células transfectadas con la construcción pZ-EGFP. En los tres casos se muestra el campo claro y el de fluorescencia en un aumento 20x.

Expresión de Z-EGFP (Ie1) en Sf9 por transfección

Se transfectaron células sf9 con el plásmido ple1Z-EGFP, y luego de 48 hs se analizaron las imágenes de las mismas. Como se muestra en la **figura 9.12** la eficiencia de transfección observada en todos los casos fue muy baja en comparación a la transfección en células 293T. La baja expresión de la proteína en el sistema celular evaluado mediante esta técnica, no permitió estudiar la actividad ni la localización celular de Z-EGFP.

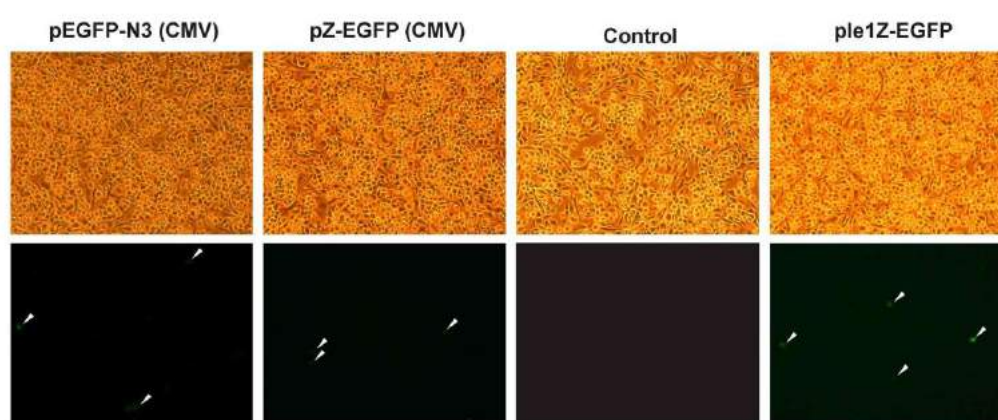


Figura 9.12. Microscopía de fluorescencia de células Sf9. Células transfectadas con la construcción pEGFP-N3 y pZ-EGFP, ambas bajo la regulación del promotor CMV. El control corresponde a células sin transfectar mientras que la siguiente columna corresponde a la transfección del vector que expresa Z-EGFP bajo la regulación del promotor Ie1 (ple1-Z-EGFP). En todos los casos se muestra el campo claro y el de fluorescencia en un aumento 20x. En este último se señalan con flechas blancas las células fluorescentes.

Producción de baculovirus recombinantes Ac-Z-EGFP

Los baculovirus recombinantes se han convertido en un excelente sistema de expresión de genes heterólogos ampliamente utilizado, con la posibilidad de usar células de insecto cultivadas y larvas de insectos como bioreactores. Los genes heterólogos colocados bajo el control transcripcional del promotor fuerte del gen de la poliedrina del nucleopoliedrovirus *Autographa californica* (AcMNPV) son abundantemente expresados durante las etapas tardías de la infección viral. El sistema comercial *Bac-to-Bac* utiliza una versión modificada del genoma a ADN circular de cadena doble de AcMNPV denominada bácmido, el cual permite la recombinación sitio específica del gen de interés y puede ser replicado en bacterias.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante transfección transitoria en células de insectos y con el objetivo de generar un sistema de transferencia genética más eficiente se planteó la construcción de baculovirus recombinantes que puedan llevar el gen *z-egfp*.

En nuestro estudio se introdujo el ORF *z-egfp* junto con el promotor *le1* dentro del bácmido de AcMNPV utilizando el sistema *Bac-to-Bac*. A partir del sobrenadante de cultivo de células Sf9 previamente transfectadas con el bácmido, se obtuvo una progenie viral del fenotipo brotante conteniendo en su genoma el gen *z-egfp* bajo la regulación del promotor temprano *le1* (Ac-Z-EGFP). Estos viriones se utilizaron para infectar células Sf9 y estudiar la expresión de Z-EGFP.

Expresión de Z-EGFP (*le1*) en Sf9 por infección

Cinética de expresión de Z-EGFP en Sf9 infectadas

Con el objetivo de evaluar la expresión de Z-EGFP en células Sf9 mediante la infección con Ac-ZEGFP, se ensayó la cinética de expresión. La misma se realizó a una multiplicidad de infección (MOI) de 1, con un tiempo de adsorción de 1 hora. Luego se removió el sobrenadante y la monocapa fue lavada con PBS tres veces. La misma fue monitoreada por microscopía de fluorescencia, colectando el sobrenadante a cada tiempo ensayado. En la **figura 9.13** se puede observar que a las 8 hs post infección todas las células están infectadas, con bajos niveles de expresión. Luego de 48 hs el nivel de expresión aumenta llegando a su máximo.

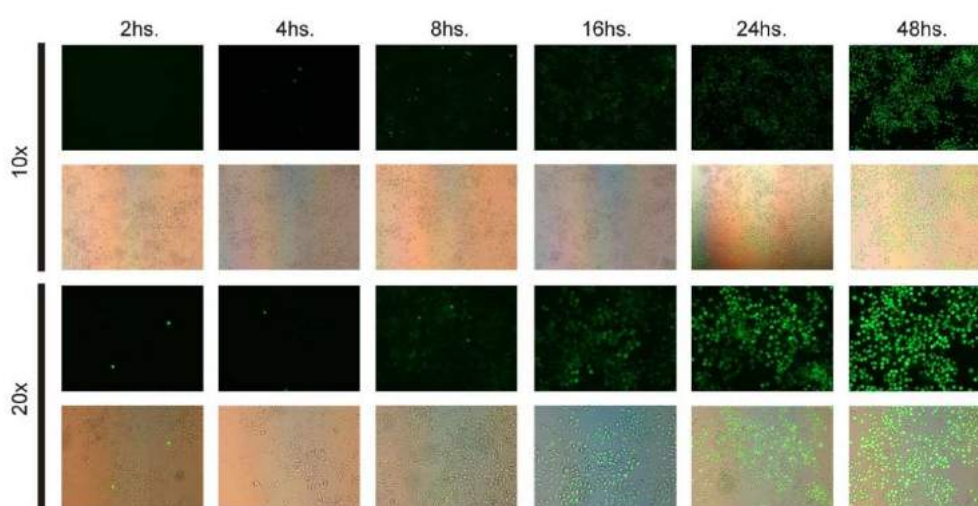


Figura 9.13. Cinética de expresión de Z-EGFP en células de insecto Sf9. Se muestran las microscopías correspondientes al campo claro y de fluorescencia de los distintos puntos de la

cinética de expresión de Z-EGFP en Sf9 mediante la infección con el virus recombinante Ac-Z-EGFP.

A partir de los resultados previos mostrados en el capítulo 6 (figura 6.13) donde se confirmó la presencia de la proteína Z en el sobrenadante de cultivo de células Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes que contenían el gen *z* (Ac-Z), se realizaron los mismos ensayos para este nuevo baculovirus conteniendo el gen *z-egfp*. Para esto, los sobrenadante de células infectadas con Ac-Z-EGFP fueron colectados a distintos tiempos, clarificados y ultracentrifugados en colchón de sacarosa, al igual que lo descrito previamente para la purificación de VLPs de células de mamífero. Las muestras fueron sometidas al análisis mediante *western blot* utilizando IgG α -Z (figura 9.14). Como control del ensayo, se utilizaron las muestras de monocapa y sobrenadante de cultivo de células sin infectar, mientras que como control positivo se agregó el pellet del sobrenadante ultracentrifugado de células Sf9 infectadas con Ac-Z. En la figura 9.14 se detecta la presencia de Z-EGFP de los sobrenadantes de cultivos a partir de las 14 hs post infección, la cual aumenta hasta el último punto evaluado (72 hs). Las muestras control no evidenciaron señal para Z, mientras que en el positivo de la reacción se detectó una banda de aproximadamente 14 kDa, correspondiente a His-Z.

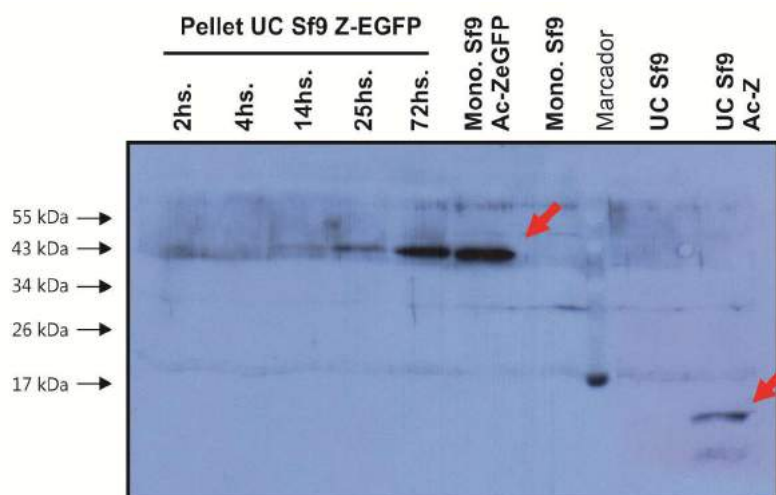


Figura 9.14. Cinética de expresión de Z-EGFP en células Sf9 post infección con Ac-Z-EGFP. Las primeras cinco líneas corresponden a las muestras de ultracentrifugación del sobrenadante de cultivo de Sf9 infectadas a los distintos tiempos de la cinética. Luego se encuentran las fracciones celulares o monocapas de células infectadas y sin infectar. Por último las dos últimas líneas corresponden al sobrenadante ultracentrifugado de células Sf9 sin

infectar y de células infectadas con el bácmido control Ac-Z. Las flechas rojas indican la banda correspondiente a la proteína Z-EGFP y His-Z

Búsqueda de VLPs conteniendo Z-EGFP producidas en células de insecto

A partir de la detección de Z-EGFP en el sobrenadante de cultivo de células Sf9 infectadas con Ac-Z-EGFP, se realizaron ensayos para confirmar la presencia de VLPs. Para esto se colectó el sobrenadante de células Sf9 a las 72 hs post infección, se clarificó y se ultracentrifugó en colchón de sacarosa, como se mencionó anteriormente. El material obtenido fue analizado utilizando los ensayos previamente descritos para la caracterización de VLPs obtenidas en células de mamíferos (Inicio del capítulo 9).

Ensayo de protección a proteinasa K

Como se puede observar del *western blot* mostrado en la **figura 9.15**, se detectó la presencia de la proteína Z-EGFP en el sobrenadante del cultivo de células Sf9 infectadas con Ac-Z-EGFP (calle 1). Por ello, para analizar la naturaleza particulada de las VLPs, la muestra fue sometida a un ensayo de protección a proteinasa K, en presencia o ausencia de Tritón x-100. En la **figura 9.15** se observa la detección de Z-EGFP en la muestra sin tratar y tratada en ausencia de detergente. Sin embargo no se detectó Z-EGFP en presencia del detergente Tritón X-100. Esto indicaría que Z-EGFP se encuentra dentro de partículas envueltas por una membrana lipídica, la cual la protege de la degradación mediada por proteasas en ausencia de Tritón X-100.



Figura 9.15. *Western blot* del ensayo de protección a proteinasa K. Sobrenadantes ultracentrifugados de células Sf9 infectadas con Ac-Z-EGFP incubados con proteinasa K (0,4 µg/µl) y/o Tritón X-100 (utilizando los símbolos + y -). Se detectó la presencia de Z utilizando anticuerpos policlonales anti Z.

Si bien las VLPs obtenidas en células de mamífero 293T a partir de la expresión de Z-EGFP evidenciaron el mismo comportamiento que el observado en células Sf9, en

este caso es necesario tener en cuenta que en el sobrenadante también están presentes los baculovirus brotantes derivados del ciclo replicativo viral. Como se mencionó previamente los baculovirus poseen un tamaño similar al observado para las VLPs de Z-EGFP obtenidas en células 293T (100 nm y 200 nm), y están recubiertos por una membrana lipídica. Si bien ambas partículas difieren en su morfología (los baculovirus de estructura cilíndrica envuelta y las VLPs son estructuras envueltas pleomórficas), son capaces de sedimentar mediante ultracentrifugación en colchón de sacarosa y co-purificarse.

De acuerdo a estas características, existe la posibilidad de que los resultados obtenidos a partir de células de insecto correspondan a VLPs y/o virus brotantes conteniendo la proteína Z-EGFP en su envoltura.

Gradiente de sacarosa del sobrenadante de Sf9 infectadas con Ac-Z-EGFP

Una característica intrínseca de las *virus like particles* es la ausencia de material genético, por lo que no son infectivas *per se*. Esta propiedad no es compartida por los baculovirus brotantes que componen la progenie viral. Por lo tanto, esta propiedad permitiría realizar una separación de ambas partículas a partir de la diferencia de densidad. Para ensayar esta hipótesis se realizó un gradiente de sacarosa a partir del sobrenadante de células Sf9 infectadas con Ac-Z-EGFP y las fracciones obtenidas se analizaron mediante PCR (para la detección del genoma baculoviral), y *Dot Blot* (para la detección de Z-EGFP).

En la **figura 9.16** se observa la inmunodetección por *dot blot* de Z-EGFP dividida en dos conjuntos de fracciones de mayor señal (cuadros de línea punteada roja, **figura 9.16 C**). Para la mejor visualización de los resultados, se realizó una densitometría de la señal obtenida por *dot blot*, la cual se encuentra graficada en la **figura 9.16 B**. De esta manera es posible observar dos picos mayoritarios, con uno intermedio de menor intensidad. La detección del genoma baculoviral de las fracciones señaladas en el recuadro con línea punteada roja (**figura 9.16 D**) indica que la presencia de genoma viral coincide con las fracciones del pico I y el pico intermedio. Mientras que en las fracciones que están representadas en el pico II, no se detecta la presencia de genoma baculoviral mediante PCR. Por otro lado se re infectaron monocapas de Sf9 con las fracciones del gradiente observándose una gran proporción de los baculovirus infectivos en las fracciones representativas del pico I, y una menor proporción en las fracciones representativas del pico II, en comparación con el control de Sf9 infectadas a una MOI de 1 con Ac-Z-EGFP.

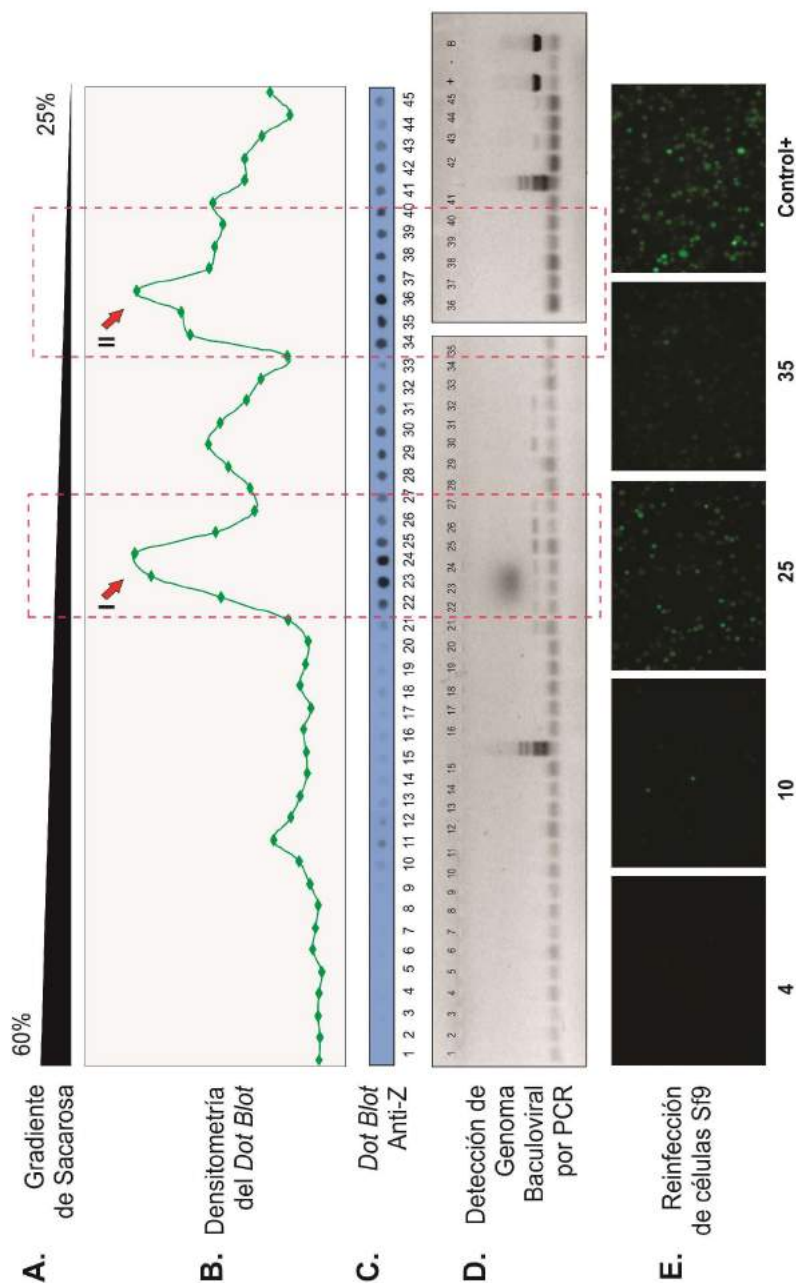


Figura 9.16. Separación de VLPs-Z-EGFP y baculovirus mediante gradiente de Sacarosa. Sobrenadante de células Sf9 infectadas con Ac-Z-EGFP ultracentrifugado en gradiente de sacarosa (**A**). Las fracciones del gradiente se analizaron mediante Dot blot (con anticuerpos α -Z), y se realizó una densitometría de la inmunodetección (**B y C**). Además se detectó el genoma baculoviral en cada fracción, utilizando PCR con *primers* específicos (**D**) y la presencia de baculovirus infectivos por reinfección de células Sf9 (**E**). Las flechas rojas en el gráfico **B** señalan los dos picos mayoritarios de la inmunodetección de Z. Los recuadros rojos unifican la región de los picos mencionados en las figuras **A, C y D**. En la figura **D** el símbolo + corresponde al control positivo de la PCR (un plásmido que contiene el fragmento de amplificación), el símbolo – corresponde al control negativo de la técnica, mientras que el símbolo B corresponde al control positivo del genoma de baculovirus Ac-Z-EGFP. En la figura **E** el control positivo corresponde a la reinfección de Sf9 con Ac-Z-EGFP a una MOI igual a 1, y los números debajo de las fotografías, indican el número de fracción que coincide con el número de fracción que aparece en la sección C. de esta figura

Estrategias para disminuir la presencia de virus brotantes en el sobrenadante de cultivo

Expresión de Z-EGFP en células UFL-Ag 286

Si bien el b crido recombinante Ac-Z-EGFP está basado en AcMNPV (*Autographa californica* MNPV), se sabe por ensayos previos que AcMNPV es capaz de infectar células derivadas de otros hospedadores como por ejemplo *Anticarsia gemmatilis* (células UFL-Ag 286). Sin embargo, la cantidad de virus brotantes que se obtiene a igual periodo de tiempo en esta línea celular es hasta dos órdenes menor que en Sf9 (datos no publicados).

Por otro lado, el virus recombinante Ac-Z-EGFP fue diseñado para regular la expresión del gen *z-egfp* mediante el promotor del gen temprano *ie1* de AgMNPV. Como se mencionó anteriormente este promotor presenta varias ventajas para este sistema. Es reconocido por la maquinaria de transcripción celular sin la necesidad de factores virales adicionales. Al ser un promotor temprano nos permite obtener transcritos a tiempos muy cortos post-infección (antes de que se generen virus brotantes). Por último esta secuencia es reconocida por diferentes líneas celulares de insecto y de mamíferos (Bilen MF, tesis doctoral, 2007).

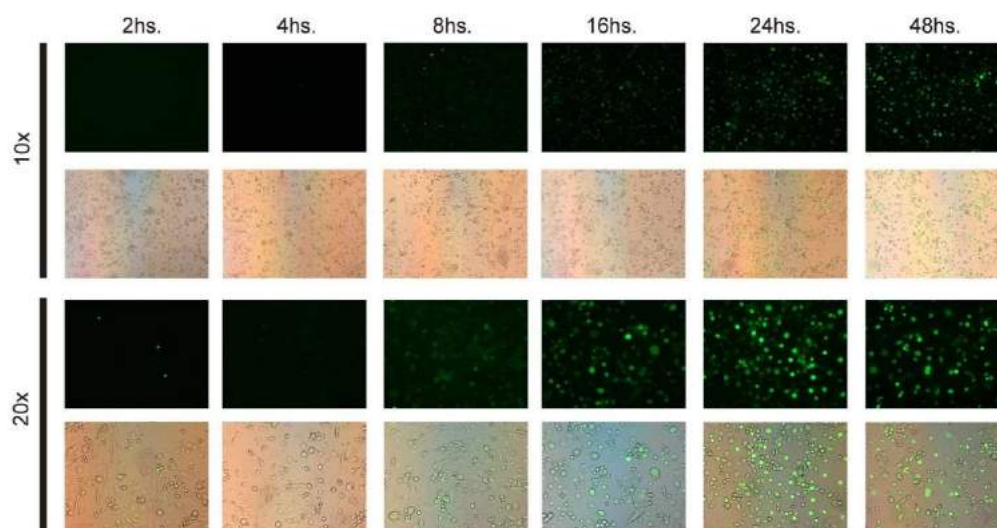


Figura 9.17. Cinética de expresión de Z-EFP en células de insecto UFL-Ag 286. Se muestran las microscopías correspondientes al campo claro y de fluorescencia, a un aumento de 10X y 20X, de los distintos puntos de la cinética de expresión de Z-EGFP en células UFL-Ag 286 por infección con el b crido Ac-Z-EGFP.

De acuerdo a estas características, se evaluó la expresión de Z-EGFP en la línea celular UFL-Ag 286 con el objetivo de disminuir la producción de baculovirus brotantes mediante la regulación del tiempo post-infección y la utilización de una línea celular menos eficiente para la generación del ciclo viral de AcMNPV.

Así como se observó para las células Sf9, la expresión de Z-EGFP se evidenció claramente a partir de las 8 hs, mostrando un pico máximo a las 48 hs (**figura 9.17**). Sin embargo cuando se recolectó el sobrenadante de cultivo y se ensayó la detección de Z-EGFP se obtuvo una señal muy débil solo a 48 hs post-infección y en la monocapa (datos no mostrados).

Ensayo de Afidicolina

Como se mencionó previamente las partículas presentes en el sobrenadante de cultivo de células Sf9 infectadas con Ac-Z-EGFP (virus brotantes y VLPs) son envueltas y poseen propiedades de sedimentación similares, por lo que métodos de separación basados en estas propiedades no serían aptos. Por este motivo se intentó disminuir la presencia de virus brotantes en el sobrenadante mediante la inhibición de la replicación baculoviral, luego del proceso de infección. De esta manera se buscó incrementar la proporción de VLPs derivadas de la actividad de brotación de Z-EGFP en el sobrenadante. Para este ensayo se utilizó el compuesto Afidicolina (APH), el cual es un diterpeno tetra cíclico con propiedades antivirales y antimicóticas (**figura 9.18 A**). Se encuentra como un metabolito secundario del hongo *Nigrospora sphaerica* y se extrae a partir del medio en el que crece el hongo. Esta micotoxina es capaz de inhibir el crecimiento de células eucariotas y de algunos virus animales, sin embargo este compuesto no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de las células bacterianas. La afidicolina inhibe específicamente las ADN polimerasas de la familia α y δ , pero no a las de la familia β , mientras que los procesos de síntesis de ARN y proteínas no se observan afectados. El mecanismo de inhibición de la ADN polimerasa es consecuencia de la competencia con el nucleótido dCTP por el sitio de unión a la enzima, lo que bloquea el proceso de replicación. En particular, (Thumbi *et al.*, 2007) en el año 2007 se describió la susceptibilidad del virus de *Autographa californica* a este compuesto de manera dosis dependiente, con bajos efectos citopáticos. Por estos motivos esta micotoxina fue elegida para producir el efecto inhibitorio de la replicación baculoviral, sin afectar la expresión de Z-EGFP.

En primer lugar se ensayó la actividad inhibitoria de la droga sobre la replicación de Ac-Z-EGFP en células Sf9 midiendo la intensidad de fluorescencia emitida en presencia de distintas concentraciones de afidicolina. En la **figura 9.18 C** se muestra

la densitometría de las microscopías obtenidas a 72 hs post-infección para cada condición (**figura 9.18 B**).

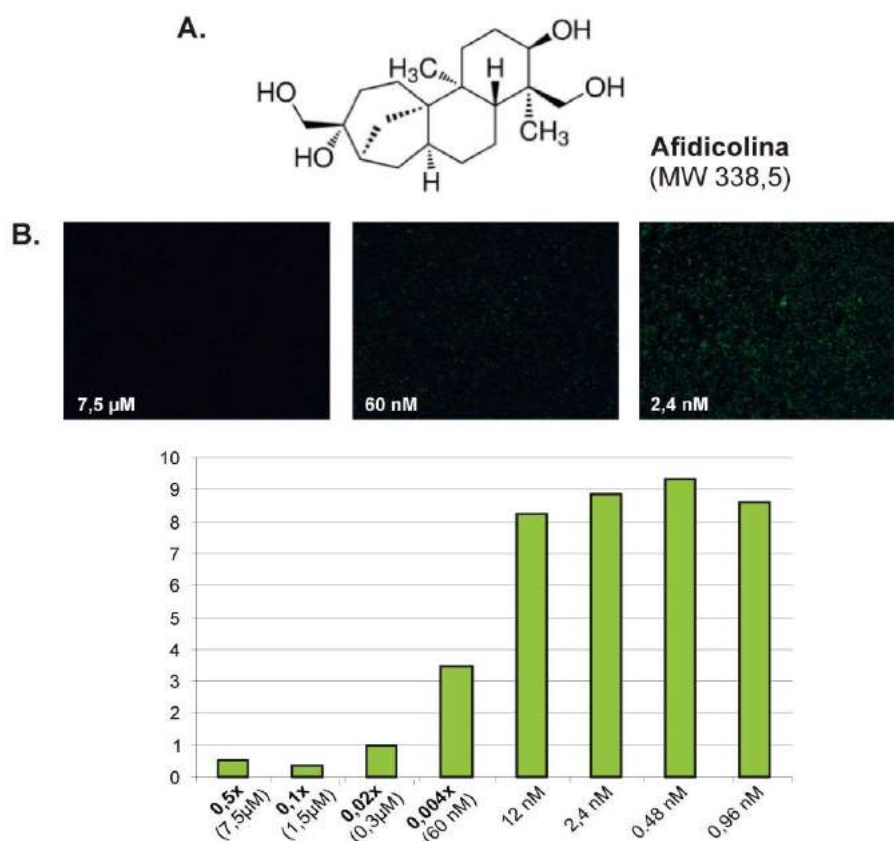


Figura 9.18. A. Estructura molecular de la micotoxina Afidicolina. **B.** Microscopía de fluorescencia de células Sf9 infectadas con Ac-Z-EGFP, a un aumento 4x. (7,5 μ M; 60 nM y 2,4 nM de afidicolina). **C.** Densitometría de las microscopías de fluorescencia de células Sf9 infectadas con Ac-Z-EGFP en presencia de distintas concentraciones de afidicolina (eje X). El eje Y corresponde a valores arbitrarios de fluorescencia.

A partir de la información obtenida, se decidió trabajar con concentraciones de afidicolina entre 7,5 μ M y 15 μ M en medio Grace suplementado con 10% de suero fetal bovino.

El diseño del experimento se encuentra esquematizado en la **figura 9.19**. Luego de la infección de células Sf9 con Ac-Z-EGFP (MOI de 2), se incubó durante 2 hs para permitir el proceso de adsorción. Una vez retirado el inoculo viral, la monocapa se lavó con PBS de manera de disminuir la presencia de baculovirus no adsorbidos. Seis horas después de la infección, se agregó al medio afidicolina 1x (15 μ M). Este periodo

permite la replicación parcial del genoma baculoviral, el cual contiene el gen para la expresión de Z-EGFP, previo al inicio del proceso de brotación. Y ha sido previamente descrito por Rosinski *et al.* (2001) que el proceso de brotación viral inicia su etapa exponencial luego de las 20 hs post infección.

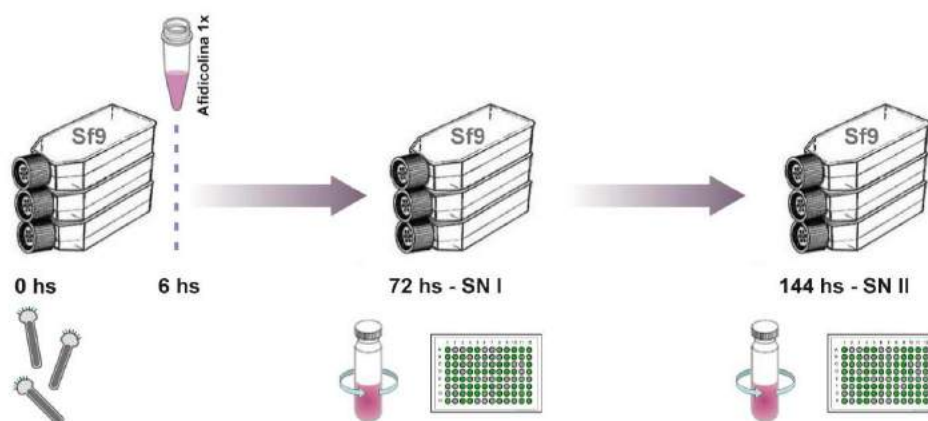


Figura 9.19. Esquema del diseño experimental del ensayo Afidicolina. A tiempo cero, monocapas de Sf9 a un 80% de confluencia son infectadas con Ac-Z-EGFP a una MOI de 2, luego de 6 hs de incubación se agrega la afidicolina 1x ó 0,5x y se incuba 72 hs. En esta etapa se recupera el sobrenadante de cultivo, la monocapa se lava tres veces con PBS 1x, y se agrega medio de cultivo fresco con la misma concentración de afidicolina usada en la etapa anterior. Luego de incubar otras 72 hs (144 hs en total), se recupera el sobrenadante y se almacena la monocapa para los posteriores análisis. Ambos sobrenadantes recuperados son titulados y ultracentrifugados para su análisis mediante *western blot*.

Luego de 72 hs de incubación el sobrenadante de cultivo fue colectado, la monocapa fue lavada con PBS y se agregó nuevamente medio de cultivo suplementado con afidicolina 15 μ M. Las células se incubaron otras 72 hs, es decir una total de 144 hs. Finalmente se colectó el sobrenadante y la fracción celular. Se estimó la expresión de la proteína Z-EGFP mediante la medida de la fluorescencia emitida a diferentes tiempos post infección. Los sobrenadantes colectados a 72 hs y 144 hs post-infección se titularon, y una fracción fue purificada mediante ultracentrifugación, para analizar por *western blot* la presencia de Z-EGFP.

Como controles del ensayo se utilizaron células Sf9 sin infectar en presencia de afidicolina (APH) y células Sf9 infectadas con Ac-Z-EGFP en ausencia de APH.

En la **figura 9.20 A**, se muestra la expresión de Z-EGFP en células Sf9 a las 24 y 48 hs post infección con Ac-Z-EGFP, en presencia y ausencia de afidicolina. Es

importante destacar que la intensidad de fluorescencia en presencia de afidicolina se mantiene constante, mientras que en ausencia de la droga aumenta en el tiempo (figura 9.20 B). A las 72 hs no se detecta incremento de la fluorescencia con respecto a 48 hs, en presencia de APH (datos no mostrados).

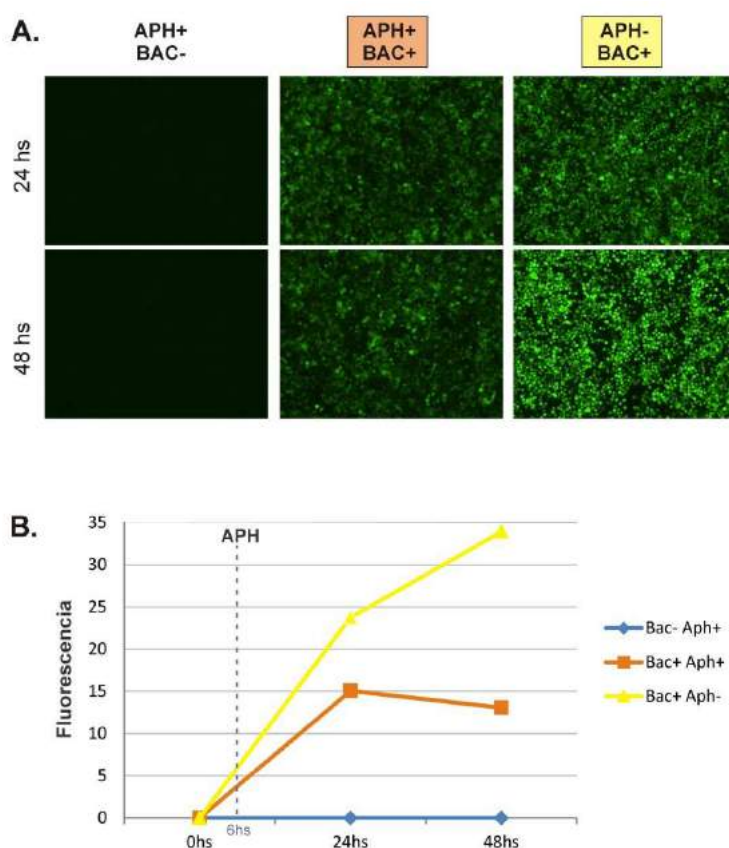


Figura 9.20. Ensayo de Afidicolina. **A.** Microscopías de fluorescencia de monocapas de Sf9 infectadas con Ac-Z-EGFP (Bac+) en presencia (Aph+) o ausencia (Aph-) de Afidicolina, 24 hs y 48 hs post-infección. También se muestra la fracción celular correspondiente al control de Sf9 sin infectar (Bac-) en presencia de la micotoxina. **B.** Densitometría de las infecciones mencionadas anteriormente. El eje Y corresponde a valores arbitrarios de fluorescencia, mientras que el eje X corresponde a los distintos tiempos evaluados. La línea punteada señala el tiempo al cual se agregó la afidicolina al medio de cultivo.

Para cuantificar los viriones brotantes generados en el ensayo, las fracciones del sobrenadante de cultivo colectadas a 72 y 144 hs post-infección fueron tituladas mediante el ensayo de formación de placas fluorescentes (Materiales y métodos), y se analizaron mediante *western blot* con anticuerpos α -Z (figura 9.21 A).

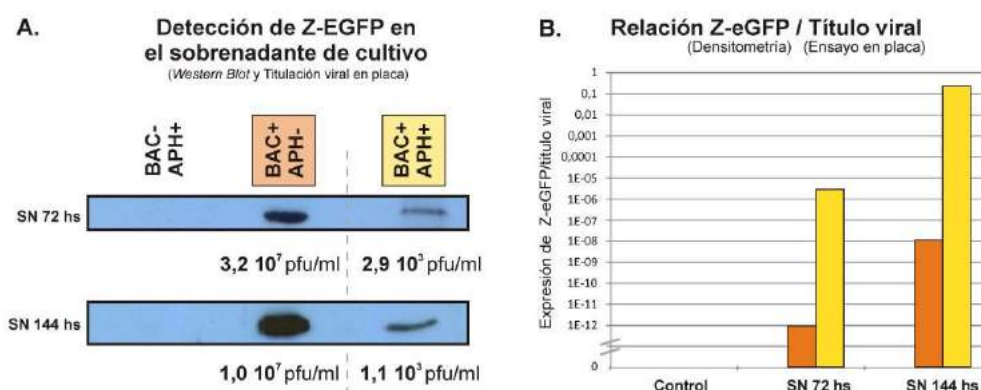


Figura 9.21. Ensayo de afidicolina. **A.** Western blot y titulación viral (especificado en pfu/ml) de los sobrenadante recuperados de células Sf9 infectadas con Ac-Z-EGFP en presencia y ausencia de Afidicolina (72 hs y 144 hs). También se muestra el control de Sf9 sin infectar en presencia de la toxina. **B.** Cociente entre los valores de densitometría de la inmunodetección de Z en el sobrenadante de cultivo y el título viral obtenido. El código de colores BAC+ APH- en naranja y BAC+ APH+, en amarillo se conserva en ambos gráficos. Los valores de densitometría poseen unidades arbitrarias.

Según puede observarse en la **figura 9.21 A**, se detecta la presencia de Z-EGFP en las células infectadas con y sin tratamiento con afidicolina, aunque resulta evidente una diferencia significativa en la intensidad de la señal entre ambas muestras. Además, solo en la condición sin afidicolina (BAC+APH-) se puede observar un aumento en la señal entre las 72 hs y 144 hs. En cuanto a los títulos virales fueron constantes en cada grupo, y significativamente diferentes entre ambos. Una manera de analizar la composición de la señal observada mediante la inmunodetección de Z es relativizando la señal obtenida respecto al valor del título viral para cada condición (**figura 9.21 B**). De este modo, se normaliza cada valor (de señal de Z-GFP) respecto a la cantidad de partículas virales y si se detectan incrementos en los valores de este cociente podría adjudicarse a la presencia de otras partículas conteniendo Z-EGFP.

En este caso, cuanto más elevado es el valor de la relación (Densitometría/Título viral), mayor proporción de la señal es consecuencia de la presencia de partículas distintas a los baculovirus. Como se observa en la **figura 9.21 B** los valores más elevados se obtienen en células infectadas en presencia de afidicolina (BAC+APH+) en ambos tiempos. Mientras que en las células infectadas, en ausencia de la micotoxina se obtienen valores menores. Este resultado indicaría que en condiciones de infección con el baculovirus recombinante sin afidicolina, una porción importante de

la señal en el sobrenadante ultracentrifugado, corresponde a la proteína Z-EGFP incluida en baculovirus brotantes. Sin embargo, también se evidencia que existen otras partículas en el sobrenadante, distintas a los baculovirus, que contienen Z-EGFP.

EXPRESIÓN DE HIS-Z EN CÉLULAS Sf9

En el capítulo 6 se describió la expresión de la proteína His-Z, en baculovirus regulada por el promotor de poliedrina, con la finalidad de obtenerla pura y en cantidad para su posterior cristalización.

En esta estrategia se construyó un baculovirus recombinante (Ac-Z) que contenía la proteína Z fusionada por su extremo amino terminal a 42 aminoácidos, provenientes del plásmido de expresión y un *tag* de 6 histidinas para su posterior purificación.

El análisis, mediante *western blot*, de la expresión de esta versión de la proteína Z revela dos bandas de aproximadamente 15 y 10 kDa (**figura 9.22 A**). Las dos bandas detectadas podrían corresponder, de acuerdo a su peso molecular, a la proteína teórica, y a la generada a partir del inicio de traducción propio del ORF de z (sin el *tag* de histidinas).

Por otro lado, en ensayos anteriores se detectó la presencia de Z-EGFP en partículas brotantes a partir de células de insecto infectadas con Ac-Z-EGFP. Este resultado podría estar indicando que las células de insecto poseen un sistema de miristoilación y brotación similar al de las células de mamíferos u otro que estuviese reconociendo a la proteína Z y generando la brotación de partículas con Z incluida en membranas.

Para intentar resolver esta cuestión y confirmar la presencia de VLPs a partir de células de insecto, se realizaron ensayos de expresión de Z en células Sf9, mediante la infección del baculovirus recombinantes Ac-Z, con la finalidad de obtener la expresión de Z sola.

Búsqueda de Z en partículas brotantes después de la infección

A partir de la infección de células Sf9 con Ac-Z, se analizó la presencia de Z en el sobrenadante de cultivo. Para esto, el sobrenadante colectado fue clarificado y ultracentrifugado en colchón de sacarosa 30 %. El *pellet* obtenido, donde se espera obtener viriones y otras partículas de tamaño similar derivadas del cultivo, fue resuspendido en PBS y se analizó mediante *western blot* con anticuerpos α -Z (**figura 9.22 A**). Paralelamente, otra fracción de la muestra fue analizada mediante

microscopía electrónica de transmisión con inmuno detección, utilizando anticuerpos α -Z y anticuerpos α -IgG de conejo conjugado con partículas de oro coloidal.

Se observaron partículas envueltas pleomórficas de alrededor de 100 nm (**figura 9.22 B**), junto con estructuras en forma de báculos, las que identificamos como baculovirus brotantes (**figura 9.22 C**). Ambas partículas contenían gránulos de oro, lo cual indicaban la presencia de Z.

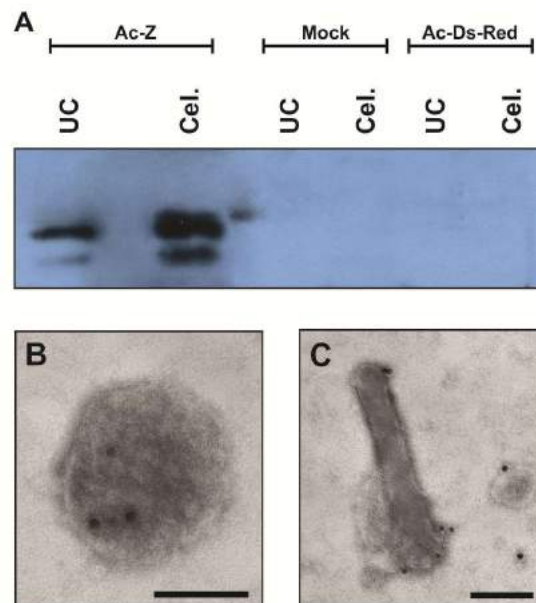


Figura 9.22. Expresión de Z en células Sf9 **A.** *Western blot* de la fracción celular y del sobrenadante de cultivo ultracentrifugado de células Sf9 infectadas con Ac-Z, Ac-Ds-Red (control) y sin infectar, utilizando anticuerpos α -Z. **B** y **C.** Microscopías electrónicas de transmisión del *pellet* obtenido luego de la ultracentrifugación del sobrenadante de cultivo de células infectadas con Ac-Z, utilizando tinción negativa con acetato de uranilo. Tipos de partículas detectadas conteniendo Z (**B.** VLPs, **C.** baculovirus brotante). La inmunodetección se realizó con anticuerpos α -Z. Las barras de tamaño son equivalentes a 100 nm.

Fue posible detectar la proteína Z utilizando anticuerpos α -Z tanto en la fracción celular como en el *pellet* ultracentrifugado del sobrenadante de cultivo (**figura 9.22 A**). La señal detectada estuvo ausente en los controles de células Sf9 sin infectar (*Mock*) y células infectadas con el baculovirus recombinante conteniendo la proteína Ds-Red (Ac-Ds-Red).

Ensayo de protección a Proteinasa K

Para analizar la integridad de las partículas purificadas del sobrenadante de cultivo de células infectadas con Ac-Z, las muestras obtenidas del *pellet* de la ultracentrifugación se sometieron a un ensayo de protección a proteinasa K. Las muestras fueron tratadas con 0.4 µg/µl de proteinasa K o la misma suplementada con 1% Tritón X-100. Estas muestras fueron analizadas por *western blot* utilizando el suero policlonal α-Z, como se muestra en la **figura 9.23**

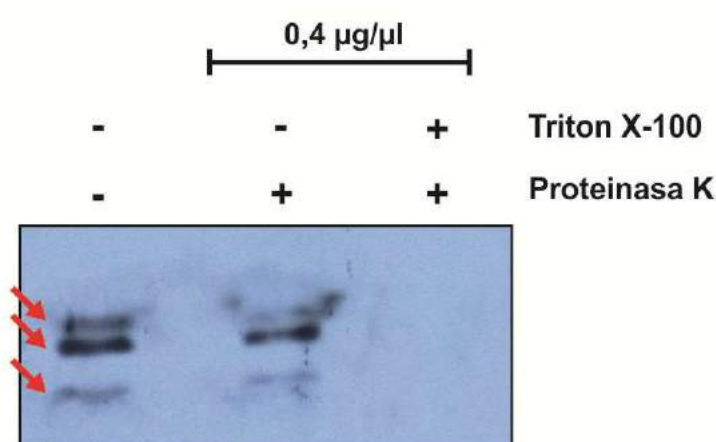


Figura 9.23. Detección de Z en el sobrenadante de cultivo. *Western blot* del ensayo de protección a Proteinasa K del *pellet* obtenido de la ultracentrifugación del sobrenadante de cultivo de células infectadas con Ac-Z. El tratamiento se realizó en presencia y ausencia de Tritón X-100, comparando con el control sin tratamiento. Las flechas rojas indican las bandas correspondientes a la expresión de His-Z.

DISCUSIÓN

En este capítulo se analizó la expresión y actividad de la proteína Z de la cepa Candid#1 del virus Junín en sistemas de células eucariotas, en particular en células de mamífero y de insecto. En primer lugar se ensayó la expresión de la proteína Z sin el agregado secuencias heterólogas en el sistema de expresión de células 293T, donde no fue posible la inmunodetección de la misma. Teniendo en cuenta las funciones biológicas descritas para Z, las cuales indican un comportamiento citotóxico para la célula hospedadora, no es sorprendente que se dificulte la expresión de Z en cantidades detectables. Este tipo de efecto citotóxico también fue observado anteriormente para la expresión de la proteína Z del virus Lassa (Branco *et al.*, 2010) resaltando una marcada elongación celular luego de 24 hs, y una separación del sustrato plástico significativo a las 48 hs post-transfección. Si bien en nuestro estudio no se midió cuantitativamente este efecto, se observó un efecto similar en células transfectadas con pZ-N3. Por este motivo se construyó un vector conteniendo el ORF que codifica para la proteína Z fusionado por el extremo 3' al ORF de la proteína EGFP, esperando disminuir el efecto citotóxico. La transfección del mismo produjo altos niveles de expresión de la proteína Z-EGFP con una distribución homogénea en el citoplasma con algunas acumulaciones en regiones cercanas al núcleo celular (figura 9.3 A). Las imágenes obtenidas por microscopía confocal permitieron estudiar en mayor detalle algunas de estas regiones (figura 9.4). En primer lugar, las acumulaciones de Z-EGFP en regiones cercanas al núcleo celular coinciden con la zona donde se esperaría encontrar el sistema membranoso del retículo endoplasmático. Por otro lado, las regiones de acumulación de la proteína con una distribución punteada en el citoplasma podrían ser consecuencia de la interacción anteriormente descrita entre Z y la proteína celular PML (ver capítulo 3). Esta oncoproteína forma “cuerpos nucleares”, los cuales en presencia de la proteína de matriz de los arenavirus se redistribuyen en un patrón punteado citoplasmático (Borden *et al.*, 1998). Por otro lado, las pequeñas regiones de acumulación de Z-EGFP observadas en la figura 9.4 podrían ser consecuencia de compartimientos endosomales tardíos, tales como los cuerpos multivesiculares (MVB). Estos podrían contener vesículas intraluminales derivadas de Z-EGFP, como se ha descrito para algunos retrovirus (McDonald & Martin-Serrano, 2009). Estos cuerpos multivesiculares componen una vía de salida extra a la brotación viral en la membrana plasmática. Luego de ser transportados a la membrana plasmática, estos compartimientos se fusionan a la misma y permiten la liberación de las vesículas intraluminales, en este caso, las VLPs derivadas de Z-EGFP. Esta hipótesis, la que describe a Z-EGFP

asociada a vesículas membranosas, se soporta en el hecho de que en el sistema de células de mamífero la proteína Z puede ser miristoilada. Esta característica de la proteína de matriz de los arenavirus dirige su distribución hacia la membrana plasmática y hacia pequeñas regiones de acumulación alrededor del citoplasma, en células infectadas o transfectadas con Z (Strecker *et al.*, 2006). En consecuencia es posible postular la hipótesis de que los puntos observados en el citoplasma de células transfectadas con pZ-EGFP, podrían ser vesículas membranosas que transportan la proteína desde el lugar de síntesis hacia la membrana plasmática. Un trabajo reciente de Fehling *et al.*, (2013) soportaría la hipótesis de que las regiones de acumulación de Z-EGFP citoplasmáticas corresponden a la proteína asociada a compartimientos membranosos. En este trabajo los autores describieron que las proteínas Z de los virus Lassa, Junín y Machupo son capaces de colocalizar con la kinesina KIF13A, una proteína motora del extremo positivo dependiente de los microtúbulos, la cual está involucrada en el transporte endosomal. A sí mismo, mostraron que Z es capaz de colocalizar con la proteína marcadora de endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares CD63, lo que en conjunto estaría evidenciando que el transporte de Z ocurre asociado al citoesqueleto de microtúbulos y en asociación a los endosomas tardíos. Justamente, es en estos últimos donde se localizan los componentes del complejo ESCRT involucrados en la posterior brotación viral. Si bien es la primera vez que se describe este mecanismo para un miembro de la familia *Arenaviridae*, esta estrategia de direccionamiento mediante microtúbulos ha sido descrita previamente para los virus vaccinia, HSV-1 y HIV-1.

Por otro lado, en el año 2002 Kentsis *et al.* describieron que la proteína Z del virus LCM expresada en un sistema bacteriano es capaz de autoensamblarse en estructuras proteicas ordenadas de aproximadamente 500 Å, las cuales se aproximan en tamaño a los agregados de proteína observados *in vivo* en este trabajo. Si bien el tamaño de los multímeros obtenidos *in vitro* por Kentsis coincide con los puntos de acumulación descritos en la figura 9.4, es importante destacar que la proteína Z purificada expresada en un sistema bacteriano no se encuentra miristoilada, dado que este tipo de modificaciones postraduccionales no ocurre en estos sistemas.

Continuando con el análisis de la transfección de pZ-EGFP en células 293T se observó que la morfología de las mismas se diferencia claramente de las células control (transfectadas con pEGFP-N3). En el primer caso, fue posible observar la curvatura de la membrana plasmática como si existieran regiones de iniciación de la brotación asociadas a la proteína recombinante, lo que sugiere que Z-EGFP es activa para la función de brotación, tal como lo es Z. Este tipo de curvaturas de la membrana plasmática también se han observado por microscopía confocal de fluorescencia para

otros virus tales como el baculovirus AcMNPV (Ohkawa *et al.*, 2010), el retrovirus MLV (Gladnikoff *et al.*, 2009) y en el sistema artificial de vesículas gigantes unilamelares asociadas con componentes de ESCRT (Thomas Wollert & James H. Hurley 2010). Este tipo de curvatura de la membrana no se observa en la muestra control, la cual expresa la proteína EGFP.

Los resultados representados en la **figura 9.5** muestran que la proteína recombinante Z-EGFP fue capaz de formar vesículas a partir de la membrana citoplasmática, lo que sugiere que la fusión a una proteína de 238 aminoácidos como EGFP no perjudicaría la capacidad de gemación de Z. Esta es una característica común de los polipéptidos de la matriz, como la proteína Gag de VIH o la proteína M1 del virus Influenza (Chackerian, 2007). Sin embargo, no es frecuente que las proteínas de matriz sean capaces de retener su actividad propulsora de la brotación al estar fusionadas a proteínas de gran tamaño. Se ha descrito recientemente que la fusión de la luciferasa de *Gaussia princeps* (185 aminoácidos) a la proteína Z resultó en una proteína quimérica capaz de conservar la actividad de producción de VLPs (Capul y de la Torre, 2008)

Considerando la capacidad de la proteína Z del virus Junín de retener la actividad de brotación al estar fusionada a una proteína heteróloga (como EGFP), se postula que otras proteínas podrían ser acopladas a Z, para generar VLPs quiméricas, pudiendo estas últimas ser utilizadas como una herramienta para la vehiculización de antígenos.

Con el objetivo de analizar otros sistemas de expresión para Z-EGFP y producción de VLPs, se realizaron ensayos de expresión en células de insecto. En primer lugar se analizó la fuerza del promotor baculoviral *le1* en células 293T mediante transfección, respecto a CMV (**figura 8.11**). Se observó que el primero es menos eficiente que CMV. Luego se realizó este mismo ensayo en células Sf9, y se observó que la eficiencia de transfección en este sistema fue muy baja (**figura 8.12**). En contraste, la expresión de Z-EGFP, bajo la regulación de *le1*, mediante infección de células Sf9 y UFL-Ag 286 resultó en altos niveles de expresión. Fue posible detectar la presencia de Z-EGFP en la fracción celular y en el sobrenadante de cultivo de células infectadas, a partir de las 8 hs post-infección (mediante microscopía de fluorescencia, **figuras 9.13 y 9.15**) y 14 hs post-infección en el sobrenadante de cultivo de Sf9 (mediante *Western blot*, **figura 9.14**). Esto coincide con la temprana actividad de *le1* durante la infección viral.

La detección de Z-EGFP en el sobrenadante de cultivo infiere la funcionalidad de las señales de miristoilación y direccionamiento en células de insecto. Por este motivo, se analizó la integridad de las partículas detectadas en el pellet de la ultracentrifugación

del sobrenadante de cultivo de células Sf9 infectadas con Ac-Z-EGFP (**figura 9.16**). Se observó que las partículas precipitadas protegían a Z-EGFP de la degradación de la proteinasa K, y que esta protección fue sensible al detergente Tritón X-100. Estos resultados abonan la hipótesis de que la expresión de Z-EGFP en células de insecto permite la brotación de VLPs.

Sin embargo, la expresión de Z-EGFP mediante infección puede producir baculovirus brotantes que contengan Z-EGFP como consecuencia de la brotación de los mismos a partir de la membrana plasmática de la célula infectada. En la **figura 9.17**, correspondiente a la purificación de VLPs mediante gradiente de sacarosa se observa la presencia de Z-EGFP en dos fracciones diferenciales. En una de las mismas (señalada como I en la figura) fue posible detectar genoma baculoviral, mientras que en la otra no (indicada como II). Esto podría indicar que la fracción I corresponde mayoritariamente a lo baculovirus brotantes, mientras que la fracción II, esta enriquecida en partículas no virales. Sin embargo mediante reinfección de células Sf9 con cada una de las fracciones correspondientes al gradiente de sacarosa, se observó la presencia de baculovirus brotantes funcionales en casi todas las fracciones, mayoritariamente en las correspondientes al pico I. Debido a que las señales de las dos fracciones (pico I y II) son muy similares, la disminución significativa del título viral en el pico II (junto con la no detección del genoma viral en este pico) es indicativo de la presencia de otro tipo de vesículas membranosas conteniendo Z-EGFP en esta fracción.

Continuando con el objetivo de confirmar la funcionalidad de Z en células de insecto, e intentando disminuir la proporción de partículas baculovirales brotantes en el sobrenadante de cultivo, se analizó la infección de Ac-Z-EGFP en células derivadas de *Anticarsia gematalis* (UFL-Ag 286), teniendo en cuenta que la progenie viral en estas células es mucho menor. Como se observó en la **figura 9.17**, solo se logró evidenciar la expresión de Z-EGFP en células ULF-Ag mediante fluorescencia y *western blot* (a partir del sobrenadante de cultivo) luego de 48 hs post-infección (Datos no mostrados).

Como una segunda alternativa para la disminución de las partículas baculovirales brotantes en el sobrenadante de cultivo, se realizaron ensayos de infección de células Sf9 en presencia de un inhibidor de la polimerasa viral (Afidicolina). Como se observó en la **figura 9.18 y 9.20** el compuesto afidicolina fue capaz de disminuir la expresión de EGFP de manera dosis dependiente, siendo esta disminución consecuencia de la inhibición de la replicación del genoma viral luego de la infección. El ensayo con Afidicolina, permitió detectar Z-EGFP en el sobrenadante de cultivo en presencia de APH y con muy bajos títulos de baculovirus funcionales (**figura 9.21**). Esto permitiría inferir que las partículas detectadas mediante *western blot* en el sobrenadante de

cultivo podrían corresponder no solo a viriones sino a VLPs derivadas de la expresión de Z-EGFP. Por otro lado, esto indicaría que la actividad de Z como inductora de la brotación se mantiene en las células de insecto Sf9.

Para confirmar los resultados obtenidos en células de insecto se realizaron ensayos de infección con el baculovirus recombinante Ac-Z, el cual expresa la versión de Z fusionada al tag de histidina (por el extremo N-terminal).

Se analizó la expresión de Z en el sobrenadante de células Sf9 infectadas. En la **figura 9.22** se observa que fue posible detectar la presencia de Z en el sobrenadante de cultivo, y mediante microscopías electrónicas de transmisión con *immunogold* para la proteína Z se evidenciaron estructuras correspondientes a baculovirus brotantes y vesículas membranosas redondeadas. Ambas estructuras fueron detectadas por IgG α -Z, indicando la presencia de la proteína Z en las mismas.

Así como se hizo para la proteína Z-EGFP, se realizó un ensayo de protección a proteinasa K de la fracción obtenida luego de la ultracentrifugación del sobrenadante de cultivo (**figura 9.23**), y nuevamente se observó que Z era protegida de la degradación, en ausencia de detergente.

Los resultados obtenidos indicarían que las células de insecto Sf9 son capaces de producir VLPs basadas en la proteína Z, y que las mismas co-purifican con viriones brotantes.

Cabe destacar que la versión de la proteína Z expresada a partir de Ac-Z contiene fusionado un péptido de 42 aminoácidos en el extremo N-terminal, donde ocurre el proceso de miristoilación. Sin embargo, el análisis por *western blot* de la expresión de la proteína en células Sf9 muestra tres bandas de expresión (**figura 9.23**) de aproximadamente 15,1 kDa, 12,7 kDa y 10,6 kDa que corresponden al peso molecular teórico (15,4 kDa, 12,3 kDa y 10,4 kDa) de tres polipéptidos originados a partir de inicios de traducción internos al ORF. La banda más pequeña (10,6 kDa) coincide con el peso molecular de la proteína Z sin agregado aminoácidos.

Es importante considerar que la brotación observada en los ensayos debe estar dada por la fracción correspondiente a la expresión de Z sin agregados aminoácidos, ya que la adición de aminoácidos en el extremo N-terminal de la proteína podría afectar directamente la miristoilación, de acuerdo a lo descrito por Farazi *et al.* (2001). Otra alternativa posible es que las células de insecto puedan procesar y/o reconocer a Z con el péptido de fusión incluido y permitir la brotación de las VLPs.

Aunque en células de insecto no se ha descrito aún la modificación de proteínas mediante el agregado de ácido mirístico, estas células llevan a cabo una variedad de modificaciones similares a las conocidas para líneas de mamíferos (Klenk, 1996).

Para confirmar estos resultados, en el futuro se utilizarán mutantes de Z para el sitio de miristoilación y se realizarán ensayos de interferencia utilizando siARN contra el gen *vp80* (Marek *et al.*, 2010), que está asociado a la producción de baculovirus brotantes. De esta manera, la potencial presencia de Z-EGFP en el sobrenadante de cultivo sería exclusivamente consecuencia del proceso de brotación de VLPs derivadas de Z-EGFP.

Por último, previendo el escalado de la producción de VLPs se evaluó un método alternativo de transferencia génica. Teniendo en cuenta la capacidad de los baculovirus de transducir células de mamíferos, y los elevados costos de los reactivos de transfección, se analizó como alternativa la trasducción con Ac-Z-EGFP en células 293T.

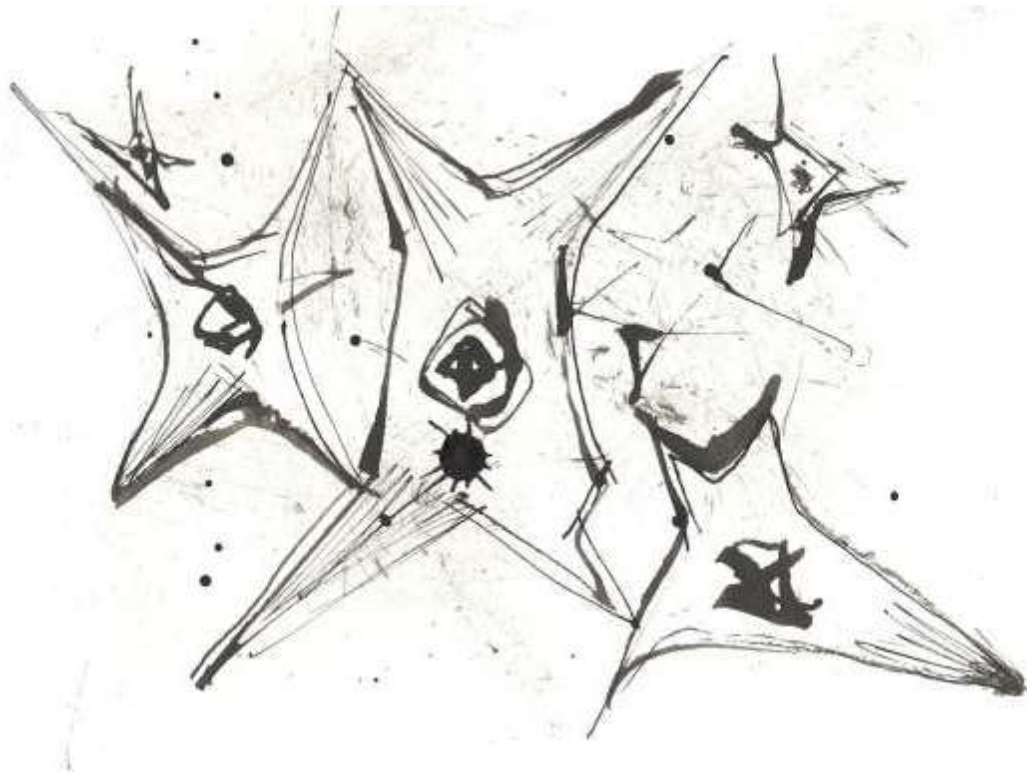
En el año 1983 fue reportada la capacidad de los baculovirus brotantes de transducir células de mamífero (Volkman & Goldsmith, 1983), y desde allí que se ha estudiado a los baculovirus como herramienta para la vehiculización de genes.

Los datos obtenidos, a partir de las condiciones ensayadas (ver materiales y métodos), no demostraron una eficiencia de expresión aceptable mediante transducción (Datos no mostrados).

Esta estrategia ha demostrado ser altamente eficiente en algunos casos, mediante la utilización de MOI mayores a 80 y la adición de butirato de sodio (Tang *et al.*, 2011). Se planea en el futuro la evaluación de la expresión de Z-EGFP en condiciones similares a las utilizadas por Tang *et al.*

SECCIÓN V

APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS



DISEÑO DE UN SISTEMA DE
VEHICULIZACIÓN DE ANTÍGENOS Y
EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA
INMUNE *IN VIVO*
CAPÍTULO 10

INTRODUCCIÓN

Los resultados obtenidos a partir de los estudios básicos de la proteína Z del virus Junín descritos en los capítulos anteriores, nos permitieron proponer el diseño y desarrollo de una plataforma biotecnológica que aprovechara sus características para la vehiculización de antígenos específicos.

Teniendo en cuenta la capacidad de la proteína Z de inducir la producción de VLPs, se propone un sistema que permita la expresión de Z fusionada por el extremo C-terminal a un antígeno específico para vehiculizarlo por medio de VLPs. De acuerdo al estudio realizado, la proteína Z es capaz de soportar la fusión de la proteína EGFP en el extremo C-terminal, sin perder su actividad como inductora de la brotación.

Para el diseño de una plataforma que permita la generación de VLPs antígeno específicas, nos planteamos dos preguntas principales: 1- ¿las VLPs producidas son capaces de generar una respuesta inmune sobre el antígeno de interés fusionado?, 2- ¿és posible fusionar cualquier péptido a Z para generar VLPs antígeno-específicas?

En este capítulo se describen los resultados preliminares del desarrollo de un sistema de expresión y presentación de antígenos para la estimulación de la respuesta inmune, basados en la capacidad de la proteína Z del virus Junín para la generación de VLPs.

Para responder las preguntas formuladas anteriormente se estudió la capacidad de las VLPs para estimular la respuesta inmune humoral en ratón, utilizando como antígeno modelo, a la proteína fluorescente EGFP.

Por otro lado, para evaluar la vehiculización de otros antígenos fusionados a Z se analizó a la toxina Shiga asociada al Síndrome Urémico Hemolítico y la proteína VP6 de rotavirus (cepa murina EC).

Toxina shiga

Las infecciones causadas por las bacterias *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (Stx) (STEC), provocan colitis hemorrágica y son un serio problema de salud pública. En algunos casos, la colitis lleva a una complicación conocida como Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), que está caracterizado por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, y falla renal (Karmali, 1989). Las STEC producen mayormente dos tipos antígenicamente diferentes de Stx: Stx1 y Stx2, con sus variantes. Sin embargo, la Stx2 es clínica y epidemiológicamente más relevante, ya que es la que más se asocia a casos de SUH (Boerlin et al, 1999). Su estructura incluye dos subunidades, la A (subA) enzimáticamente activa, y antígenicamente

conservada entre las distintas variantes de toxinas y una subunidad B (sub B) pentamérica de unión al receptor. Posteriormente, a la colonización del intestino por la bacteria, la toxina Shiga producida pasa a la circulación y, a través de la subunidad B, se une a su receptor específico (globotriaosil ceramide, Gb3) presente fundamentalmente en el endotelio del glomérulo renal y el epitelio tubular, donde es internalizada y produce la muerte celular por inhibición de la síntesis proteica.

Argentina presenta la mayor incidencia del mundo para este síndrome; además, es la principal causa de falla renal aguda en la infancia y la segunda causa de trasplante renal en la adolescencia. Las secuelas de falla renal crónica o falla neurológica, afectan al 30 % de los pacientes. Aunque la diálisis peritoneal ha reducido significativamente la mortalidad, aún no existen terapias preventivas, ni tratamientos específicos, que posibiliten controlar el nivel de daño renal. Debido a la ausencia de tratamiento específico, es de suma importancia el desarrollo de vacunas experimentales para infecciones con STEC.

Rotavirus

Con respecto al segundo antígeno seleccionado para la evaluación del sistema, la proteína VP6 de los rotavirus, es uno de los componentes de la cápside del virión. Las partículas virales de rotavirus están compuestas por 3 capas proteicas, la capa interior se compone de 120 moléculas de VP2 que encierran los 11 segmentos genómicos de ARN junto con moléculas de VP1 y VP3. La capa intermedia se compone de 780 moléculas de VP6, mientras que la capa externa de la cápside está compuesta por las proteínas VP4 y VP7. La proteína VP6 es la más abundante en masa con respecto al resto de los componentes virales. La misma está altamente conservada y es un buen candidato para estimular la respuesta inmune y la generación de anticuerpos neutralizantes contra rotavirus. Dentro de la secuencia de VP6 existe una región de 14 aminoácidos, la corresponde a un epítipo T. Este epítipo se encuentra contenido dentro de la región denominada CD4 ubicada en el extremo C-terminal de VP6 (residuos 332-397) (Choi *et al.*, 2000). Esta región fue descrita como capaz de inducir altos títulos de anticuerpos, por lo que fue seleccionada como una alternativa a VP6 completa, para ser fusionada a Z o Z-EGFP.

Los rotavirus del grupo A provocan unos 125 millones de casos y alrededor de 600.000 muertes al año en todo el mundo (Estes & Kapikian, 2007; Parashar *et al.*, 2006). Virtualmente todos los niños se infectan con rotavirus en los primeros años de vida y, a pesar de que la mayoría de las infecciones causan diarrea leve, del 15 al 20% de los casos requieren tratamiento clínico, y del 1 al 3% requieren hospitalización por

deshidratación severa (Yee *et al.*, 2006). Se estima que más del 80% de las muertes ocurren en regiones pobres y se asocian con una inadecuada o tardía atención médica y desnutrición (Parashar *et al.*, 2003). El alto número de muertes en países en desarrollo y los altos costos médicos y sociales que genera la enfermedad hacen de los rotavirus un blanco de preferencia para el desarrollo de vacunas (Dennehy, 2008). No obstante la existencia en el mercado de dos vacunas, los problemas de cobertura y, sobre todo la necesidad de reducir los costos a través de desarrollos originados en países periféricos indican la conveniencia de generar alternativas (Ward *et al.*, 2008). Dado que estos agentes son también una importante causa de patología diarreica en especies de interés comercial incluyendo bovinos, porcinos, equinos, ovinos y aves de corral, los nuevos desarrollos pueden tener aplicaciones también en sanidad animal (Dhama *et al.*, 2009). En este sentido, un ejemplo de gran importancia para la producción ganadera en nuestro país lo constituye la diarrea neonatal en bovinos. Las diarreas neonatales en un rodeo de cría afectan las metas de producción porque provocan pérdidas en la ganancia de peso de los terneros al pie de la madre, muertes y elevados costos en tratamiento, diagnóstico y mano de obra. El síndrome diarreico se presenta por lo general en terneros menores de 10 días y hasta los 45 días de edad y puede alcanzar índices de morbilidad superiores al 50% con mortalidad entre el 1% y el 20% (Margueritte, 2007).

Tecnología de partículas tipo virales

Como se mencionó en el capítulo 4, actualmente los sistemas vacunales tienden a maximizar la seguridad, tanto de los operarios durante la producción de la misma, como de los usuarios al momento de su aplicación. Una de las estrategias que permiten obtener este tipo de niveles de seguridad es la utilización de VLPs. En este caso, la proteína Z del virus Junín permite obtener VLPs derivadas de su expresión, las cuales contienen a Z asociada a su membrana interior. La posibilidad de obtener VLPs quiméricas a partir de la fusión de secuencias heterólogas a Z, permite utilizar esta estrategia como vehiculización de antígenos para la estimulación de la respuesta inmune, y las ventajas de este sistema radican en el tamaño reducido de la proteína Z, su baja inmunogenicidad y la posibilidad de proteger al antígeno dentro de la partícula envuelta.

RESULTADOS

Producción de VLPs conteniendo Z-EGFP

Con el objetivo de obtener cantidades suficientes de VLPs conteniendo Z-EGFP para realizar ensayos de inmunogenicidad, se realizó un escalado de la producción a nivel de laboratorio. Para esto se transfectaron células 293T, se recuperó el sobrenadante de cultivo (durante una semana, ver materiales y métodos), se clarificó para la eliminación de restos celulares, y luego se ultracentrifugó en colchón de sacarosa. El *pellet* obtenido fue sometido a un tratamiento con Proteinasa K, con el objetivo de eliminar agregados proteicos u otras partículas no protegidas por envoltura lipídica que hubieran precipitado en este paso. Por último se realizó una segunda ultracentrifugación, para eliminar la proteasa y concentrar la muestra para permitir la inoculación de los animales de laboratorio (figura 10.1).

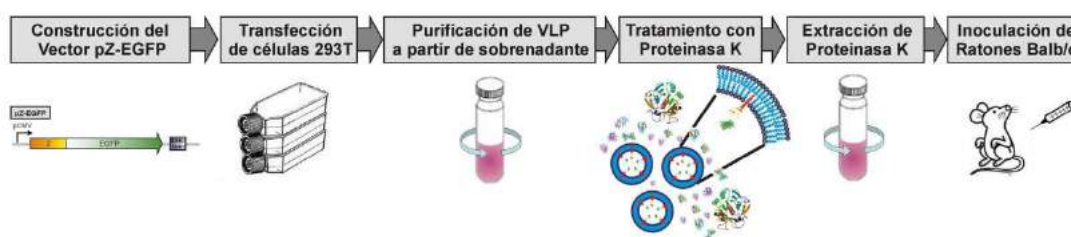


Figura 10.1. Esquema de producción de VLPs. A partir de células 293T transfectadas con la construcción pZ-EGFP se purifican VLPs a partir del sobrenadante de cultivo clarificado. A continuación se realiza un paso de limpieza con Proteinasa K y luego una segunda ultracentrifugación para retirar la misma y concentrar la muestra. Por último, con la muestra obtenida se inoculan ratones Balb/C para el posterior análisis de la respuesta inmune.

Análisis de la respuesta inmune humoral

Para determinar la respuesta humoral contra EGFP, se inmunizaron ratones Balb/C con las VLPs en ausencia de adyuvante y por vía intramuscular, según el esquema de la figura 10.2 A. Se inocularon 4 grupos de ratones, el grupo A fue inoculado con la muestra de VLPs purificadas derivadas de la expresión de Z-EGFP, el grupo B fue inoculado con las VLPs purificadas derivadas de la expresión de Z-EGFP previamente permeabilizadas por tratamiento con Tritón X-100, el grupo C fue inoculado con la proteína GFP purificada y soluble en PBS, y el grupo control D fue inoculado con PBS (figura 10.2 B).

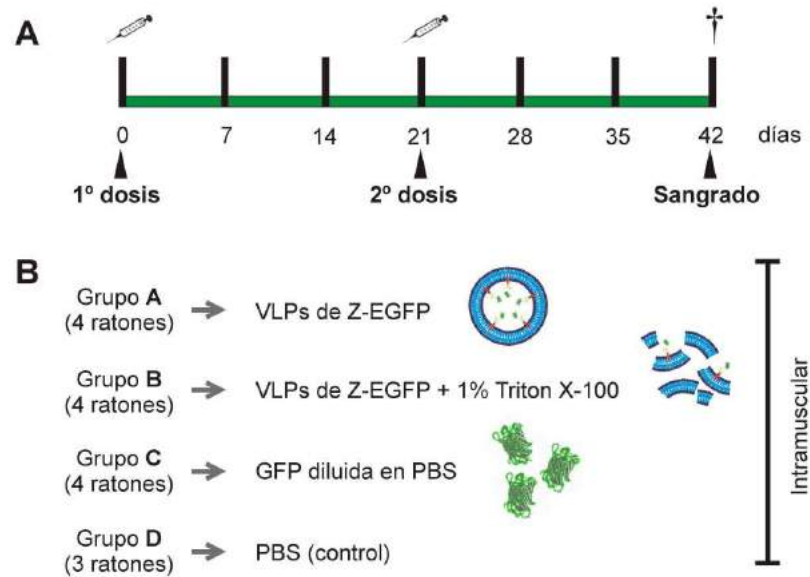


Figura 10.2. **A.** Cronograma de inoculación utilizado en este experimento. **B.** Grupos de ratones Balb/C inoculados vía intramuscular con las muestras de VLPs de Z-EGFP (Grupo A), VLPs de Z-EGFP tratadas con Tritón x-100 (Grupo B), GFP diluida en PBS (Grupo C) y el control de PBS (Grupo D).

Se tomaron muestras de sangre cada siete días hasta el sangrado final, se obtuvo el suero de cada una de ellas y se realizó un enzimo-inmunoensayo para la cuantificación de Inmunoglobulinas tipo G específicas de EGFP. Los resultados del ensayo demostraron que luego del día 21 los ratones pertenecientes al grupo A generaron respuesta contra EGFP, con su máximo título en el día 35. En la **figura 10.3** se observa la señal relativa entre el grupo A (inoculado con las VLPs de Z-EGFP enteras) respecto a los distintos controles al día 35.

Interesantemente, las VLPs enteras resultaron más inmunogénicas que cantidades similares de proteína EGFP soluble, e incluso de cantidades equivalentes de VLPs desarmadas por el tratamiento con detergentes.

Por otro lado, se evaluó mediante ELISA y *western blot* las IgG anti-Z de los sueros de los ratones de cada uno de los grupos, para determinar la respuesta humoral generada por la misma. No se obtuvieron niveles detectables por ninguna de las dos metodología (datos no mostrados).

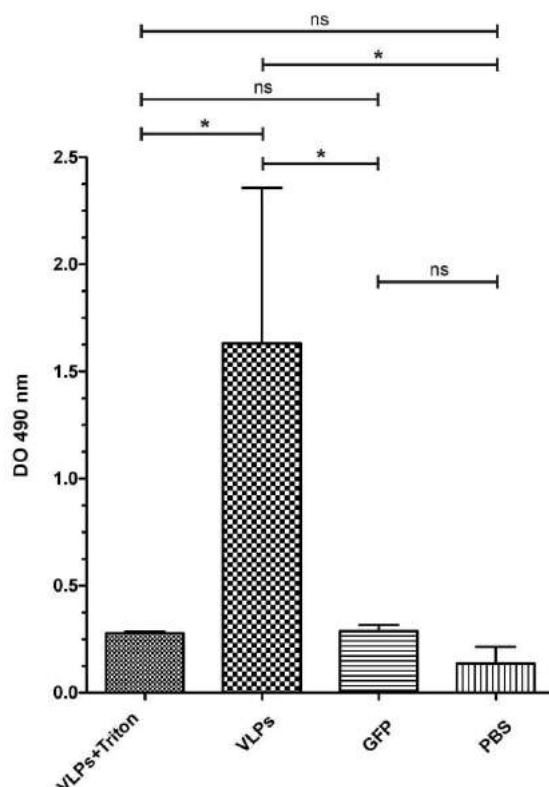


Figura 10.3. Respuesta de IgG específica para EGFP. Las muestras de suero del día 35 fueron diluidas 50 veces y utilizadas para la determinación de IgG α -EGFP mediante ELISA. En el eje Y se observa la media aritmética junto con la barra de error standard de la densidad óptica a 590 nm, mientras que en el eje X se observan los cuatro grupos de ratones inmunizados. La determinación de la significancia estadística de los datos se realizó mediante el test de ANOVA *one-way* (utilizando el test de comparación múltiple Tukey). *: $P < 0,05$ correspondiente a diferencias significativas. ns; no significativo ($P > 0,05$).

Producción de Z-EGFP VLPs en células COS

Una de las líneas celulares de mamíferos más utilizadas para la producción de productos biofarmacéuticos es la línea celular COS-7 (Roldao *et al.*, 2010). Esta línea derivada de riñón de mono verde africano, transformada con el antígeno mayor T de SV40, es adecuada para la transfección de vectores con origen de replicación de SV40, debido a que los mismos son capaces de replicar independientemente del genoma celular.

Dado que en el futuro se pretende realizar el escalado y la producción de VLPs en una línea celular apta para producción de biofármacos, se ensayó la producción de VLPs derivadas de Z-EGFP en células COS-7. La expresión de la misma fue

confirmada en la fracción del sobrenadante del cultivo por microscopía de fluorescencia (datos no mostrados) y por *western blot* revelado con α -Z, antes y después de ser tratada con proteinasa K, en ausencia y presencia de Tritón X-100 (figura 10.4)

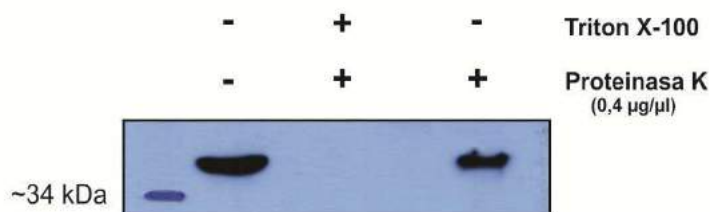


Figura 10.4. Ensayo de proteinasa K sobre partículas purificadas por colchón de sacarosa, del sobrenadante de cultivo de células COS-7 recombinant human erythropoietin transfectadas con el vector pZ-EGFP. En el grafico se indica la presencia o ausencia de proteinasa K (0,4 µg/µl) y/o Tritón X-100.

Evaluación del sistema de vehiculización utilizando otros antígenos

Luego de los resultados obtenidos para la vehiculización del antígeno EGFP, se decidió evaluar el sistema utilizando otras proteínas. Para esto se seleccionaron a la toxina Shiga, en particular a la porción Stx2A, y a la proteína VP6 de rotavirus (cepa EC, murina). Las mismas se clonaron fusionadas al extremo C-terminal de la proteína Z del virus Junín utilizando como base el vector pZ-N3 (ver **Materiales y Métodos**).

Expresión de Z-VP6 en células 293T

Una vez obtenida la construcción pZ-VP6, esta fue transfectada en células 293T y se evaluó la expresión de Z-VP6 mediante *western blot* con anticuerpos α -Z y α -Rotavirus. No se detectó señal positiva para ninguno de los dos péptidos (datos no mostrados). Por otro lado se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpos α -rotavirus marcados con fluoresceína sobre células transfectadas con la misma construcción. Los resultados que se observan en la **figura 10.5** muestran señal de fluorescencia en un bajo número de células y con baja intensidad. Esto podría ser consecuencia de la toxicidad de VP6 como proteína viral, aún estando fusionada a Z.

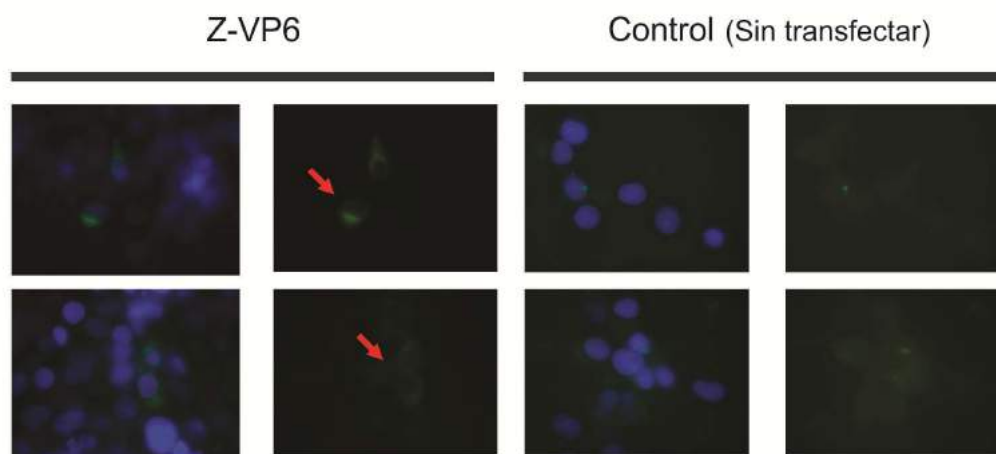


Figura 10.5. Inmunofluorescencia de células 293T transfectadas con pZ-VP6 con anticuerpos α -rotavirus marcados con fluoresceína. Los dos paneles de la derecha corresponden a la monocapa de células transfectadas con pZ-VP6, mientras que los paneles de la izquierda corresponden a las células control sin transfectar. Aumento 100x

Para comprobar si Z-VP6 posee propiedades citotóxicas (al menos en referencia al proceso de síntesis proteica) se realizó un ensayo de interferencia similar al previamente presentado en el capítulo 8. El mismo consiste en la co-transfección de un vector indicador conteniendo EGFP, y el vector para la expresión de la proteína a evaluar, en este caso pZ-VP6. Luego de 48 hs se analiza el perfil de fluorescencia de la muestra co-transfectada con respecto al control que fue transfectado únicamente con el vector reportero. Si la fluorescencia de la muestras es menor a la del control de EGFP, se puede inferir un efecto de inhibición en la expresión de EGFP.

Como se muestra en la **figura 10.6** la presencia del vector pZ-VP6 no provocó interferencia sobre la expresión de EGFP, lo que evidenciaría una baja o nula citotoxicidad de Z-VP6 con respecto a la síntesis proteica. En la figura también se muestran los resultados obtenidos transfectando el vector pZ-N3 (control positivo del ensayo) del cual ya se había descrito su efecto de inhibición en la síntesis proteica (ver **capítulo 8**), y para el vector pZ-Stx2A, que será detallado más adelante.

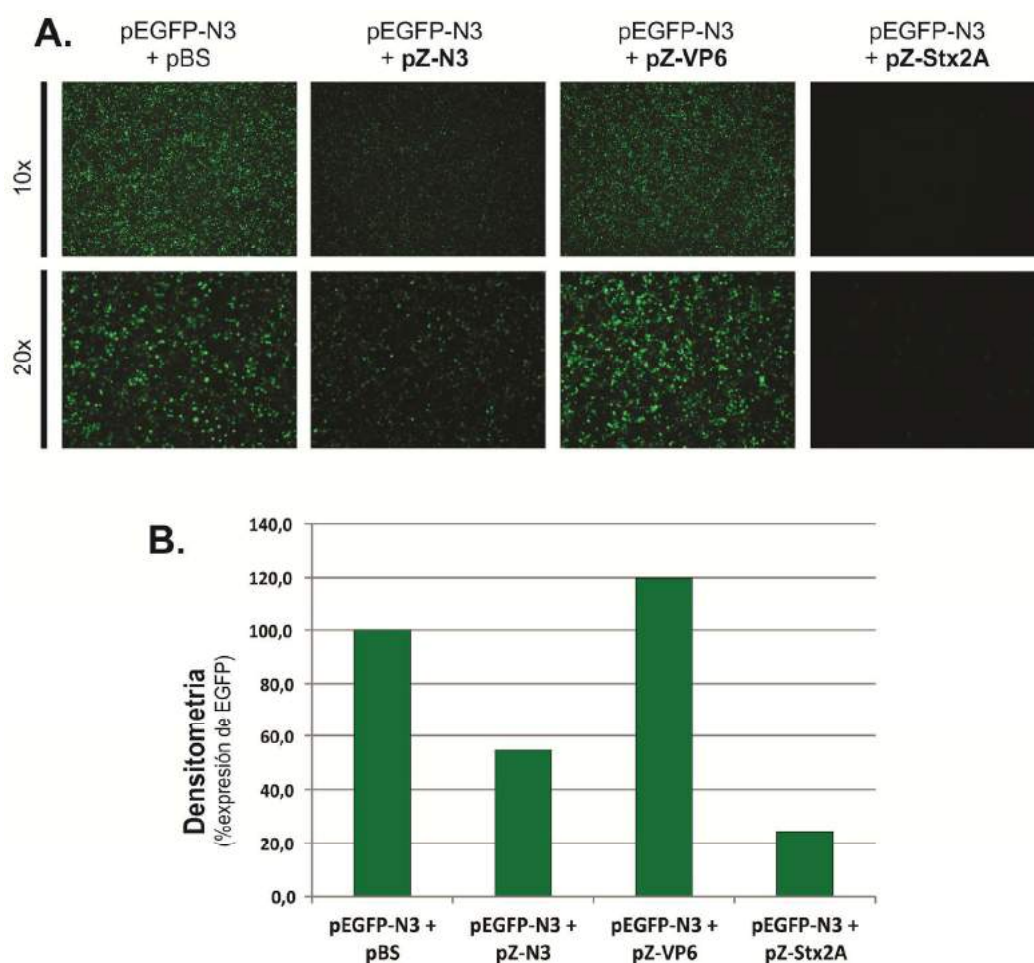


Figura 10.6 Ensayo de inhibición de la fluorescencia para pZ-VP6 y pZ-Stx2A. **A.** Monocapas de células 293T co-transfectadas con los vectores pEGFP-N3 y pBS (pBlueScript), pZ-N3, pZ-VP6 y pZ-Stx2A, en relación 1:1. Las imágenes fueron obtenidas 48 hs post-transfección en los aumentos 10x y 20x. **B.** Densitometrias de las imágenes de fluorescencia, donde las unidades arbitrarias de fluorescencia, expresadas como %expresión de EGFP, son relativizadas al control positivo de transfección pEGFP-N3 + PBS.

Expresión de Z-CD4 y Z-CD4-EGFP en células 293T

Debido a que no fue posible detectar la expresión de Z-VP6 mediante *western blot* en la fracción celular, ni obtener VLPs a partir de esta construcción, se seleccionó un dominio altamente inmunogénico, el dominio C-terminal de VP6 denominado CD4 (Choi *et al.*, 2000). Este dominio fue fusionado al extremo C-terminal de la proteína Z (pZ-CD4). Además de esta construcción, se realizó otra conteniendo una fusión del epítopo CD4 entre el extremo C-terminal de la proteína Z y el N-terminal de EGFP (pZ-

CD4-EGFP). La misma fue realizada para poder visualizar la expresión de la proteína de fusión mediante fluorescencia.

A partir de los ensayos realizados, no fue posible detectar señal en la fracción celular de 293T transfectadas con pZ-CD4 mediante *western blot*. Por otra parte, si fue posible detectar a Z-CD4-EGFP mediante la inmunodetección y por microscopía de fluorescencia, aunque se observó una menor intensidad de la señal en comparación con pZ-EGFP (figura 10.7). Esto se observa a partir la diferencia entre los tiempos de exposición durante la captura de las imágenes que se muestran en la figura 10.7.

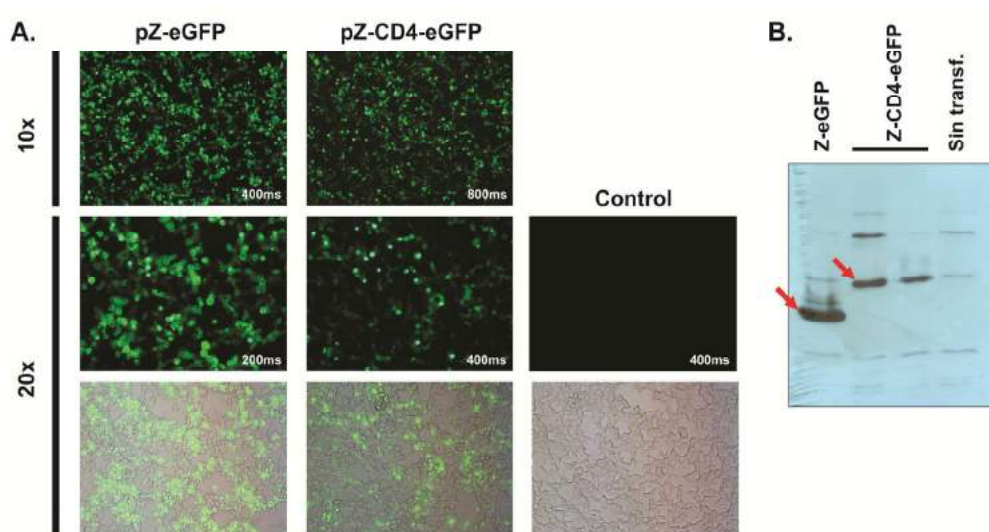


Figura 10.7. A. Microscopía de fluorescencia de células 293T transfectadas con pZ-CD4-EGFP y pZ-EGFP (aumento 10x y 20x). En números blancos se indica el tiempo de exposición durante la captura de la imagen (en milisegundos, ms). **B.** *Western blot* revelado con α -Z de las fracciones celulares de células 293T transfectadas con pZ-EGFP, pZ-CD4-EGFP y sin transfectar. Las flechas rojas señalan las bandas correspondientes a Z-EGFP y Z-CD4-EGFP.

Expresión de Z-Stx2A en células 293T

El segundo de los antígenos seleccionados para ser fusionado al extremo C-terminal de la proteína Z fue la porción A de la toxina Shiga (Stx2A). El plásmido recombinante generado se denominó pZ-Stx2A. Esta construcción fue transfectada en células 293T y se evaluó su expresión mediante *western blot*. En este caso tampoco se logró detectar a la proteína Z-Stx2A, y para evaluar la citotoxicidad de la proteína de fusión se realizó un ensayo de inhibición de la fluorescencia. Los resultados se muestran en la figura 10.6 junto con los resultados obtenidos para Z-VP6. En este caso la proteína

de fusión Z-Stx2A provocó la anulación casi total de la expresión de EGFP, incluso aún mayor que la observada para la proteína Z. Esto indicaría un alto nivel de citotoxicidad de Z-Stx2A, lo que podría explicar los indetectables niveles de expresión, explicando la razón de la ausencia de señal en el ensayo de inmunodetección.

DISCUSIÓN

Algunas características importantes para un sistema de vehiculización de antígenos son: que sea posible su generación de forma segura en un bajo nivel de bioseguridad, que sea capaz de presentar los antígenos vehiculizados y que las moléculas antigénicas que se desean presentar estén protegidas de la degradación. En este sentido, las VLPs derivadas de la proteína Z del virus Junín carecen de funciones replicativas características de los virus, por lo que no son infectivas, y pueden ser producidas en laboratorios de bajo nivel de bioseguridad. Además, las VLPs derivadas de Z son capaces de proteger al antígeno EGFP de la degradación en presencia de proteinasa K.

Con el fin de analizar la capacidad de presentación de antígenos de las VLPs derivadas de la expresión de Z-EGFP, se realizó un ensayo de inmunización de ratones Balb/C, y se detectó respuesta inmune humoral satisfactoria contra la proteína EGFP contenida dentro de las VLPs. Esta respuesta fue detectada luego del primer refuerzo, alcanzando un título máximo al día 35. Los otros grupos de ratones inmunizados con VLPs derivadas de Z-EGFP tratadas previamente con Tritón X-100, o inmunizados con una preparación de EGFP soluble, no evidenciaron una respuesta de IgG detectable por ELISA (**figura.10.3**). Estos resultados sugieren una mayor eficiencia de vehiculización y presentación del antígeno EGFP en asociación a las VLPs intactas. Existen numerosos reportes que destacan que la naturaleza particulada de las VLPs mejora la inmunogenicidad de las proteínas incluidas en las mismas (Bachmann & Jennings, 2010; Ramqvist *et al.*, 2007). Por lo mismo, no es sorprendente que las VLPs descritas en este trabajo hayan sido más inmunogénicas que el mismo antígeno soluble.

Las VLPs tradicionales, así como los agentes patógenos tienen superficies muy repetitivas y por lo general son capaces de inducir fuertes respuestas de anticuerpos, ya que pueden entrecruzar los receptores de las células B con una alta eficiencia (Bachmann *et al.*, 1993). Las vesículas generadas en este estudio muestran una diferencia importante con otros sistemas de VLPs, dado que en este caso, la proteína se encuentra contenida dentro de la vesícula, como se demostró a través del ensayo de protección a la proteasa (**figura 8.5**). Para obtener buenos niveles de producción de anticuerpos, las proteínas deben ser expuestas para que puedan ser reconocidas por las células B. En este caso, esto podría haber ocurrido por la ruptura parcial de la membrana de las VLPs, exponiendo el antígeno y estimulando de manera directa a las células B. Por otro lado, el tamaño promedio de las VLPs (50-100nm) permitiría el acceso de las mismas a los vasos linfáticos junto con su transporte directo a los

nódulos linfáticos (Bachmann & Jennings, 2010; Singh *et al.*, 2007). Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que el transporte de antígenos nativos asociado a células esté implicado en la activación de las células B. Este fenómeno, que consiste en la internalización y el reciclado del antígeno nativo a la superficie celular, ha sido descrito para los macrófagos asociados al seno subcapsular (Junt *et al.*, 2007; Szakal *et al.*, 1983), células dendríticas (Huang *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2006) y células dendríticas foliculares (Link *et al.*, 2012). Este mecanismo es de importancia en las células dendríticas, que tienen vías degradativas y no degradativas de captación de antígenos, lo que les permitiría estimular no sólo a las células T, sino también la presentación del antígeno a las células B *naïve*. Algunos autores han demostrado que este mecanismo depende de la interacción de complejos inmunes con receptores Fc inhibitorios (Bergtold *et al.*, 2005), pero una reciente publicación de Le Roux *et al.*, (2012) demuestra que las células dendríticas poseen la capacidad de regurgitar el antígeno sin procesar, lo cual permite plantear un mecanismo alternativo de activación de las células B.

Cualquiera de estas posibilidades o, una combinación de varias de ellas permitiría la inducción de una respuesta de anticuerpos contra EGFP, a pesar del hecho de que la proteína este contenida dentro de las VLPs. Resultados similares fueron obtenidos por Cubas *et al.* (2009) luego de la inmunización de ratones con VLPs de HIV (SIV Gag HIV + SF162 Env), ya que se observó una respuesta de anticuerpos tanto para la proteína de la envoltura externa (Env), como para la proteína interna Gag.

Si bien la respuesta inmunológica inducida contra EGFP requiere una caracterización adicional en cuanto a la cantidad de muestra, vía de inoculación, cronograma de inoculación, entre otras cosas, los resultados sugieren que este sistema puede ser utilizado como una plataforma para administrar antígenos heterólogos foráneos incluso quiméricos, que pueden inducir una respuesta de anticuerpos aún en ausencia de cualquier adyuvante exógeno.

Para evaluar el sistema de vehiculización propuesto utilizando otros antígenos se analizó la expresión de las versiones recombinantes Z-VP6, Z-CD4(VP6), Z-CD4(VP6)-EGFP y Z-Stx2A. En el caso de Z-VP6 no fue posible detectar la expresión de la misma en la fracción celular mediante *western blot*, sin embargo mediante inmunofluorescencia se evidenciaron bajos niveles de expresión en células 293T. Si bien esto podría ser consecuencia de la citotoxicidad de la proteína recombinante, el ensayo de interferencia sobre la expresión de EGFP demostró que Z-VP6 parece no afectar la expresión proteica, pero esto no elimina la posibilidad de que Z-VP6 sea tóxica para la célula, dado que estar afectando otros procesos celulares.

En cuanto a la construcción pZ-CD4, la cual posee el fragmento C-terminal de VP6 (CD4) fusionado a Z, tampoco fue posible evidenciar la expresión. Sin embargo, la construcción pZ-CD4-EGFP evidenció expresión medida mediante microscopía de fluorescencia. Esto fue confirmado por inmunodetección con anticuerpos α -Z (**figura 10.7 B**), aunque la banda correspondiente al peso molecular de Z-CD4-EGFP es coincidente con una banda de detección inespecífica (de menor intensidad) en el control de células sin transfectar. Este resultado deberá ser confirmado mediante la utilización de sueros α -EGFP y/o α -rotavirus.

Por último, se ensayó la expresión de la proteína recombinante Z-Stx2A la cual no pudo ser detectada mediante *western blot*. Nuevamente, esto podría ser consecuencia de la citotoxicidad de Z-Stx2A, tal cual lo indica el ensayo de interferencia de esta proteína sobre la expresión de EGFP. En este caso, Z-Stx2A interfiere casi completamente en la expresión del gen indicador. Esto no fue sorprendente, dado que la toxina Shiga naturalmente afecta al proceso de traducción celular durante la infección.

Los resultados obtenidos a partir de la expresión de las versiones recombinantes de Z junto a los antígenos de E.Coli (STEC) y Rotavirus, permiten concluir que la toxicidad de algunos péptidos puede interferir en la expresión y producción de VLPs, acotando las características de los mismos. Será necesario evaluar nuevos antígenos, de manera de detectar las características óptimas del antígeno para ser incluido en VLPs derivadas de la proteína Z del virus Junín.

En la actualidad estamos evaluando otros antígenos y la posibilidad de utilizar péptidos inmunogénicos cortos. Este proyecto está siendo llevado a cabo por varios grupos de investigación de Argentina, Brasil y Uruguay. Recientemente, en el trabajo de tesina de investigación de la Lic. Nadine Calvente se logró fusionar la proteína Z del virus Junín a la porción C-terminal de la proteína N del virus del Sarampión, junto con EGFP (pZ-Nct-EGFP) (Calvente, Tesina de licenciatura, 2013). En este trabajo se logró detectar la expresión y fue posible obtener VLPs derivadas de la misma. Además, en colaboración con otros grupos de investigación se está trabajando con la fusión de la proteína VP7 de rotavirus a Z, y de la Hemaglutinina del virus del Sarampión, dentro del marco de un proyecto de investigación conjunto.

Por otro lado, existe un proyecto de cooperación con el laboratorio de Virus Diarreicos (INTA Castelar), para evaluar las fusiones de la proteína VP8 de rotavirus equino y E2 del virus de la diarrea viral bovina a Z, para la expresión y producción de VLPs en células de insecto.

Los resultados obtenidos en este capítulo han permitido abrir una nueva línea de investigación que involucra la cooperación con el Departamento de Microbiología,

Inmunología e Parasitología de la Universidad Federal de Santa Catarina (Brasil) y la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (Uruguay), a través de un proyecto CABBIO, para la evaluación de antígenos virales del virus de la Hepatitis C, el virus Dengue y el parásito de la Malaria.

SECCIÓN VI

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el comienzo de este trabajo (capítulos 1 al 4) se realizó una reseña del estado del arte en el campo de los arenavirus, con el objetivo de contar con un compendio detallado y actualizado, el cual pueda ser consultado como referencia.

El análisis bioinformático de la secuencia de la proteína Z de los miembros de la familia *Arenaviridae*, abordado en el capítulo 5, mostró la alta conservación que existe en los dominios de miristoilación, el dominio RING, y los dominios tardíos asociados a la brotación. Por otro lado, se puede observar una secuencia altamente conservada entre los arenavirus del Nuevo Mundo ubicada al inicio del dominio RING, la cual no posee función asignada hasta el momento. Se pretende estudiar más adelante la función de esta secuencia, teniendo como referencia la estructura cristalográfica de Z, utilizando mutantes proteicos y analizando su actividad.

En el capítulo 6 se describieron los resultados de la expresión de variantes de la proteína Z en distintos sistemas celulares, bacterianos o de insecto. Se logró expresar y purificar de manera eficiente numerosas versiones recombinantes de la proteína Z, lo que permitió gran versatilidad en los estudios posteriores. Sin embargo, en bacterias, la expresión de Z sin el agregado de secuencias heterólogas no fue posible, probablemente debido a un efecto citotóxico. Además la obtención de anticuerpos anti-Z, como producto final de la puesta a punto de la expresión y purificación de Z, se convirtió en una herramienta vital para la realización de los estudios *in vitro* e *in vivo*. Los resultados detallados en este capítulo junto con los mencionados en el capítulo 5, resultaron en una publicación en la revista *Journal of Biomedicine and Biotechnology* en el año 2010.

La confirmación de la interacción de la proteína Z del virus Junín al factor eIF4E, descripta en el capítulo 7, derivó en una metodología eficiente para la purificación de Z nativa (sin el agregado de secuencias heterólogas). Por otro lado, se inició el desarrollo de un sistema de purificación general de proteínas, utilizando a Z como dominio de afinidad para su purificación. El diseño del sistema permite obtener las proteínas expresadas a partir del sobrenadante de cultivo de células de mamífero o de insecto, contenidas en las VLPs.

A futuro se planea realizar ensayos cuantitativos que permitan estimar la eficiencia del sistema, y evaluar su potencial a partir de diferentes tipos de muestras.

En el capítulo 8 se detalló el estudio de la evasión de la inmunidad celular, donde además de Z se analizó la potencial actividad de la proteína N del virus Junín, siendo esta última la que evidenció una actividad represora de la maquinaria de silenciamiento de ARN. Estos resultados si bien aún son preliminares, abren una nueva línea de estudio, que podría contribuir a dilucidar aspectos moleculares de la infección por Junín, junto con la posibilidad de hallar nuevos blancos antivirales. En este sentido, aún restan realizar ensayos de *Northern Blot* que permitan confirmar la disminución de los transcritos del gen silenciado y además ensayos similares a los descritos, pero utilizando variantes de N obtenidas por mutagénesis dirigida, para identificar los dominios involucrados en dicho mecanismo, o estudios de interacción de N con proteínas miembro de los complejos RISC y DICER.

La proteína de Z y su versión de fusión Z-EGFP fueron utilizadas para abordar aspectos básicos y aplicados. En particular, a partir de la quimera Z-EGFP, en el capítulo 9 se describió el estudio de la función de brotación de Z, en células de mamífero e insecto. Los resultados obtenidos en este apartado confirmaron la funcionalidad de Z en células de mamífero y se obtuvo evidencia que demuestra que la maquinaria celular de células insectos también es capaz de reconocer las señales presentes en la secuencia de Z y permitir la brotación de VLPs. Sin embargo, todavía es necesario reconfirmar los resultados obtenidos en células Sf9, ya que debemos descartar la posibilidad de que Z esté presente solamente dentro de los viriones baculovirales. Para ello, entre las perspectivas de este trabajo, se plantea la utilización de siARN contra el gen baculoviral *vp80*, el cual anula la brotación de baculovirus brotantes, sin alterar el resto del ciclo viral. Además, se realizarán mutantes de Z (en el dominio de miristoilación y en la secuencia PTAP) para evaluar su funcionalidad en células de insecto.

Por último en el capítulo 10 se describieron los estudios aplicados para generar una herramienta biotecnológica, basados en los resultados obtenidos sobre la brotación mediada por Z. Se demostró que a partir de la expresión de Z-EGFP en células 293T se obtuvieron, caracterizaron y purificaron VLPs quiméricas, capaces de inducir respuesta humoral en ratones inmunizados en ausencia de adyuvantes. Estos resultados permitieron el inicio del desarrollo de un sistema de vehiculización de antígenos, el cual se encuentra en evaluación con diferentes péptidos.

La información obtenida en este capítulo permitió la generación de una nueva línea de trabajo en nuestro laboratorio y, hasta el momento, resultó en una publicación en la

revista *BMC Biotechnology* en el año 2012. También tuvo como consecuencia la conformación de una red de laboratorios que colaboran alrededor de este desarrollo, y que está siendo financiada por varios instrumentos. En particular, estamos colaborando con el laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Nacional de Quilmes, con el Departamento de Microbiología, Inmunología e Parasitología de la Universidad Federal de Santa Catarina (Brasil), con la división virología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (Uruguay) y con el laboratorio de Virus Diarreicos (INTA Castelar), mediante financiamientos obtenidos de la Agencia Nacional de Promoción Científico y Tecnológica y del CABBIO.

En resumen, estos estudios permitirán evaluar la plataforma de vehiculización de antígenos en una variedad de sistemas y nos ofrecerán una muestra de su potencial. Si los resultados fueran auspiciosos, será necesario aún, resolver problemas de estandarización, producción y escalado para poner en marcha este sistema como producto biotecnológico.

SECCIÓN VII



MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo, se enumerarán las diferentes técnicas de biología celular y molecular y los insumos empleados a lo largo de todo el trabajo, haciendo principal hincapié en el desarrollo de los objetivos planteados al inicio de esta Tesis. De todas formas, es necesario destacar que en todos los casos se utilizaron reactivos químicos de grado de biología molecular.

Los procedimientos realizados con cultivos celulares eucariotas, se llevaron a cabo en flujos laminares NuAire Clase II A/B3 (Biological Safety Cabinets, Modelo UN-425-600E, EE.UU.), en una sala destinada especialmente para tal fin. Por otro lado, los cultivos bacterianos fueron procesados en un flujo laminar Telstar Clase II (Modelo AV-100, España). Las esterilizaciones de los diferentes reactivos e insumos fueron realizadas teniendo en cuenta las recomendaciones de los fabricantes. En general, la esterilización por calor húmedo fue realizada en autoclave SMI AVX 90.E (Francia) a 1 atmósfera de presión y 121 °C, mientras que la filtración se realizó con filtros de 0,22 µm microclar (MINI CLAR, Argentina). El agua destilada empleada en la preparación de diversos reactivos fue obtenida con el equipo FIGMAY F.M. 4 (Argentina), mientras que la desionización se realizó con EASypure RF (Thermo Scientific Barnstead, EE.UU.).

1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

1.1 Líneas celulares de Mamíferos

La línea celular 293T fue obtenida a partir de la transformación de células de riñón de embrión humano (HEK) con ADN de adenovirus tipo 5. Fue descrita por primera vez por [Graham et al., 1977](#). Esta variante contiene el antígeno mayor T de SV40 que permite una replicación episomal de alto número de copias de aquellos vectores que contengan un origen de replicación del virus SV40.

En este trabajo también se utilizó la línea celular BHK-21 (C-13) derivada de fibroblastos de riñón de hámster lactante ([Stoker & McPherson, 1961](#)), VERO E6 derivada de fibroblastos de riñón de mono verde africano *Cercopithecus Aegypticus*. ([Yasumura & kawakita 1963](#)) y COS-7 derivada de la línea celular de riñón de mono verde africano (CV-1), la cual fue transformada con un origen de replicación mutante de SV40 que codifica para el antígeno T de tipo salvaje ([Gluzman 1981](#)).

1.1.1 Mantenimiento de líneas celulares de mamíferos

El cultivo se realizó en frascos de poliestireno de 25 cm² y en poli cubetas de diferentes superficies (Sarstedt), con medio RPMI 1640 (AppliChem GmbH, Alemania), suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (Bioser, Argentina) y 1x de

antibióticos/antimicóticos (Invitrogen), incubando a 37 °C con 5 % de CO₂ (Sanyo MCO-17AIC, Sanyo Electric Co).

Los repiques celulares se efectuaron cuando el cultivo presentaba una cobertura de la superficie superior al 70 % de confluencia. Para esto, en los casos que fue necesario se empleó Trypsina 1x (stock 10x, PAA Laboratories GmbH, Alemania) para desprender las células de la superficie plástica, inactivando la misma mediante el agregado de medio con suero, y siendo luego diluidas en medio de cultivo fresco.

Durante el mantenimiento de las líneas celulares se realizaron pasajes con diluciones 1/4 en medio de cultivo fresco.

1.1.2 Transfección de células de mamífero

Monocapas celulares confluentes al 70% se lavaron con PBS y se transfectaron con el reactivo de transfección Polyfect (Qiagen) o GeneJuice (Merck) siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos el ADN fue purificado utilizando el kit de purificación de plásmido de Productos Bio-lógicos

1.1.3 Transducción de células de mamífero

Monocapas celulares confluentes al 70% se lavaron con PBS y se incubaron con el inóculo viral correspondiente a baculovirus brotantes durante una hora. Luego el inóculo es retirado y reemplazado por medio de cultivo suplementado con 10% suero fetal bovino.

1.2 Amplificación del virus Junín cepa Candid#1

El pasaje histórico de la cepa Candid#1 del virus Junín ha sido descrita previamente (Goni *et al.*, 2006) A partir de un stock de Candid#1 (gentilmente otorgado por V. Romanowski) se infectó un frasco de 75cm² de células BHK al 60% de confluencia en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 2mM de L-Glutamina. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ y se colectó el sobrenadante de cultivo al 6^{to} día (20 ml). Esta fracción se utilizó para infectar dos frascos de 175cm² de células BHK al 60%. Luego de la absorción viral (4 hs) se retiró el inóculo, se lavó con PBS y se agregó RPMI 10% SFB. El sobrenadante de cultivo fue colectado al 3^{er}, 5^{to} y 7^{mo} día (30-40ml) y se realizó una extracción de ARN a partir del sobrenadante y de las células al 7^{mo} día. Esto se realizó utilizando un kit de extracción de ARN (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

A partir de la extracción de ARN de ambas fracciones se realizó una síntesis de ADNc con el *primer* ARENA (Goñi *et al.*, 2010) y luego una RT-PCR anidada con los *primers* 1632S y 2095AS para la *primer* ronda, y 1656V y 2048C para la segunda, ambos sobre el ORF de la proteína N, en el fragmento S del genoma (figura M.1)

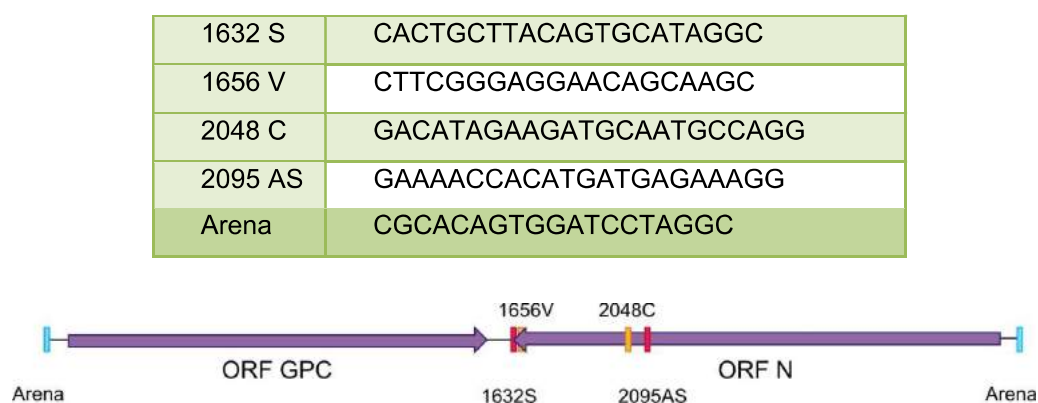


Figura M.1 Secuencia y esquema de los *primers* utilizados para la detección del fragmento S del genoma de Candid#1.

1.2.1 Titulación viral (Candid#1)

Para la titulación del stock de Candid#1 amplificado se utilizó un ensayo de lisis en células VERO E6 (Ghiringhelli *et al.*, 1991). En una multiplaca de 6 *wells* de células VERO al 60% confluencia se incubaron 500µl de sobrenadante de cultivo del 3^{er} y 5^{to} día en distintas diluciones, y se observó la presencia de placas de lisis celular al 7^{mo} día mediante tinción con azul de metileno (figura M.2).

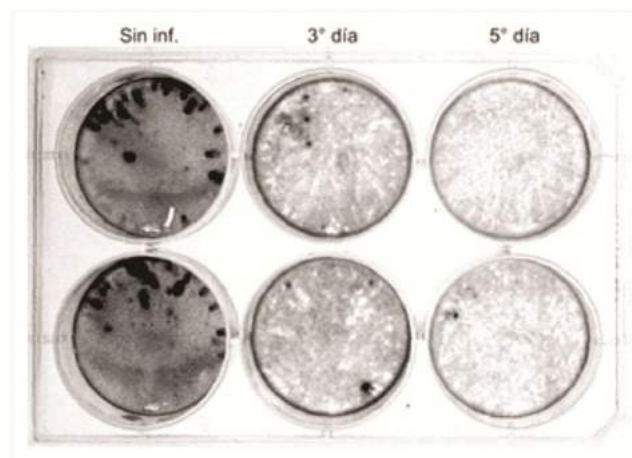


Figura M.2. Ensayo de titulación por placa con tinción de azul de metileno, utilizando el sobrenadante del 3er y 5to día posterior a la infección, y como control negativo células Vero sin infectar (Sin inf.).

1.2.2 Purificación de *Candid#1*

Utilizando los sobrenadante del 3^{er} y 5^{to} día, se clarificaron por centrifugación a baja velocidad (5000 rpm durante 15 min) y luego se sometieron a una ultracentrifugación en colchón de sacarosa 30%. El *pellet* obtenido se resuspendió en RPMI 10% Suero y se almacenó a -80°C.

1.3 Líneas celulares de insectos

Principalmente se utilizaron 2 líneas celulares: la primera Sf9, generada por [Smith, G.E. y Cherry, C.L. \(1983\)](#) a partir de la línea progenitora (parental) IPLBSF-21. Ésta fue obtenida a partir de tejido de ovario de pupas de la oruga militar tardía *Spodoptera frugiperda* ([Vaughn et al., 1977](#)). La segunda, High 5 (BTI-TN-5B1-4), también conocida como Tn5, la cual deriva de células de ovario de la oruga medidora del repollo, *Trichoplusia ni* ([Granados et al., 1994](#))

1.3.1 Mantenimiento de líneas celulares de insecto

El cultivo se realizó en frascos de poliestireno de 25 cm² y en poli cubetas de 10 cm² de superficie (Sarstedt), con medio Grace (Invitrogen), suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino (Bioser, Argentina) y 0,1 % de Gentamicina, a 27 °C (estufa MIR 5531, Sanyo)

Los repiques celulares se efectuaron cuando el cultivo presentaba una cobertura de la superficie superior al 70% de confluencia. Para tal fin, en caso de ser necesario se emplearon rastrillos de silicona para desprender las células de la superficie plástica, las cuales fueron luego diluidas en medio de cultivo fresco. Durante el mantenimiento de las líneas celulares se realizaron pasajes con diluciones $\frac{1}{4}$ en medio de cultivo fresco.

1.3.2 Baculovirus como sistema de expresión heterólogo

Los baculovirus infectan principalmente insectos, generalmente del orden Lepidóptera. Poseen un genoma de ADN doble cadena y circular con un tamaño que oscila entre 80 y 120kpb (Volkman, 1995). Durante el ciclo de infección presentan dos fenotipos: virus brotantes y viriones ocluidos. Estos últimos se caracterizan por estar incluidos en una matriz proteica y ser responsables de la permanencia del virus en el ambiente. Durante la etapa tardía de la infección, la proteína que constituye la matriz proteica (poliedrina o granulina) se produce en altas concentraciones. Mediante técnicas de ingeniería genética, ha sido posible generar baculovirus recombinantes que poseen genes foráneos bajo el control de los promotores tardíos y de muy alta expresión. Los niveles de las proteínas recombinantes alcanzados por este sistema superan a otros sistemas de expresión proteica, alcanzando entre el 25 y 50% de las proteínas producidas por la célula (O'Reilly *et al.*, 1992). Además, las proteínas expresadas de esta manera retienen muchas de las modificaciones post-traduccionales que se dan normalmente en células de mamífero, como lo son las miristoilaciones. Cabe recordar que esta modificación resulta crucial para la actividad de la proteína Z de LCM en células infectadas (Pérez *et al.*, 2004), por lo cual resulta de particular interés a los efectos de utilizar la proteína Z de virus Junín en ensayos de actividad específicos.

1.3.3 Bac-to-Bac (Obtención de baculovirus recombinantes Ac-ZEGFP)

El sistema Bac-to-Bac se basa en la transposición sitio específica de un *cassette* de expresión desde un vector plasmídico donador a un vector baculoviral (bácmido) que se propaga en *E. coli*. El bácmido contiene el replicón mini-F de bajo número de copias, un marcador de resistencia a kanamicina y un segmento de ADN que codifica para el péptido LacZ α . Luego de la región N-terminal del gen lacZ α hay un segmento corto que contiene el sitio de inserción para el transposón bacteriano Tn7 (mini-attTn7). El bácmido se propaga en *E. coli* DH10BAC como un mega plásmido que le confiere

resistencia a kanamicina y puede complementar la delección *lacZ* presente en el cromosoma para formar colonias azules (*lac*⁺) en presencia del sustrato cromogénico X-gal y el inductor IPTG. Los bácmidos recombinantes se generan mediante transposición del elemento mini-Tn7, desde el plásmido donador pFastBac al sitio de inserción miniattTn7 en el bácmido, en presencia de plásmido *helper*, el cual contiene la secuencia de la transposasa. El *cassette* que se va a transponer desde el vector donador contiene un promotor baculoviral específico, un gen de resistencia a gentamicina, un sitio de clonado múltiple y una señal de poliadenilación insertada entre los brazos derecho e izquierdo del Tn7. La transposición interrumpe el marco de lectura del péptido LacZ α permitiendo identificar aquellas bacterias que llevan bácmidos recombinantes mediante el desarrollo de colonias blancas. Luego este ADN recombinante es utilizado para transfectar células de insecto (ver **figura M.3**). El stock viral cosechado de las células transfectadas es utilizado para infectar nuevas células de insecto para la posterior expresión, purificación y análisis de proteínas.

En particular, en este trabajo se utilizó como plásmido donador al vector pFast BacDual. El mismo fue digerido con las enzimas XhoI y NotI con el objetivo de ligar el inserto obtenido de la digestión del vector ple1Z-EGFP con las mismas enzimas. Los clones fueron examinados por PCR, utilizando los primers D10 y JZvc, para detectar potenciales recombinantes. Para simplificar el análisis de un número muy grande de clones, se realizaron dos rondas de PCR, la primera sobre un conjunto de clones, y la definitiva sobre los clones individuales que estaban presentes en las mezclas que resultaron positivas. La integridad del ORF de interés en los plásmidos seleccionados fue determinada mediante secuenciamiento nucleotídico de ambas cadenas. Luego se continuó el procedimiento como se mencionó anteriormente.

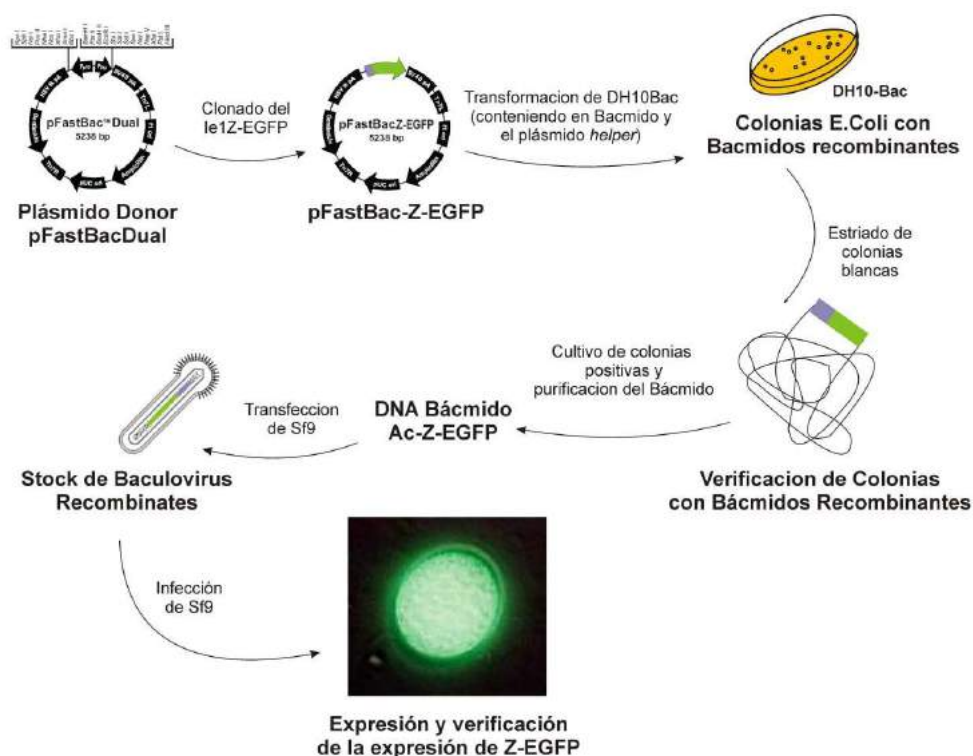


Figura M.3 Esquema de trabajo del sistema Bac-to-Bac. A partir del plásmido donador, en este estudio el vector pFastBacDual, se realizó el clonado de la secuencia correspondiente al promotor de *le1* seguido por la proteína Z-EGFP. Una vez obtenida la construcción es transfectada en *E.coli* DH10Bac, esta cepa contiene el báculo de AcMNPV y el plásmido *helper*, el cual codifica para la transposasa. Luego de la verificación de las colonias blancas obtenidas, se realiza una purificación del ADN del báculo recombinante, y se transfectan células Sf9. El sobrenadante de cultivo obtenido tendrá la primera progenie viral, la cual será amplificada en posteriores pasos de infección. Finalmente se confirma la expresión de Z-EGFP mediante microscopía de fluorescencia y *western blot*.

Una vez transfectadas las células de insecto con el vector pFastBac1ZEGFP con el reactivo de liposomas catiónicos Cellfectin (Invitrogen) según el protocolo sugerido por el fabricante, se recuperó el sobrenadante 120 hs post-transfección. Con el fin de obtener un stock viral de mayor título, y posteriormente ensayar la expresión de la proteína recombinante, el sobrenadante fue utilizado como inóculo para la infección de cultivos de células de insectos. De esta manera se obtuvo un título de 5.106 ufc/ml medido por la formación de placas fluorescentes (figura M.4)

1.3.4 Titulación por formación de placas

Para la titulación de los baculovirus, se realizaron diluciones seriadas del sobrenadante de cultivos celulares infectado, y con las cuales se infectaron nuevas monocapas celulares en placas *multiwell* de 6 o 12 pocillos, las cuales fueron cubiertas con agarosa de bajo punto de fusión (SeaPlaque) para impedir la difusión de los baculovirus brotantes. Luego de permitir el desarrollo de virus y la lisis celular (aproximadamente 6 días), las células fueron fijadas en PBS 4% de formaldehído y luego teñidas con azul de metileno, para realizar el conteo de las calvas resultantes y el cálculo del título viral.

1.3.5 Titulación por formación de placas fluorescentes

Realizando el mismo procedimiento descrito para la titulación por formación de placas, se incuban las células infectadas durante 48 hs, para su posterior observación al microscopio de fluorescencia invertido (**figura M.4**). Esta técnica permite hacer un seguimiento del proceso de infección, dado que no requiere la fijación de las células, y permite la obtención de resultados en tiempos menores a los mencionados previamente. El cálculo del título viral se realiza mediante la cuantificación de placas de fluorescencia, como las que se observan en la figura, teniendo en cuenta la dilución y el volumen de inóculo inicial.

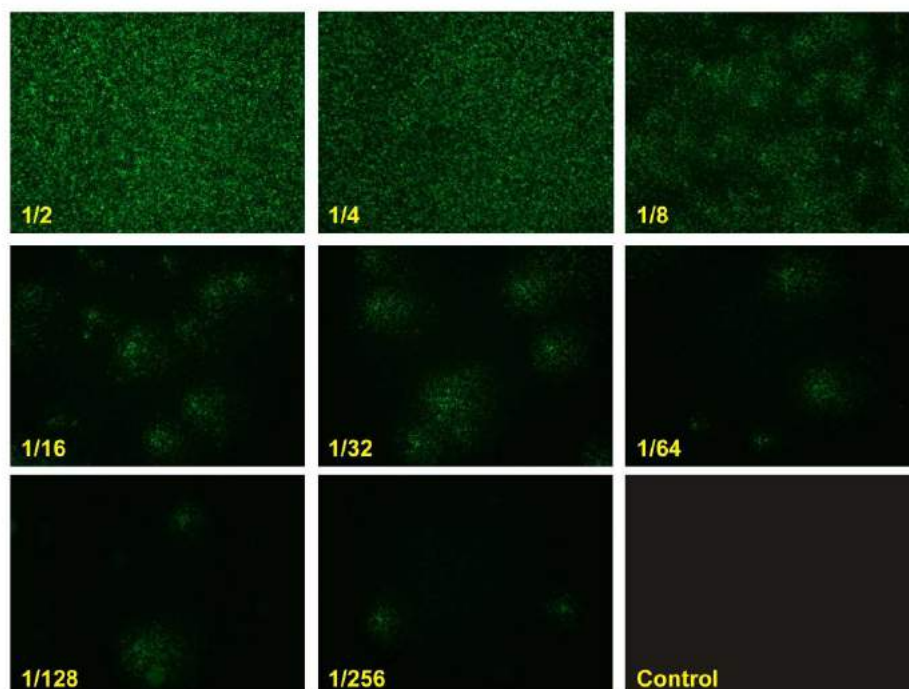


Figura M.4. Titulación de baculovirus brotante de Ac-ZEGFP. Microscopías de fluorescencia con un aumento de 4x de células Sf9 6 días post infección. Cada panel corresponde a la monocapa infectada con las diluciones del stock viral señaladas. El panel control corresponde a células Sf9 sin infectar.

1.4 Ultracentrifugación en colchón de sacarosa

Los sobrenadantes de las células previamente transfectadas/infectadas se colectaron y las monocapas fueron resuspendidas utilizando el reactivo de, en lisis celular en *ProteoJET* (Fermentas). Los sobrenadantes fueron clarificados por centrifugación a baja velocidad (3000 rpm) a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, las VLP presentes en los sobrenadantes fueron purificadas a través de una ultracentrifugación en colchón de sacarosa al 30% a 96.000 g durante 2 horas a 4 °C, en un rotor basculante rotor SW-28 (XL-70 Ultracentrifuge Beckman) Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en PBS para su posterior análisis.

Para la obtención de grandes cantidades de VLPs derivadas de Z-EGFP para la realización de los ensayos de estimulación de la respuesta inmune, se transfectaron 4 frascos de 75 cm² con el plásmido pZ-EGFP. Luego se recuperaron los sobrenadantes hasta el tercer pasaje celular, se colectaron en grupos para el primer paso de ultracentrifugación y luego se recuperaron los *pellets* en PBS, en una única muestra. Esta fue sometida a tratamiento con proteínasa K continuado de un segundo paso de ultracentrifugación, el cual permite concentrar la muestra y elimina la proteínasa K. El *pellet* fue resuspendido en PBS, y se utilizó para inmunizar los ratones.

1.5 Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa

Para la separación de partículas presentes en el sobrenadante de cultivo mediante su coeficiente de sedimentación se utiliza un gradiente discontinuo de sacarosa. Para esto el sobrenadante de cultivo es tratado tal como fue descrito para la ultracentrifugación en colchón de sacarosa. Una vez realizado este procedimiento el pellet obtenido es resuspendido en 500 µl de PBS y depositado sobre un gradiente de sacarosa 25%-60%, realizado previamente. Para la realización de este último se utilizaron tubos de polipropileno (Beckman) en los cuales se depositaron consecutivamente 1,5 ml de cada solución de sacarosa (Sacarosa 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%) y se dejó reposar el gradiente durante 3 hs a temperatura ambiente previo a ser utilizado. La ultracentrifugación del gradiente se realizó a 96.000 g durante 2 horas a 4 °C, en un rotor basculante SW-28 (XL-70 Ultracentrifuge

Beckman). La recolección de las fracciones se realizó mediante la perforación de la base del tubo utilizado, colectando por goteo fracciones de 250 µl.

1.6 Ensayo de protección a proteasa

Las muestras obtenidas del *pellet* de la ultracentrifugación del sobrenadante clarificado de la transfección de células 293T con pZ-EGFP fueron tratadas con 0.1 µg; 0.05 µg; 0.01 µg de proteinasa K (Fermentas) o proteinasa K suplementada con 1% Tritón X-100 durante 30 min a 37°C. Luego de la incubación, la reacción fue detenida con 100 mM de PMSF e incubadas a 100°C durante 10 minutos. Estas muestras fueron analizadas por SDS-PAGE, seguido por *western blot* utilizando las IgGs α-Z.

1.7 Citometría de flujo

Se realizó una dilución en BD FACS Flow 1/50 de las VLPs purificadas y se analizó mediante citometría de flujo (Beckton–Dickenson FACSCalibur). La información original, de 50.000 eventos, fue adquirida utilizando CellQuest (Beckton–Dickenson) y procesada con WinMidi (Joseph Trotter, Scripps Research Institute). Los parámetros FSCH (*forward light scatter*, representa el tamaño de las partículas) y SSCH (*side light scatter*, representa los detalles interiores de las partículas) fueron determinados durante el ensayo. La longitud de onda del filtro FL1-H fue 530 ± 15 nm.

2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2.1 Electroforesis de ácidos nucleicos

Para el análisis de ácidos nucleicos en diferentes experimentos, se realizaron electroforesis en geles de agarosa, con *buffer* TAE 1x (Tris base 0,04 M, Ácido Acético Glacial 1,14 ml/l solución; EDTA pH 8, 1 mM). Teniendo en cuenta el tamaño de los fragmentos de ADN a separar, se seleccionó el porcentaje deseado para confeccionar el gel de agarosa y los patrones de peso molecular (Productos Bio-lógicos) óptimos para cada condición. El método de tinción de ácidos nucleicos utilizado fue el de bromuro de etidio (Sigma, stock 20000 X, 10 mg/ml) y revelado por exposición a luz UV.

Para el caso de geles de agarosa para la visualización de ARN, las corridas se realizaron en las mismas condiciones mencionadas previamente, teniendo la precaución de utilizar soluciones estériles y materiales lavados previamente con SDS 1%.

2.2 Electroforesis de proteínas

Para el análisis de proteínas se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida 10, 12, 16 y 18% utilizando el sistema de *buffer* Tris-glicina en el equipo vertical Miniprotean III de BIO-RAD. Las muestras se sembraron utilizando el *buffer* de siembra 4X (azul de bromofenol 0,4 %, glicerol 40 %, SDS 8 %, DTT 400 mM, Tris pH 6,8 200 mM), realizando una incubación previa en presencia del *buffer* de 10 min a 90 °C. La corrida se realizó a 35mA por gel durante 30 min y la tinción de los geles se realizó con *Coomassie brilliant blue* R250 (Sigma). Todas las soluciones y reactivos se fueron preparadas según los protocolos descriptos (Sambrook *et al.*, 1989).

2.3 Extracciones plasmídicas

Las mini preparaciones se realizaron utilizando la técnica estándar de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Sin embargo, las preparaciones plasmídicas utilizadas para transfección de células eucariotas se realizaron utilizando el método de adsorción a matriz de sílica (Kit de extracción de plásmido, Productos Bio-lógicos). La calidad y rendimiento de las mismas fueron verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa y visualizadas por tinción con bromuro de etidio. En los casos de recuperación de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el método de adsorción a matriz de sílica (Geneclean, Productos Bio-lógicos), y para la utilización de productos de PCR purificados durante las etapas de clonado, se utilizó el kit de Clean-Up de Productos Bio-lógicos.

2.4 Extracciones plasmídicas a gran escala

A partir cultivos de 50 ml de medio TB (0,1 partes de TB II) en erlenmeyers de 100ml con ampicilina 1x (50 mg/ml, 1000x), inoculados con un cultivo en fase exponencial en 20% de glicerol a -80°C, se incubó a 200 rpm a 37°C durante toda la noche. Se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se agregan 10 ml de solución isotónica de lavado (Solución I de miniprep, Sambrook *et al.* 1989). Se resuspende por agitación suave, se agregan 10 ml de solución de ruptura celular (solución II de miniprep) se mezcla por inversión y se incubó 5min. a temperatura ambiente. A continuación se agregan 10ml de Solución III de miniprep y se mezcla por inversión. Se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se recupera el sobrenadante. Se agregan 0,5 volúmenes de cloroformo y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recupera la fase acuosa, se agrega 1 volumen de

isopropanol y se incubó 5 minutos a -80 °C. Se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos en el rotor JA-14 (Beckman J2-MCCentrifuge) a 4 °C se descarta el sobrenadante, se lava con 1ml de etanol 70% y se centrifuga a 16000 xg durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y se seca el precipitado. El mismo se resuspende en 200 µl de agua desionizada estéril (incubar 5 minutos a 50 °C), se agregan 10µl de RNasa A (50 mg/ml) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

2.5 Digestiones Enzimáticas

En todas las digestiones con enzimas de restricción (New England Biolabs, Fermentas, Promega) se utilizaron 8 U finales para incubaciones de 2 h, y 2 U finales para incubaciones durante toda la noche, utilizando los buffers óptimos para cada una de ellas. Las enzimas se inactivaron térmicamente en las condiciones recomendadas por el fabricante o se eliminaron mediante precipitación con Acetato de sodio. En el caso de digestiones dobles, y condiciones de reacción incompatibles, las reacciones se efectuaron en forma secuencial, realizando una precipitación alcohólica intermedia. Se llevó el volumen de la muestra a una concentración final de 0,1 M NaAc y 3 volúmenes de etanol absoluto, luego se incubó a -80 °C por 2 h. Se centrifugó a 14.000 rpm por 15 min y se retiró el sobrenadante.

En general, todas las digestiones fueron realizadas en un volumen final de 10 µl, e incubadas a 37 °C (o a la temperatura óptima para la enzima utilizada).

2.6 Ligaciones

Las ligaciones de los diferentes fragmentos a los vectores correspondientes fueron realizadas utilizando 1 U de ADN ligasa del bacteriófago T4 (GIBCO), e incubando durante 2 h a 22 °C, o durante toda la noche a 4 °C.

2.7 Electroporación y plaqueo

Se utilizó el equipo Gene Pulser II (BioRad), electroporando en cada caso 5 ng del producto ligado. En todas las ocasiones se emplearon alícuotas de 75 µl de bacterias electro competentes adecuadas según el plásmido utilizado y siguiendo protocolos estándar. Las bacterias transformadas fueron incubadas a 37 °C durante 1 h en medio LB líquido (5 g extracto de levadura; 10 g de triptona, 10 g de NaCl; llevar a 1 l) sin antibiótico. Posteriormente se sembraron en placas de Petri con LB sólido (agregado de 15 g de agar por l de LB líquido) y el antibiótico correspondiente.

Además, en el caso de que el sistema utilizado permita utilizar el ensayo de α -complementación es posible discriminar entre los clones transformados con plásmidos

sin inserto (α -complementación positiva) de los clones transformados con plásmidos que contienen un inserto foráneo (α -complementación negativa). Para ello, el medio de cultivo se adicionó con el inductor IPTG (Isopropil-tio- α -D-galactósido) y con el reactivo cromogénico, X-gal (5-Br-4-Cl-3-indolil- α -D-galactósido). Así, a las cajas de Petri ya preparadas conteniendo LB sólido con el antibiótico adecuado, se les agregó 40 μ l de una solución de X-gal en dimetilformamida (20 mg/ml) y 4 μ l de una solución acuosa de IPTG (200 mg/ml).

2.8 Amplificación de ADN mediante PCR

Las amplificaciones de ADN utilizados en los pasos de clonado y confirmación de clones positivos se realizaron en un volumen total de 20 μ l, utilizando las siguientes concentraciones finales de los reactivos: 1,5 mM MgCl₂; 0,2mM dNTPs; 1 μ M de cada primer y 0,05 U totales de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq ADN polimerasa, Productos Bio-Lógicos).

En los distintos casos, se optimizaron las condiciones de reacción, modificando las concentraciones finales de Mg⁺², dNTPs y de oligonucleótidos. Por otro lado, también se modificó la temperatura de hibridación de los *primers*, así como los tiempos de los distintos pasos del ciclado, utilizando como regla general 35 ciclos por reacción.

2.9 Primers

Los primers utilizados para las estrategias de clonado y confirmación de los mismos se encuentran listados en la **tabla M.1**.

Nombre	Secuencia de 5' a 3'	Descripción
JZv (invitrogen)	ATGGGCAACTGCAACGGGGCATC	Extremo 5' del ORF Z. (Contiene el codón de inicio)
JZvc (invitrogen)	TGGTGGTGGTGGTGTGGCTCCAC	Extremo 3' del ORF Z
JZvc-Stop (invitrogen)	CTATGGTGGTGGTGGTGTGGCTCCAC	Extremo 3' del ORF Z. (Contiene el codón de terminación)
pGEX-Fw (Genbiotech)	AACGTATTGAAGCTATCCC	Extremo 3' del ORF GST
pGEX-Rev (Genbiotech)	GAGCTGCATGTGTCAGAG	Extremo 3' del MCS de pGEX
CMV Prom FW (Genbiotech)	ACAACTCCGCCCCATTGACG	Extremo 3' del promotor CMV
JZv-BgHind (Genbiotech)	<u>GGAAGATCTAAGCTT</u> ATGGGCAACTGCAAC GGGGCATC	BglII-HindIII
JZvc-Stop-XhBmH (Genbiotech)	<u>CGCGGATCCCTCGAG</u> CTATGGTGGTGGTG CTGTTGGCTCCAC	XhoI- BamHI
Z-Stop-HindIII (Genbiotech)	<u>CCCCAAGCTT</u> CTATGGTGGTGGTG	HindIII
Stx2Fw (Genbiotech)	<u>CGCGGATCCGAGTTTACGATAGAC</u>	BamHI
Stx2Rev (Genbiotech)	<u>TAAAGCGGCCGCGCTTATTTACCCGTTG</u>	NotI
VP6Rev (Genbiotech)	<u>ATAGTTTAGCGGCCGCTCACTTTACCAG</u>	NotI
VP6Fw (Genbiotech)	<u>CGCGGATCCATGGATGTGCTGTACTCC</u>	BamHI
Fw-BamHICD4 (invitrogen)	<u>CGCGGATCCGAATCAGTTCTCGCGGATGCA</u> AGT	BamHI
RevBamHICD4 (invitrogen)	<u>CGCGGATCCCTTTACCAGCATGCTTCTAAT</u>	BamHI

Tabla M.1. Listado de *primers* utilizados en este estudio, expresadas en dirección 5' a 3'.

2.10 Selección de clones positivos: PCR de colonias

Utilizando palillos estériles se repicaron las colonias obtenidas luego de la transformación. Los clones repicados se analizaron en grupos de 5, en microtubos estériles de 0,5 ml, conteniendo 10 μ l de H₂O destilada. Las muestras fueron hervidas durante 10 minutos y luego centrifugadas a 16000 xg durante 5 minutos. La reacción de amplificación se realizó utilizando 1 μ l del sobrenadante como molde en 10 μ l de volumen final de mezcla de reacción, empleando pares de *primers* que permitan verificar el sitio de incorporación del inserto. Los grupos que presentaron el fragmento de interés fueron analizados individualmente en una segunda ronda de amplificación, permitiendo así seleccionar las colonias positivas individualmente. Estas fueron luego analizadas por restricción enzimática utilizando enzimas para la obtención de productos diferenciales entre los clones positivos y negativos.

2.11 Secuenciación

Para las reacciones de secuenciación se utilizó el servicio de secuenciación automatizada de Macrogen (Korea) utilizando *primers* universales del proveedor o *primers* específicos diseñados en nuestro laboratorio. Se utilizaron muestras de ADN ultra puro mediante precipitación con polietilenglicol 8000 (PEG 8000) o mediante la utilización de kits de extracción de plásmido comerciales, a una concentración final de 100 ng/ μ l.

2.12 Precipitación de ácidos nucleicos

Para la concentración de ácidos nucleicos se utilizó el protocolo de precipitación con etanol en presencia de sales. En este caso, se utilizó una solución de acetato de sodio 3 M pH 5,3. A partir de un volumen de ácidos nucleicos, se agregaron 2,5 volúmenes de etanol 96° junto con 0,1 volúmenes de la solución de acetato de sodio. Se incubó a -20°C durante 20 min, y se centrifugo a máxima velocidad durante 20 min a 4°C. Luego se realizó un lavado con etanol 70% y se resuspendió el *pellet* en el volumen de agua deseado.

2.13 Cuantificación de ácidos nucleicos

Se utilizó el kit comercial *Quant-it DNA Assay* (Invitrogen) junto con fluorometro Qubit (Invitrogen) según las especificaciones del fabricante, utilizando un volumen de

muestra variable entre 2-10 μ l. Además en algunas ocasiones se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo)

3. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN *E. COLI*

La expresión de la proteína recombinante en un huésped bacteriano como *E. coli* resulta de gran utilidad, debido a la practicidad de manipulación de la misma, y a los bajos costos de producción que ofrece. Si bien, las proteínas expresadas no sufren las modificaciones postraduccionales que recibirían en un huésped eucariota, el producto obtenido es utilizable en la producción de anticuerpos, ya sea contra epítopes secuenciales o epítopes conformacionales que no involucren residuos glicosilados o con otro tipo de modificación post-traducciona.

Es importante señalar que la expresión de las proteínas mencionadas en esta sección fueron obtenidas a partir de las construcciones plasmídicas realizadas por el Lic. Fabián Cherrñac durante su seminario de Investigación en el año 2006. La optimización de las condiciones de expresión de las mismas fue realizada durante el seminario de investigación de la Lic. Cristina Borio, por lo que en este trabajo se mencionaran las metodologías correspondientes a los métodos seleccionados como óptimos para cada proteína.

3.1 Expresión de Tio-Z-V5-His

Para la proteína de fusión Tio-Z-V5, el mejor nivel de expresión se obtuvo con la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (*New England Biolabs Inc.*). Las células transformadas se cultivaron en 500 ml de medio LB conteniendo 100 μ g/ml de ampicilina, a 37 ° C y 220 rpm. Cuando la absorbancia de cultivo a 600 nm alcanzó un valor de 1,5, las células fueron inducidas con 600 mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 4 horas a 37 ° C. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 4000 g durante 15 min, y se resuspendieron en 25 ml de *buffer* 50 mM de NaH₂PO₄ pH 8,2; 300 mM de NaCl; 20 mM imidazol; 1% de Tritón X-100 y complementado con un *coctel* de inhibidores de proteasas (Roche). Las células se rompieron mediante dos pasajes por Emulsiflex-C5 homogenizer (Avestin) y luego de una centrifugación a 20.000 xg durante 30 min, las fracciones soluble e insoluble se colectaron y analizaron por SDS-PAGE (el *buffer* de siembra 4X contiene 200 mM Tris-HCl, 8% de SDS, 40% de glicerol, 0,4% azul de bromofenol y 400 mM de DTT, pH 6,8). Los análisis mediante SDS-PAGE se realizaron de acuerdo a Laemmli (1970), utilizando porcentajes de acrilamida entre 12-15%, y posteriormente teñidos con azul de Coomassie R250. El

buffer de corrida de Tris-Glicina se preparó según (Maniatis, Fritsch, & Sambrook, 1982)

3.1.1. Purificación de Tío-Z-V5-His

La fracción soluble obtenida después de la inducción de pET-Z (25 ml) se clarificó por centrifugación a 12,000 xg durante 30 minutos y se cargó en una columna de Ni²⁺ inmovilizado de 5ml (His-Trap, Amersham), utilizando un *buffer* de corrida de NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8,2, NaCl 300 mM. Después de lavar la columna, se aplicó un gradiente de Imidazol desde 20mM a 500 mM, a un flujo de 1 ml / min durante 20 minutos, usando un FPLC AKTA (Amersham). Cada fracción recogida se analizó por SDS-PAGE y aquellas que contenían la proteína Tio-Z-V5-His se agruparon. Esta fracción se concentró a un volumen final de 1 ml (Vivaspin 15, 10000 MWCO, Sartorius). A continuación, la muestra fue sometida a gel filtración en una columna Superdex 200 10/300 GL (Amersham). En este caso el *buffer* de corrida utilizando fue de NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8,2, NaCl 300 mM, a un flujo de 0,5 ml/min. Nuevamente, las fracciones colectadas se analizaron por SDS-PAGE y aquellas que contenían a Tio-Z-V5-His se agruparon.

3.1.2. Proteólisis de Tio-Z-V5-His

Tio-Z-V5-His fue dializada contra el *buffer* de la enzima enteroquinasa (50 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM de CaCl₂; 0,1% de Tween-20) y luego se concentró la muestra a un volumen final de 1ml (Vivaspin 6 10.000 MWCO, Sartorius) con una concentración final de 0,3 mg / ml. Una fracción de 500 µl de esta muestra se sometió a proteólisis con enteroquinasa en un volumen final de 600 l durante 16 hs a 4 ° C. Después de esto, la muestra se cargó en una columna His-Trap (Amersham) de manera de separar ambos productos de la proteólisis. Se aplicó un gradiente de concentración de Imidazol desde 20mM hasta 500 mM durante 20 min y finalmente, las fracciones indicadas se analizaron por SDS-PAGE.

3.2 Expresión de GST-Z

Para la expresión de la proteína GST-Z se evaluaron diferentes cepas de *E. coli*: Rosetta pLys y B Origami (DE3) de Novagen, BL21 (DE3), BL21 (pLysS), BL21-CodonPlus (DE3) y RIPL XL1blue de Stratagene; BL21 SI de Invitrogen; OverExpress™ C41 (DE3) y C43 (DE3) de Lucigen. Las células fueron cultivadas en el

medio de cultivo Luria Bertani (LB) (Luria & Burrous 1957) y suplementado con el antibiótico adecuado cuando fue requerido (34 µg/ml de kanamicina, 100 µg/ml de ampicilina, 50 mg/ml de cloranfenicol, 12,5 mg/ml de tetraciclina). A partir de la transformación de bacterias con el plásmido pGEX-Z se obtuvieron niveles de expresión similares para las cepas estudiadas. Sin embargo, debido a una mayor proporción de proteína soluble, se seleccionó la cepa BL21 (DE3). Las células transformadas se cultivaron en 500 ml de medio LB suplementado con ZnSO₄ 100 mM y 100 µg/ml de ampicilina. Cuando el cultivo incubado a 37 °C alcanzó una densidad óptica de 600 nm de 0,7 las células fueron inducidas con 400 mM isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) y se cultivaron durante 16 hs a 20 °C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4.000 xg durante 15 min, y el sedimento se resuspendió en 25 ml de PBS, NaCl 200 mM, pH 8; Tritón X-100 0,1%, DTT 100 mM complementado con un coctel de inhibidores de proteasas (Roche). Las células se rompieron con *Emulsiflex-C5 homogenizer* (Avestin) y luego se centrifugaron a 20.000 xg durante 30 min; las fracciones soluble e insoluble se colectaron y se analizaron por SDS-PAGE.

3.2.1. Purificación de GST-Z.

La fracción soluble obtenida luego de la inducción de PGZ (25 ml) se clarificó por centrifugación a 12.000 xg durante 30 min, se resuspendió con 1 ml de *Glutathion Sepharosa 4B* (GE Healthcare), y se incubó a 4 °C durante 16hs. Después de cinco lavados con 50 ml de PBS, la muestra se eluyó con 2 ml de glutatión reducido 25 mM (Sigma) en Tris-HCl 50 mM, pH 9,5. La fracción eluida se dializó contra un *buffer* fosfato Na₂HPO₄ 20 mM, pH 7,2 a 4 °C durante 16 hs, se concentró hasta un volumen final de 1 ml (Vivaspin 2, 10.000 MWCO, Sartorius) y se cargó en una columna *Superdex 200* (Amersham) utilizando el mismo *buffer* anteriormente mencionado, a un flujo de 0,5 ml / min.

3.2.2 Proteólisis de GST-Z

La proteína GST-Z purificada se dializó contra el *buffer* de la proteasa Factor Xa (Tris-HCl 50mM pH 7,5; NaCl 150mM, CaCl₂ 1 mM) y 600 µl de esta muestra fueron sometidos a la proteólisis con el Factor Xa a temperatura ambiente durante 16 hs. El producto de reacción se analizó por SDS-PAGE y *western blot*.

3.3 Expresión de His-Z

El fragmento correspondiente al ORF de la proteína Z de la cepa MC2 se insertó en el vector pFastBac-HTA (Invitrogen) fusionado por su extremo N-terminal a una cola de histidinas (His-Z). El plásmido recombinante (pFast-Z) se utilizó para generar baculovirus recombinantes de AcMNPV que contengan en su genoma la secuencia para la expresión de la proteína His-Z. Mediante la transfección de células de insectos de *Spodoptera frugiperda* (SF9) (Granados *et al.*, 1994) utilizando liposomas catiónicos (Cellfectin, Invitrogen) se obtuvieron baculovirus recombinantes para His-Z (Ac-Z) recuperados del sobrenadante. Este stock viral es luego amplificado y titulado por ensayo en placa.

Para la infección de células Sf9 con el objetivo de producir la proteína recombinante se adiciona el virus a la MOI seleccionada previamente y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente, luego son lavadas con PBS y mantienen a 25 ° C. La expresión de la proteína de interés es luego analizada por SDS-PAGE y *western blot*.

Luego de la infección las células son crecidas en frascos de 25 cm² de poliestireno en medio de cultivo Grace (Invitrogen), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 0,1% de gentamicina.

3.4 Expresión de eIF4E

La proteína eIF4E fue expresada en *E. coli*, cepa BL21 (DE3) en el medio de cultivo M9ZB, el cual corresponde a medio LB complementado con Na₂HPO₄ 0.033M, KH₂PO₄ 0.022M, NaCl 0.085 M, NH₄Cl 0.02 M, MgSO₄ 0.002 M, (Hagedorn *et al.*, 1997) y Kanamicina. El cultivo fue crecido hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6-0,7, donde fue inducido con 0.4 mM de IPTG durante 4 hs a 37°C y 220 rpm. El medio de cultivo (500 ml) fue centrifugado a 500 xg durante 15 min. Y el pellet obtenido fue resuspendido en 25ml de solución de lisis (Tris 200 mM, pH 7,5, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, 0,1% Tritón e inhibidor de proteasas) y pasado dos veces por el homogenizador de alta presión Emulsiflex-C5 homogenizer (Avestin). Luego de esto se centrifugó la muestra a 10000 rpm en el rotor JA-14 (Beckman) durante 20 min. a 4°C. El sobrenadante obtenido, correspondiente a la fracción soluble, será el material de partida para la purificación de eIF4E. El pellet fue resuspendido en 25 ml de solución de lisis y analizado mediante SDS-PAGE.

3.4.1 Purificación de eIF4E

En el primer paso de purificación se utilizó la resina m7GTP *Sepharose* (Amersham). Los 25 ml de fracción soluble fueron cargados sobre una columna con 0,5 ml de resina a un flujo constante de 1,5 ml/min. Durante la corrida se utilizó el *buffer* de equilibrio (HEPES 20 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM, Glicerol 10% y KCL 100 mM) y la elución se realizó utilizando el *buffer* de equilibrio suplementado con 70 μ M GDP (Sigma). Las fracciones conteniendo eIF4E se juntaron y concentraron a un volumen final de 1 ml. El extracto obtenido se cargó en una columna Superdex 200 utilizando el *buffer* de equilibrio.

3.4.2 Pulldown eIF4E- GSTZ

Utilizando una fracción de la resina *glutathione Sepharose* 4B previamente unida a GST-Z, la cual fue incubada con 100 μ g de eIF4E previamente purificada durante 1h a temperatura ambiente con agitación. Luego se realizan tres lavados con PBS 1x, se resuspende la resina en *buffer* de siembra y se analiza la muestra mediante SDS-PAGE y *western blot*.

3.4.3 Armado de eIF4E Sepharose

Para la activación de la resina se tomaron 33,3 μ l de la misma (100 μ l de la misma resuspendida en isopropanol) y se lavó tres veces con 1ml de HCl 1M frío a 4 °C, durante 5 min cada vez. Luego se incubo la resina con 500 μ g de eIF4E previamente purificada durante 16 hs en agitación a 4°C, y se lavó tres veces con 1ml de agua, tres veces con 1ml de NaCl 1M, nuevamente tres veces con agua y por último, tres veces con 1ml de *buffer* de unión (PBS, o, 5M KCl, 1% NP-40).

3.4.4 Purificación de Tio-Z-V5-His con eIF4E Sepharose

Una vez obtenida la resina *Sepharose* unida a eIF4E se incubo la misma con 300 μ g de Tio-Z-V5-His, previamente purificada y concentrada, diluida en *buffer* de unión (PBS, 0,5M KCl, 1% NP-40). Luego se realizan tres lavados con *buffer* de unión y finalmente se resuspende la resina en *buffer* de siembra para su posterior análisis por SDS-PAGE.

3.5 Filtración en gel (*Gel filtration*)

Las columnas empaquetadas con 24 ml de volumen Superdex 200 GL y GL Superdex 75 se utilizaron para obtener la proteína interés en su forma monomérica. Las columnas fueron cargadas con 1 ml de muestra a un flujo constante de 0,5 ml/min utilizando un FPLC AKTA (Amersham). Para Tio-Z-V5-His, el *buffer* de corrida fue: NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300 mM, pH 8. Para la proteína recombinante GST-Z fue: Na₂HPO₄ 20mM, pH 7,2. Antes de cada separación, un marcador de peso molecular (Bio-Rad) se pasó por la columna con el *buffer* correspondiente. De manera que, correlacionando los datos de peso molecular y los ml de *buffer* eluidos, se obtiene una curva de calibración (figura M.5).

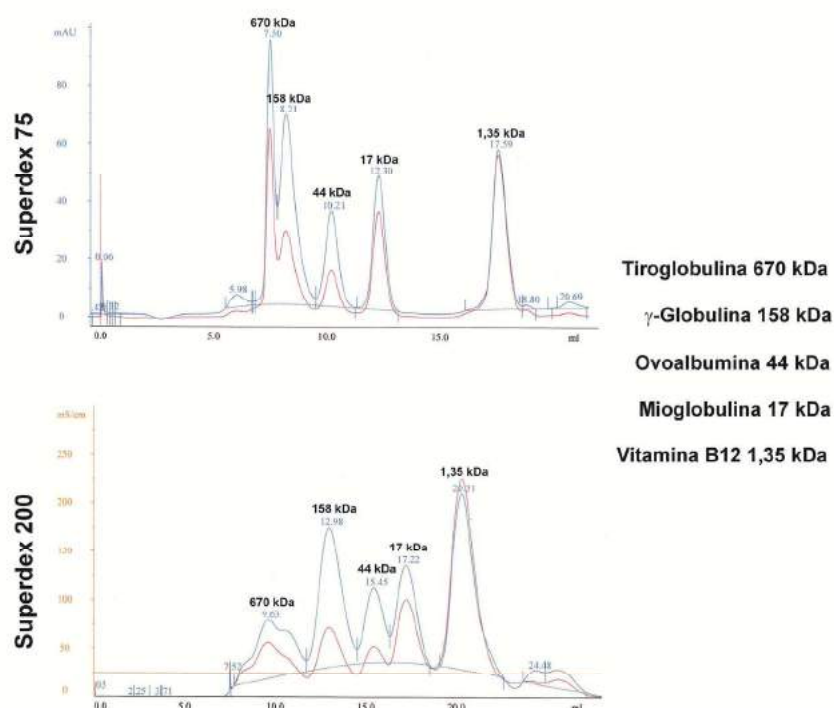


Figura M.5 Marcadores de peso molecular para gel filtración (Bio-Rad) utilizados para estimar el peso molecular con el volumen de elución, en ambas columnas, Superdex 200 y 75. Los valores de los distintos puntos de la curva de calibración son: 670 kDa, 158 kDa, 44 kDa, 17 kDa y 1,35 kDa.

3.6 Proteólisis limitada

Una serie de diluciones desde 1/10 hasta 1/10.000 de un stock de 0,1 mg/ml de quimiotripsina (Roche) y tripsina (Roche), se incubaron con GST-Z en una concentración de 0.5 μ g/ μ l durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción se

detuvo mediante la adición del *buffer* de siembra del SDS-PAGE o mediante la incubación de la reacción a -20 ° C.

3.7 Secuenciación del extremo N-terminal

Las muestras sometidas a la proteólisis limitada con quimotripsina fueron separadas por SDS-PAGE 15% y transferidas a una membrana de PVC (Amersham). La secuencia N-terminal de los péptidos relevantes se obtuvo utilizando un secuenciador Applied Biosystems ABI494.

3.8 Propiedades bioquímicas de las diferentes proteínas recombinantes.

Los parámetros bioquímicos se calcularon a partir de los datos de la secuencia de aminoácidos, utilizando la herramienta ProtParam del servidor de Proteómica ExPASy (www.expasy.ch, Proteómica, Análisis de estructura primaria (Gasteiger *et al.*, 2003).

3.9 Cuantificación de proteínas

Se utilizó el kit comercial *Quant-iT Protein Assay* (invitrogen) junto con fluorómetro Qubit (invitrogen), según las especificaciones del fabricante. Además se utilizó el método de Bradford, el cual consiste en una medición colorimétrica de la cantidad de proteína soluble. Para esto, se realiza una dilución 1/5 del reactivo de Bradford (Bio-Rad) y se filtra utilizando papel Whatman. En una poli cubeta de 96 pocillos se colocan 200 μ l del reactivo diluido, a los que se agregan 10 μ l de muestra. Luego de incubar 15 minutos a temperatura ambiente se procede a la medición de absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro *Thermo Max Microplate Reader*. Para que la medición pueda ser cuantitativa, la misma debe contrastarse con una curva de calibración. Esta es construida a partir de diluciones seriadas de un stock de una proteína patrón de concentración conocida, como por ejemplo albúmina bovina 1 mg/ml.

4. ENSAYOS Y MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

4.1 Purificación de IgG α -Tio-Z-V5-His

La producción del suero policlonal α -Tio-Z-V5-His-V5-His fue realizada por el Lic. Fabián Cheriñac en colaboración con el laboratorio de Inmunología y virología de la Universidad Nacional de Quilmes. A partir de esta preparación se realizó la purificación

de los anticuerpos del isotipo G mediante cromatografía de afinidad con proteína G (*ProteinG-Sepharose Fast Flow*, Amersham Pharmacia) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, utilizando los siguientes buffers: Fosfato 20 mM pH 7,0, Glicina 100 mM pH 2,7 y Tris-HCl pH 9,0. Para el monitoreo del perfil de elución se utilizó el ensayo de Bradford modificado para microplacas y la determinación de la concentración final de IgG obtenida se calculó utilizando una curva de calibración IgG bovinas.

4.2 Inmunización de ratones

Ratones Balb/C machos de 6 semanas (4 por grupo) fueron inmunizados por vía intramuscular con 5 µg de Z-EGFP contenida dentro de las VLPs en 100µl de PBS, en dos dosis con un intervalo de tres semanas. Como grupo control para el análisis de la integridad de las VLP, se inmunizaron ratones con 5µg de Z-EGFP dentro de las VLP previamente tratadas con 1% de Tritón X-100. Además se inmunizaron dos grupos control con 5 µg de proteína GFP soluble o con PBS. Se tomaron muestras de sangre los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35 para el análisis de la respuesta inmune, y finalmente los ratones fueron sacrificados el día 42. Los sueros obtenidos en cada DIA fueron almacenados a -20 ° C hasta su posterior uso.

4.3 Producción de suero policlonal α-GFP

Para la producción de suero poli clónales α-GFP se emplearon 3 ratones Balb/C macho de 6 semanas de edad. Antes de la primer inoculación (día 0), se extrajo una muestra de sangre (suero preinmune), luego se realizó la inmunización con 10 µg de proteína GFP purificada (gentilmente cedida por la Lic. Mirna Sanchez) en 100 µl de adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich & Co) y el día 21 se realizó un refuerzo de la misma. Las inoculaciones se realizaron por vía subcutánea en la región posterior del lomo del animal. Los días 7, 14, 21 y 35 se tomaron muestras de sangre para realizar el seguimiento de la respuesta humoral. Finalmente, en el día 42 post-inoculación, se realizó el sangrado mediante punción cardiaca. La sangre extraída fue centrifugada a 5000 g para separar el suero. Estos fueron conservados a -20 °C hasta su posterior análisis mediante la técnica de Enzimo-inmuno-ensayo.

4.4 Enzimo-inmuno Ensayo (EIE o ELISA)

Para llevar a cabo el análisis de los sueros extraídos se realizó un ensayo de EIE indirecto. Para ello, se sensibilizó una poli cubeta (*Greiner Bio-One, Microton*) de 96

pocillos con una solución de 10 µg/ml de la proteína Tio-Z-V5-His purificada en *buffer* Carbonato-Bicarbonato pH 9,0 (Na₂CO₃ 10 mM, NaHCO₃ 90 mM, NaCl 140 mM), para el análisis del suero α-Tio-Z-V5-His; y con una solución de 10 µg/ml de la proteína GFP en *buffer* Carbonato-Bicarbonato pH 9,0 para el análisis del suero α-GFP. Luego de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados con Solución de Lavado (*Buffer* PBS conteniendo 500 mM de NaCl y 0,2 % de Tween 20, pH 7,2) y se agregaron los sueros a evaluar diluidos en Solución de Dilución (Solución de Lavado con 1% de Albúmina de suero bovino -PBS-BSA 1 %-, pH 7,2). Se incubó durante 1 hora a 37°C, realizando 3 lavados al finalizar el tiempo. Luego se agregó la dilución correspondiente del conjugado comercial IgG de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo (para el suero α-Tio-Z-V5-His;) e IgG de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón, para el suero α-GFP. Ambos conjugados con peroxidasa (Santa Cruz *Biotechnologies*) en solución diluyente y se incubó durante 1 hora a 37°C. Luego de la etapa de lavado, se agregó a cada pocillo la solución de revelado (1 mg/ml O-fenilendiamina, OPD, en *buffer* citrato pH5, ácido cítrico 100 mM, Na₂HPO₄ 200 mM con el agregado de 1 µl de H₂O₂ 30% por cada mg de reactivo). Luego de incubar la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad, se detuvo mediante el agregado de una solución 2N de H₂SO₄ y se procedió a determinar la absorbancia a 490 nm en lector *Dimex Technologies MRXTC*.

4.5 Evaluación de la respuesta inmune humoral

Placas *multi-well* de 96 pocillos (Nunc, Maxisorpt Glostrup, Denmark) se recubrieron con 0,5 µg de GFP previamente purificada, durante 16hs a 4 °C. Luego de tres lavados con solución de lavado (PBS, 0,5 M NaCl, 0,2% de Tritón X-100), estas fueron bloqueadas con PBS con caseína al 1% a 37 °C durante 1 h. A continuación se lavaron las placas tres veces con solución de lavado y se adicionaron 50µl de los sueros obtenidos, diluidos 1/50 en *buffer* de lavado con caseína al 1%. Se incubaron a 37 °C durante 1 h y luego los anticuerpos unidos se detectaron utilizando IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa (Pierce) en *buffer* de muestra (dilución 1/2000) a 37 °C durante 1 h. Finalmente las placas se revelaron con orto-fenilendiamina (OPD, Sigma Chemicals Co.) y se midió absorbancia a 490 nm en un lector *Dimex Technologies MRXTC* (Huang *et al.*, 2005).

4.6 Inmunodetección (*Western blot*)

Para la realización del *western blot* las muestras a analizar se separaron por SDS-PAGE (12-15% en gel de poliacrilamida) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond P+, Amersham Pharmacia) en *buffer* Tris-glicina conteniendo 20% (v/v) de metanol. Para evitar la unión no específica de los anticuerpos, las membranas fueron bloqueadas por incubación con leche descremada al 5% en PBS durante 16 hs horas a 4° C. Para la incubación de los anticuerpos primarios se utilizaron diluciones entre 1/500 y 1/1000 en leche al 2% en BPS a 37 °C durante 1 h. Luego, para la incubación del anticuerpo secundario se utilizaron anticuerpos comerciales α -conejo o α -ratón conjugados con peroxidasa (Santa Cruz, Biotechnology) en una dilución 1/10000 en PBS 0,1% de Tween-20 a 37 °C durante 1 h. Entre cada incubación, la membrana fue lavada tres veces con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para los ensayos de *Dot blot*, las muestras fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el equipo *Bio-Dot Microfiltration Apparatus* de Bio-Rad y tratadas utilizando los mismos métodos descriptos para el *Western blot*.

4.7 Immunogold

El *pellet* obtenido de la ultracentrifugación anteriormente mencionada fue resuspendido en PBS 4% paraformaldehído. Una gota de esta suspensión fue depositada sobre una grilla de *formvar*-carbón recubierta de níquel durante 1 min y luego lavada 6 veces con PBS. Las grillas fueron incubadas con PBS conteniendo 0,5% albúmina y 0,1% tween-20 durante 30 min., luego lavadas con PBS e incubadas con IgG anti-Z en una dilución 1/300 en PBS, 0,5% albúmina y 0,1% Tween durante 1 hora. Nuevamente se realizaron 6 lavados con PBS y finalmente se incubó la grilla con IgG de mono anti-conejo conjugado a partículas de oro coloidal de 12nm (invitrogen) en una dilución 1/20 en PBS 0,5% albúmina y 0,1% Tween. Nuevamente se lavaron las grillas con PBS, se fijaron con 2% glutaraldehído durante 10 min, se realizó una tinción negativa con acetato de uranilo y se examinaron las muestras por TEM.

5. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

5.1 Sequence Logos

La construcción de los *Sequence Logos* se realizó en el servidor online *WebLogo* (<http://weblogo.berkeley.edu>), utilizando como archivo de entrada el alineamiento aminoacídico de las secuencias de Z, utilizando el programa ClustalX. En la representación gráfica cada logotipo se construye a partir del apilamiento de caracteres en cada posición del alineamiento. La altura del carácter indica el grado de conservación en esa posición, mientras que la altura de cada carácter dentro del apilamiento corresponde a la frecuencia de cada residuo en una posición determinada. Debido a las características del *software*, y para evitar el sesgo hacia determinadas especies que se encuentran sobre representadas en el banco de datos de secuencias, se seleccionaron como máximo dos cepas de cada especie viral. Por otro lado, para obtener una representación más sensible, los *gaps* dentro de cada secuencia del alineamiento fueron considerados como un carácter. Todos los motivos señalados fueron denominados de acuerdo a las reglas de sintaxis del sitio Prosite (Hulo *et al.*, 2008). En la **tabla M.2** se listan los números de acceso de las secuencias aminoacídicas de la proteína Z utilizadas en el alineamiento múltiple.

Especie-Cepa Viral	Nº de acceso
Amapari Virus-BeAn70563	(ABY59841.1)
Cupixi Virus-BeAn119303	(ABY59842.1)
Guanarito Virus-CVH-961104	(AAT77691.1)
Guanarito Virus-VHF-3990	(AAT77689.1)
Junín Virus-MC2	(ABY59838.1)
Junín Virus-Candid#1	(AAU34182.1)
Machupo Virus-MARU-222688	(AAY27821.1)
Machupo Virus-9530537	(AAY27823.1)
Tacaribe Virus	(NP694847.1)
Latino Virus-MARU-10924	(AAY27824.1)
Oliveros Virus-3229	(ABY59840.1)
Pirital Virus-VAV488	(ABY59836.1)
Pirital Virus-1743	(AAT77682.1)
Allpahuayo Virus-CLHP2472	(ABY59833.1)
Pichinde Virus-AN3739	(YP138535.1)
Bear Canyon Virus-A0060209	(ABY59834.1)

Bear Canyon Virus-AVA0070039	(AAX99343.1)
Whitewater Arroyo Virus-AV9310135	(AAX99351.1)
Tamiami Virus-W10777	(AAX99348.1)
Lymphocytic choriomeningitis Virus-#13	(ABC96003.1)
Lymphocytic choriomeningitis Virus-MX	(CAA10342.1)
Lassa Virus-CSF	(AAO59514.1)
Lassa Virus-Joshia	(AAT49001.1)
Ippy Virus-DakAnB188	(YP516232.1)
Mobala Virus-Acar3080	(YP516228.1)
Mopeia Virus-AN20410	(YP170707.1)
Mopeia Virus-Mozambique	(ABC71136.1)
Lujo Virus	(YP002929492)
Morogoro Virus	(ACJ24975.1)

Tabla M.2. Lista de secuencias aminoacídicas de la proteína z utilizadas para el alineamiento múltiple. Las secuencias fueron obtenidas del *Genbank* utilizando el número de acceso indicado para cada secuencia. Las secuencias remarcadas en negrita del cuadro verde inferior corresponden a los miembros del Viejo Mundo, el resto de las secuencias pertenecen al grupo del Nuevo Mundo.

6. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

6.1 Microscopía de fluorescencia

La captura de imágenes se realizó a partir de células adherentes cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio estériles dentro de placas de 35mm a una confluencia del 30%. Luego de 48 hs de incubación (en el caso de células transfectadas), las mismas fueron fijadas con 4% de formaldehído en PBS durante 15 min a temperatura ambiente, y luego incubadas con solución de montaje con DAPI (Vector). Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal Olympus FV1000 FluoView con un aumento de 600x, y analizadas utilizando el software Olympus FluoView 2.0. Además, para la captura de imágenes de células vivas cultivadas en placas o multiplacas se utilizó el microscopio de fluorescencia invertido *Nikon TE2000 eclipse Inverted Microscope*.

6.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Una gota del *pellet* resuspendido, obtenido a partir de la ultracentrifugación del sobrenadante clarificado de la transfección de células 293T con pZ-EGFP fue depositada en una grilla de *formvar-carbón* recubierto de níquel durante 1 min. Se realizó una tinción negativa con 2% ácido fosfotungsténico y examinadas en TEM (Phillips EM 301 *electron microscope*).

6.3 Inmunofluorescencia

Células adherentes cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio estériles dentro de placas de 35mm a una confluencia del 30% fueron transfectadas. Luego de 48 hs post-transfección las mismas fueron lavadas con PBS 1x, fijadas con 4% de formaldehído en PBS durante 15 min a temperatura ambiente y lavadas nuevamente con PBS. Luego fueron incubadas durante 10 minutos con una solución de 0,5% NP40 en PBS, bloqueadas durante 60 minutos a 37°C con una solución de 5% BSA en PBS e incubadas otros 60 minutos a 37°C con un anticuerpo α -rotavirus marcado con fluoresceína (dilución 1/200). Por último se realizaron lavados con PBS y se realizó el montaje con una solución de DAPI (Vector). Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio Nikon Eclipse E200 con Lámpara Nikon C-SHG1, a un aumento de 100x.

6.4 Cuantificación mediante densitometría

Las densitometrías de las microscopias de fluorescencia fueron realizadas con el programa ImageJ. Las secciones cuantificadas fueron de igual tamaño en cada uno de los paneles del ensayo, tomando como blanco la imagen de fluorescencia de las muestras sin transfectar.

ANEXOS

VECTORES DE CLONADO Y EXPRESIÓN

pGEX-B y pGST-Z

Para la construcción de la proteína de fusión GST-Z se utilizó el vector comercial pGEX-B (GE Healthcare). El vector de expresión pGEX-B permite el clonado y fusión de un ORF de interés a la enzima Glutatión-S-transferasa (GST), bajo el control del promotor Ptac y el operador Lac (figura i.A). Esto último facilita la posterior purificación de la proteína recombinante mediante la utilización de una columna de glutatión inmovilizado. Además el vector codifica para el súper-represor lacIq, el cual bloquea la transcripción del gen clonado uniéndose al operador lac río abajo del promotor Ptac, lo que permite la inducción de la expresión mediante la adición de isopropil- β -Dtiogalactopiranosido (IPTG).

La obtención del vector pGST-Z se logró a partir de la digestión enzimática de pQZ (un vector secundario obtenido en el laboratorio) y pGEX-B. Esto fue realizado durante la tesina del Dr. Fabián Cherniac (2006) (figura i.B).

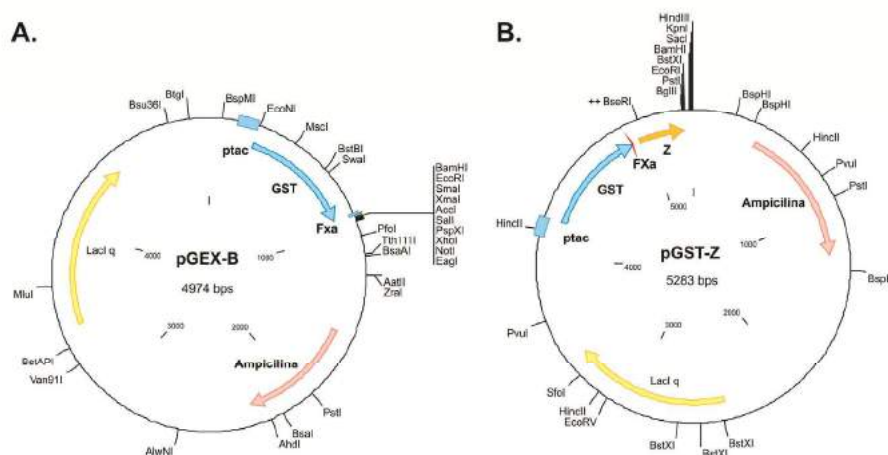


Figura i. A. Vector de expresión pGEX-B, para la expresión de proteínas recombinantes fusionadas a GST por su extremo N-terminal. **B.** Vector pGST-Z para la expresión de la proteína recombinante GST-Z.

pET102/D-TOPO® y pZ-Tio

El vector de expresión pET102/D-TOPO® (Invitrogen) permite el clonado, en un solo paso, de una secuencia de interés a partir del diseño de un juego de *primers* específicos mediante la tecnología TOPO. Esta metodología hace uso de un vector lineal que se circulariza sólo luego de la incorporación de un inserto. La reacción de

clonado en el vector pET102/D-TOPO es catalizada por la enzima Topoisomerasa, que está unida específicamente a un extremo del ADN doble cadena. Para facilitar su clonado dirigido, el inserto debe ser construido con el agregado de 4 nucleótidos en el extremo que se ligará con la Topoisomerasa. Para ello se utiliza un primer de amplificación específico para la región 5' del inserto que contenga en su extremo 5', los 4 nucleótidos extra. De esta manera, el inserto amplificado podrá complementar con los 4 nucleótidos que posee el vector y será ligado con gran eficiencia (figura ii.A).

El gen de interés se expresa bajo el control del promotor de la ARN polimerasa del fago T7, lo que hace necesario utilizar la cepa BL21 de *E. coli*, la cual codifica para la polimerasa viral del fago y permite la inducción de su expresión en presencia de IPTG. El producto proteico obtenido es la fusión entre la proteína de interés, la tiorredoxina en su extremo amino terminal y una cola de histidinas en el extremo carboxilo. Además, el polipéptido producido posee un sitio de corte por la proteasa específica Enterokinasa (EK) que permite separar la proteína completa de la Tiorredoxina, y el epítipo V5 en el extremo carboxilo el cual permite la identificación del producto recombinante mediante inmunoensayos (**figura ii.B**).

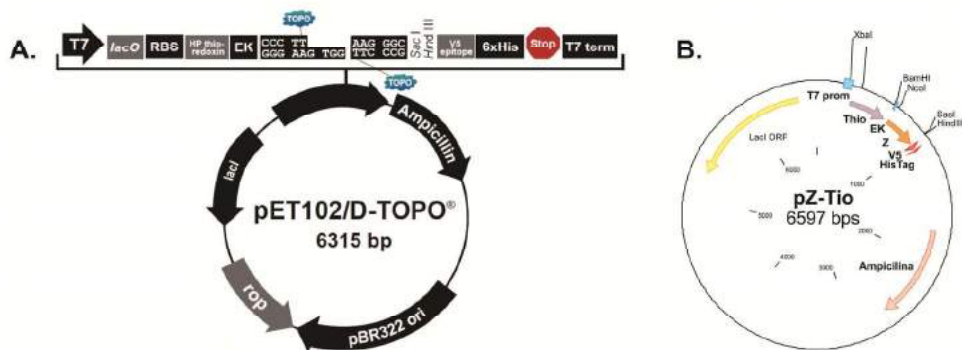


Figura ii. A. Vector de expresión pET102/D-TOPO, para la expresión de proteínas recombinantes fusionadas a Tiorredoxina por su extremo N-terminal. **B.** Vector pZ-Tio para la expresión de la proteína recombinante Tio-Z-V5-His.

pFastBac y pHis-Z

El vector pFastBac (invitrogen) fue utilizado para el clonado del ORF de la proteína Z para su expresión en células de insecto mediante la infección por baculovirus brotantes, mediante el sistema Bac-to-Bac (El sistema de expresión Bac-to-Bac fue previamente descrito en la sección de **materiales y métodos, 1.3.3 *Bac-to-Bac*** -

Obtención de baculovirus recombinantes Ac-ZEGFP). El clonado de Z en pFastBac fue realizado durante la tesina del Dr. Fabián Cherniac.

Los clonados de las versiones recombinantes de Z para la expresión en *E. coli* y en células de insecto se resumen en la **figura III**.

pET28a+ y pElF4E

Para la expresión del factor eIF4E se utilizó el vector de expresión pET28a+ (Novagen), el cual regula la expresión del gen de interés mediante el promotor del bacteriófago T7 y operador Lac. El pET28a+ posee dos *his-tag*, uno río arriba de la región para clonar el gen de interés, y otro río abajo (**figura iv.A**). Para el clonado de eIF4E se utilizaron enzimas de restricción (NdeI y NcoI) que permitieron la eliminación de ambas regiones y la inserción del ORF de eIF4E (670 pb). Este se extrajo del vector de clonado pUC57 conteniendo el ORF del factor de traducción, el cual fue sintetizado a partir del gen eIF4E humano (*GenBank* AAX36938) fue sintetizado y clonado en el vector pUC57 (GenScript Corp) (**figura iv.B**).

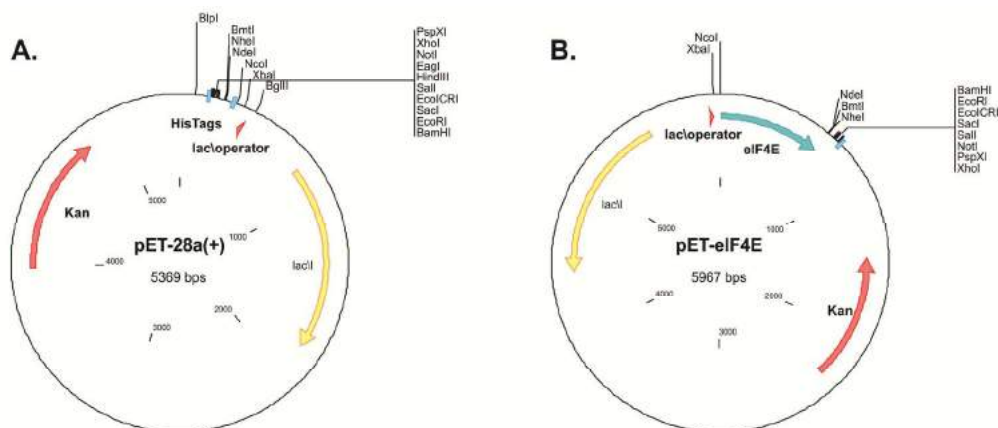


Figura iv. A. Vector de clonado y expresión pET-28a(+). B. Vector pET-eIF4E para la expresión del factor eIF4E sin el agregado de secuencias heterólogas.

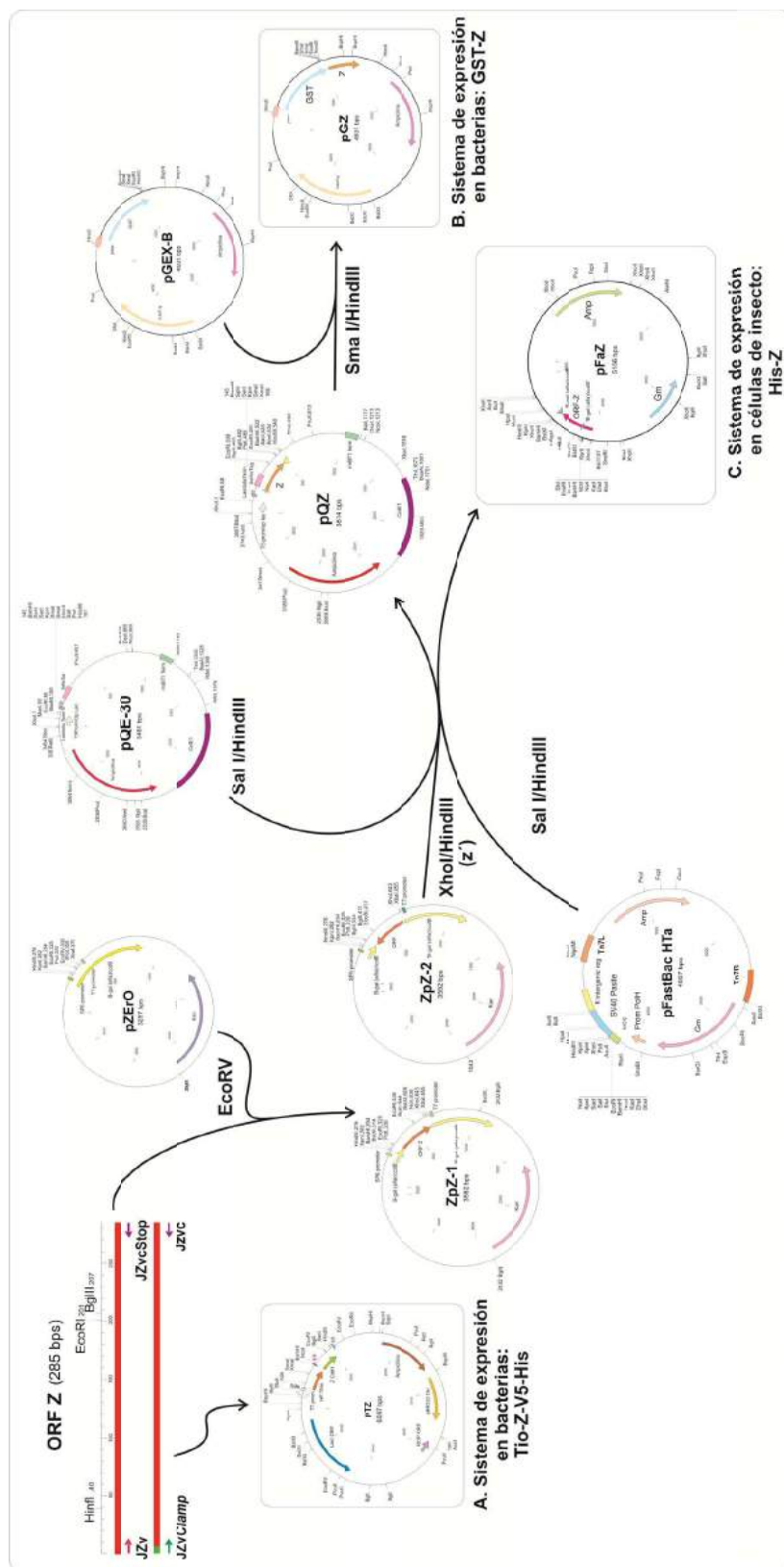


Figura iii. Resumen de los clonados de la proteína Z y sus versiones recombinantes para expresión en células procariotas y en células de insecto.

pEGFP-N3

El vector comercial pEGFP-N3 de Clontech es un vector de expresión para células de mamífero, el cual permite el clonado y fusión del extremo C-terminal de la proteína de interés, a la proteína EGFP (**figura v.A**). Esta última codifica una variante desplazada hacia el rojo de GFP *wild type* que ha sido optimizada para la obtención de una mayor fluorescencia y expresión en células de mamífero. (Máximo de excitación 488 nm; máximo de emisión 507 nm). Esta variante posee la sustitución del aminoácido Phe64 a Leu y de la Ser-65 a Thr. La secuencia de codificación de EGFP contiene más de 190 cambios de bases silenciosos que corresponden al uso de codones humano.

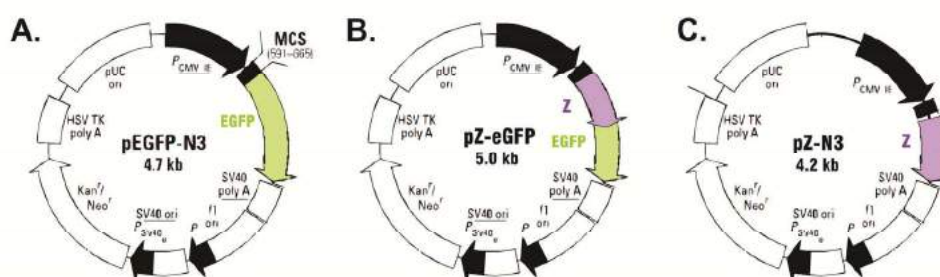


Figura v. A. Vector de expresión pEGFP-N3 (Clontech) para la expresión de proteínas fusionadas a EGFP a través de su extremo C-Terminal. **B.** Vector pZ-EGFP para la expresión de la proteína de fusión Z-EGFP. **C.** Vector pZ-N3 para la expresión de la proteína Z en células de mamífero.

El esqueleto de pEGFP-N3 fue utilizado por el Dr. Agustín Ure para la construcción del plásmido pZ-EGFP para la expresión de la proteína de fusión Z-EGFP del virus Junín, Cepa Candid#1 (**figura v.B**). También fue utilizado para la obtención del vector pZ-N3, el cual se construyó mediante la eliminación del ORF de EGFP mediante enzimas de restricción (HindIII y NotI) y la posterior adición del fragmento del ORF de Z, obtenido con *primers* específicos con el sitio de HindIII en uno de sus extremos (**figura v.C**).

Para las otras versiones recombinantes de Z se utilizó como vector base a pZ-EGFP, al cual se le extrajo la secuencia correspondiente a EGFP y fue reemplazada por fragmentos de PCR de los genes de interés (CD4, VP6, Stx2A), obtenidos con *primers* específicos con sitios de enzimas de restricción en sus extremos. En el caso de la construcción pZ-CD4-EGFP, el ORF de EGFP no fue removido, sino que fue interrumpido con el fragmento CD4 (**figura vi**).

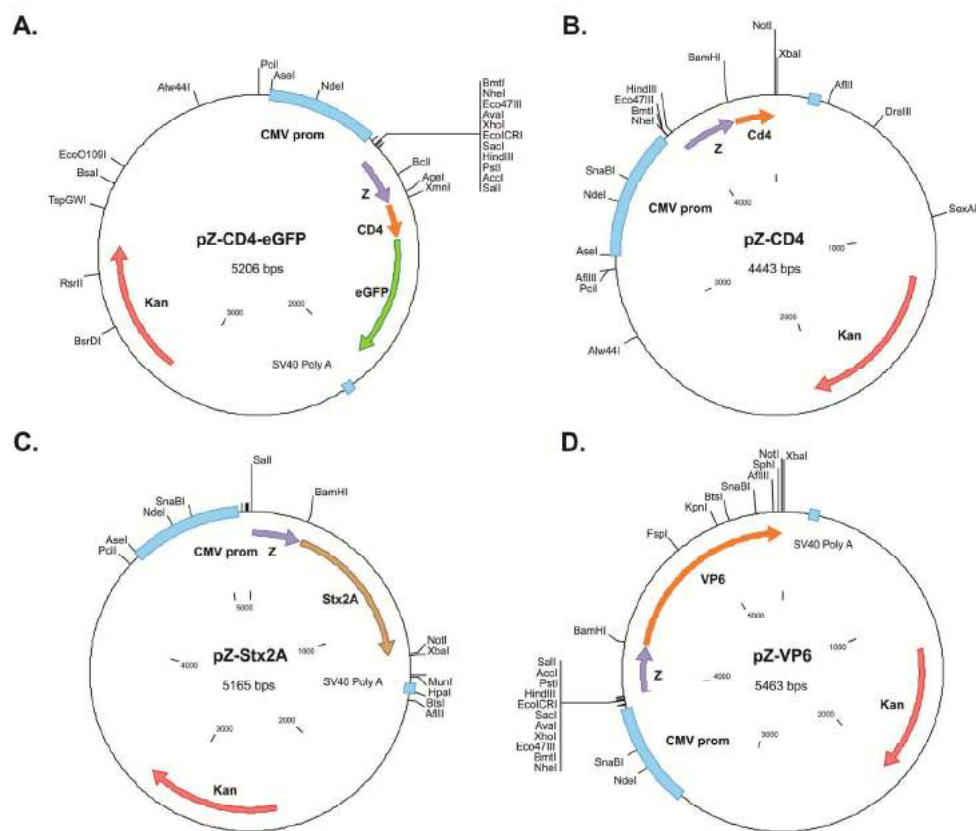


Figura vi. Vectores para la expresión de las versiones recombinantes de la proteína Z. **A.** pCD4-EGFP. **B.** pZ-CD4. **C.** pZ-Stx2A. **D.** pZ-VP6.

Las secuencias de VP6 y el fragmento CD4 fueron amplificadas a partir del vector pDonr221VP6EC, gentilmente cedido por el laboratorio de inmunología y virología de la Universidad Nacional de Quilmes. El fragmento Stx2A fue amplificado a partir del vector pGem-Stx, gentilmente cedido por la Dr. Leticia Bentancor, de la Academia de medicina.

Por último, las construcciones utilizadas en el sistema de expresión de células de insecto/baculovirus fueron obtenidas a partir del vector pZ-EGFP, el vector comercial pFastBacDual (Invitrogen) y el vector pUpLacDown, gentilmente cedido por el Dr. Marcos Bilen.

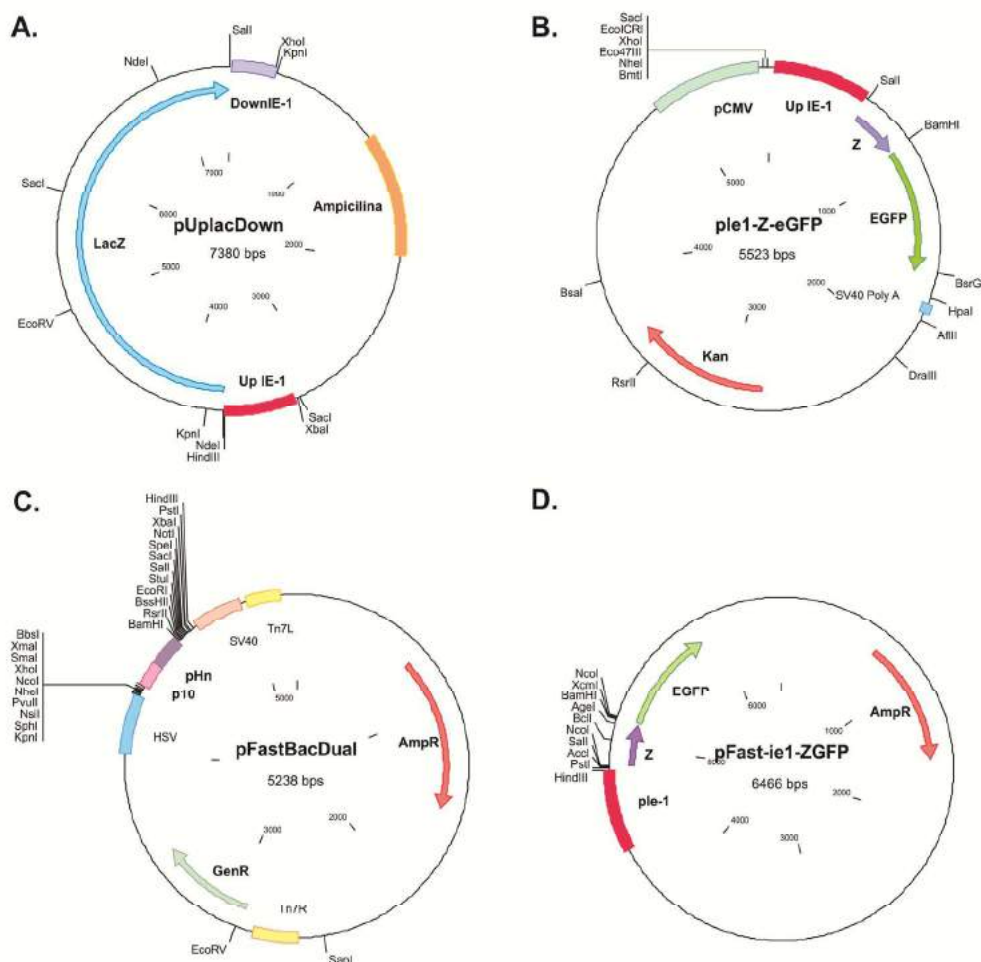


Figura vii. **A.** Vector pUplacDown conteniendo el gen LacZ flanqueado en sus extremos por los fragmentos Up IE1 y Down IE1 del promotor IE1. **B.** Vector ple1-Z-EGFP para la expresión de la proteína Z-EGFP regulada por la porción Up del promotor Ie1 y el promotor CMV. **C.** Vector comercial pFastBacDual (Invitrogen). **D.** Vector pFastBac-IE1-Z-EGFP para la expresión de la proteína Z-EGFP regulada por la porción Up del promotor Ie1 en células de insecto.

Para la expresión de Z-EGFP en células de insecto mediante transfección se adicionó al vector pZ-EGFP la secuencia de la región promotora del gen Ie1 del baculovirus *Anticarsia gemmatilis* río abajo del promotor CMV. El vector obtenido, ple1-Z-EGFP, fue utilizado para clonar la secuencia de Ie1-Z-EGFP en el vector comercial pFastBacDual, mediante enzimas de restricción (XhoI y NotI). La selección de estos sitios de restricción permitió la eliminación de los promotores de poliedrina y p10, propios del vector, para luego ser reemplazados por el fragmento Ie1-Z-EGFP.

Estudio de la función y actividad de la proteína Z del virus Junín

De esta manera la regulación de la expresión de Z-EGFP sería controlada exclusivamente por el promotor *le1*.

Los clonados de la secuencia codificante de la proteína Z del virus Junín y de sus respectivas versiones recombinantes se encuentran resumidos en la **figura ix**.

Por último, el resumen de todas las construcciones que contienen el ORF de Z (para ser expresada en sistemas procariota y eucariotas) se encuentran listadas en la **figura viii**, donde se incluye el peso molecular de cada una de las proteínas correspondientes.

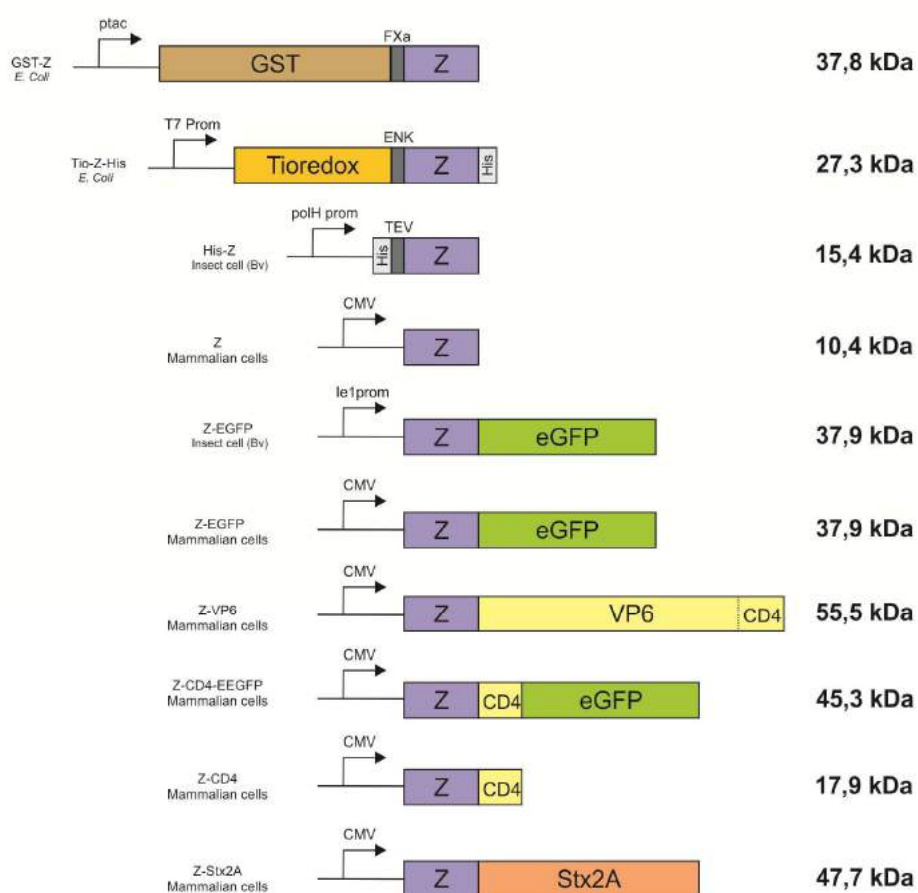


Figura viii. Resumen de las construcciones que contiene el ORF de la proteína Z, donde se indica el sistema de expresión correspondiente, el promotor que regula su expresión y el peso molecular estimado.

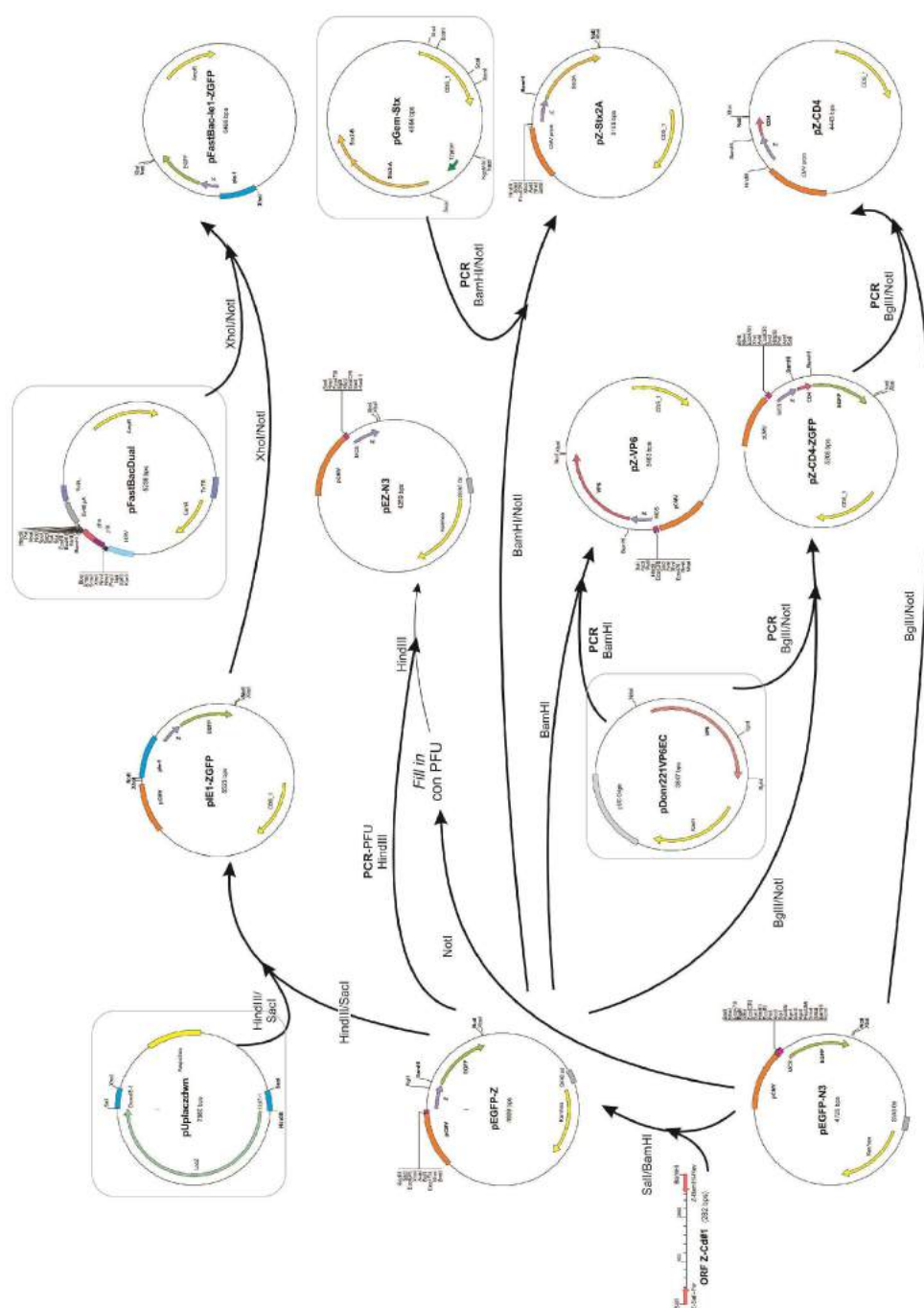


Figura ix. Resumen de los donados de la proteína Z y sus versiones recombinantes para expresión en células eucariotas

pCAGGS

El plásmido pCAGGS fue desarrollado por Niwa *et al.*, 1991 con el objetivo de obtener altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero. Este vector permite la expresión transitoria del gen de interés, el cual se encuentra bajo la regulación del promotor CAG. Este es una fusión entre el *enhancer* CMV IE y del promotor ubicuo fuerte derivado del gen Ac del pollo (Fregien y Davidson, 1986; Miyazaki *et al.*, 1989) (figura x).

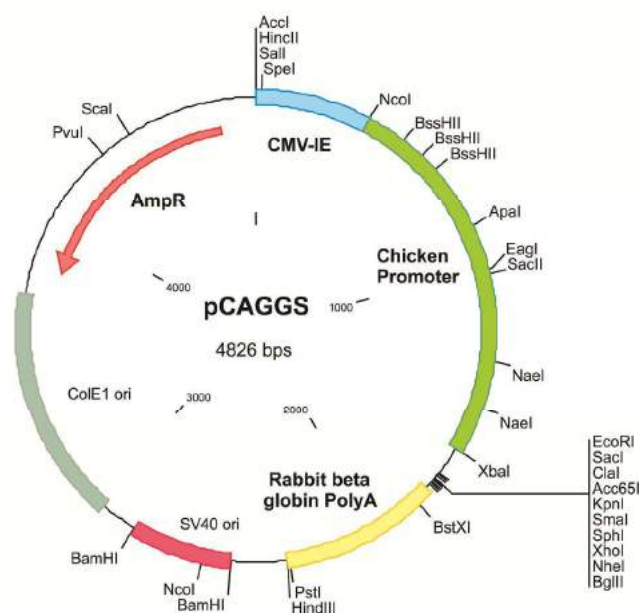


Figura x. Vector para expresión en células de mamífero pCAGGS (Niwa *et al.*, 1991), el cual posee un promotor fuerte para la transcripción del gen de interés.

Además este vector posee un gen de resistencia al antibiótico G418 mutado, tal que reduce la resistencia al mismo (Yenofsky *et al.*, 1990). De esta manera solo aquellas células que contengan un alto número de copias del vector serán seleccionadas en altas concentraciones de G418. Por último, este vector posee el 69% del fragmento BPV (*Bovine Papiloma Virus*), lo que permite que el mismo replique de forma autónoma y con un alto número de copias.

La construcción pCAGGS-EGFP fue realizada sobre el esqueleto de pCAGGS por el Dr. Ariel Rodriguez, quien gentilmente nos facilitó su utilización para los ensayos de ARNi (figura xi A). El esqueleto de pCAGGS también fue utilizado para la construcción de pCAGGS-Z (Junín, cepa Candid#1), el cual a pesar de haber sido confirmado por secuenciación, no fue posible evidenciar expresión de Z a partir de su transfección en células 293T (figura xi B)

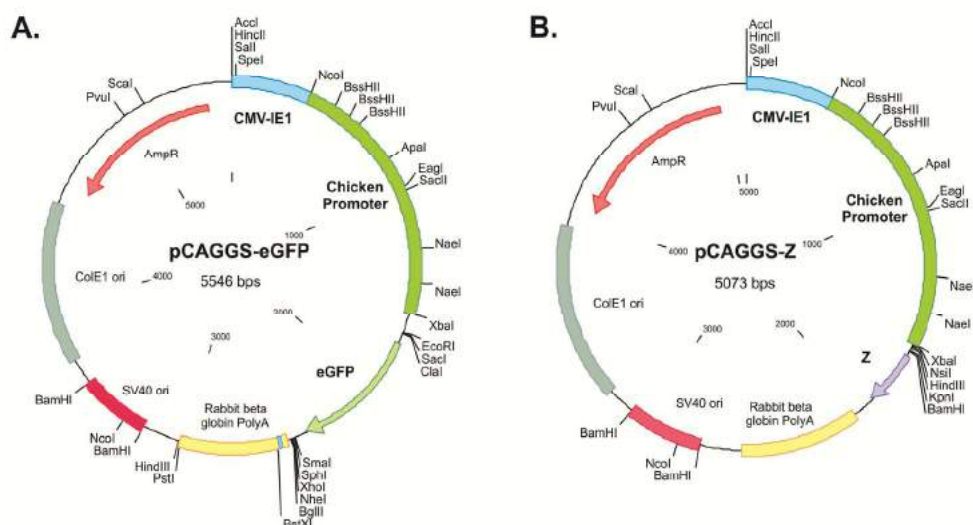


Figura xi. A. pCAGGS-EGFP y B. pCAGGS-Z. Ambos plásmidos fueron construidos en base al vector pCAGGS mediante digestión con enzimas de restricción y posterior ligación.

pSuperRetro y pSuperRetro-GFP

El sistema de ARNi pSUPER desarrollado por OligoEngine™ proporciona un vector de expresión de mamífero que dirige la síntesis intracelular siARNs. El vector utiliza el promotor del gen H1-ARN polimerasa-III, el cual produce la transcripción de un ARN pequeño el cual carece de la cola de poliadenosina y en su lugar posee una señal de terminación que consta de cinco timidinas (T5). El transcripto producido tendrá la estructura secundaria que será sustrato de la maquinaria DICER tal que se produzcan los fragmentos de 21 nt, que producirán la inhibición de la transcripción del gen diana.

El vector pSuperRetro fue utilizado para el clonado de un fragmento de EGFP, de manera de optimizar la inhibición de la transcripción de EGFP. Ambos plásmidos fueron gentilmente cedidos por el Dr. Arel Rodriguez.

pTrex® Gateway y pTrex-N

Gateway (Invitrogen) es una tecnología de clonado universal que utiliza las propiedades de la recombinación sitio específica del bacteriófago lambda (Landy, 1989). La estrategia de clonado consiste en la obtención del gen de interés a partir de PCR con *primers* que contienen en sus extremos la secuencia de recombinación sitio específica, y su posterior inserción en un vector aceptor. Existe una gran variedad de vectores aceptores comerciales, entre ellos el vector para expresión en células de

mamífero pT-RexDEST30. Este contiene un promotor híbrido formado por CMV-IE *enhancer* y el operador 2 de tetraciclina (TetO2), el cual permite regular la expresión (figura xii A).

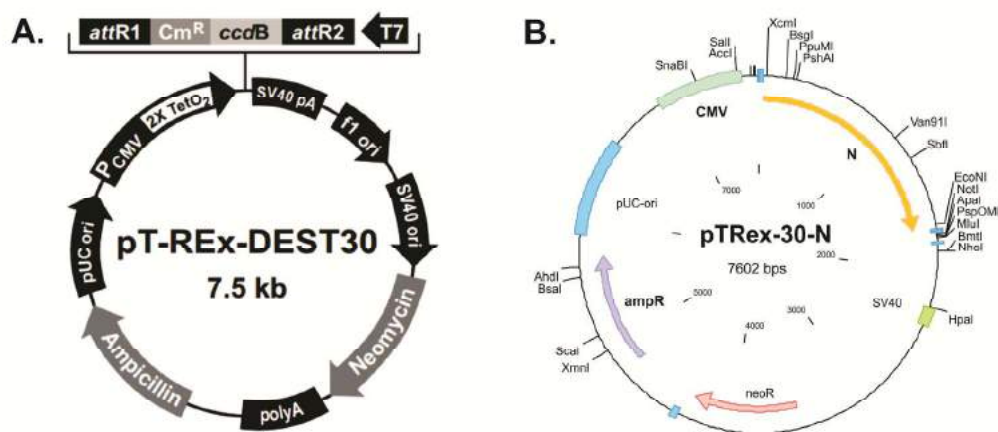


Figura xii. **A.** Vector comercial aceptor pT-RexDEST30 (Invitrogen). **B.** Vector para la expresión de la Nucleoproteína en células de mamífero, pT-Rex-N.

El esqueleto de pT-RexDEST30 fue utilizado por el Dr. Javier Iserte para el clonado de la Nucleoproteína del Virus Junín, cepa Candid#1. También fue utilizado para el clonado del precursor de las glicoproteínas virales y la proteína Z. Este último, fue confirmado por secuenciación, aunque no fue posible confirmar la expresión de Z mediante la transfección de células 293T (figura xii B).

**MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CONFOCAL DE CÉLULAS 293T
TRANSFECTADAS CON pZ-EGFP Y PEGFP-N3**

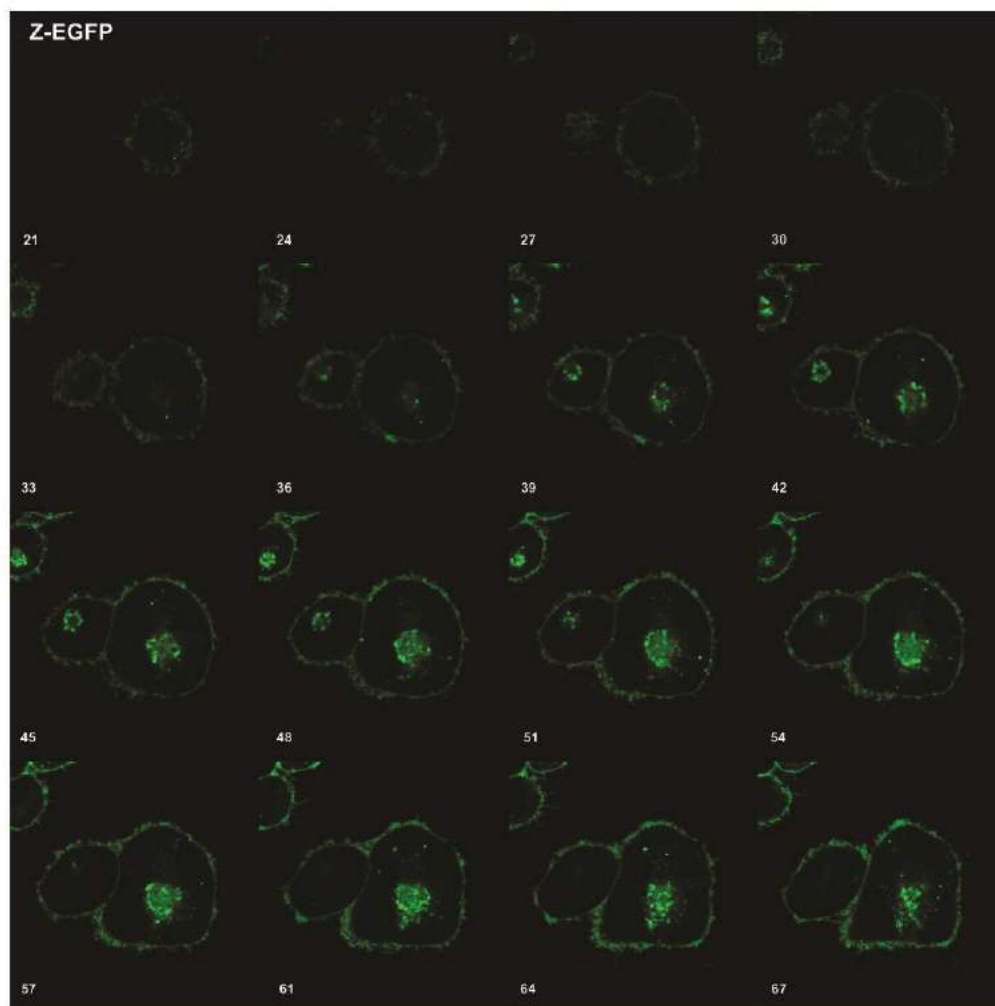


Figura xiii. Secciones ópticas individuales de células 293T. Transfectadas con pZ-EGFP, de las secciones 21-67. El intervalo entre las secciones ópticas corresponde a 3,9 nm.

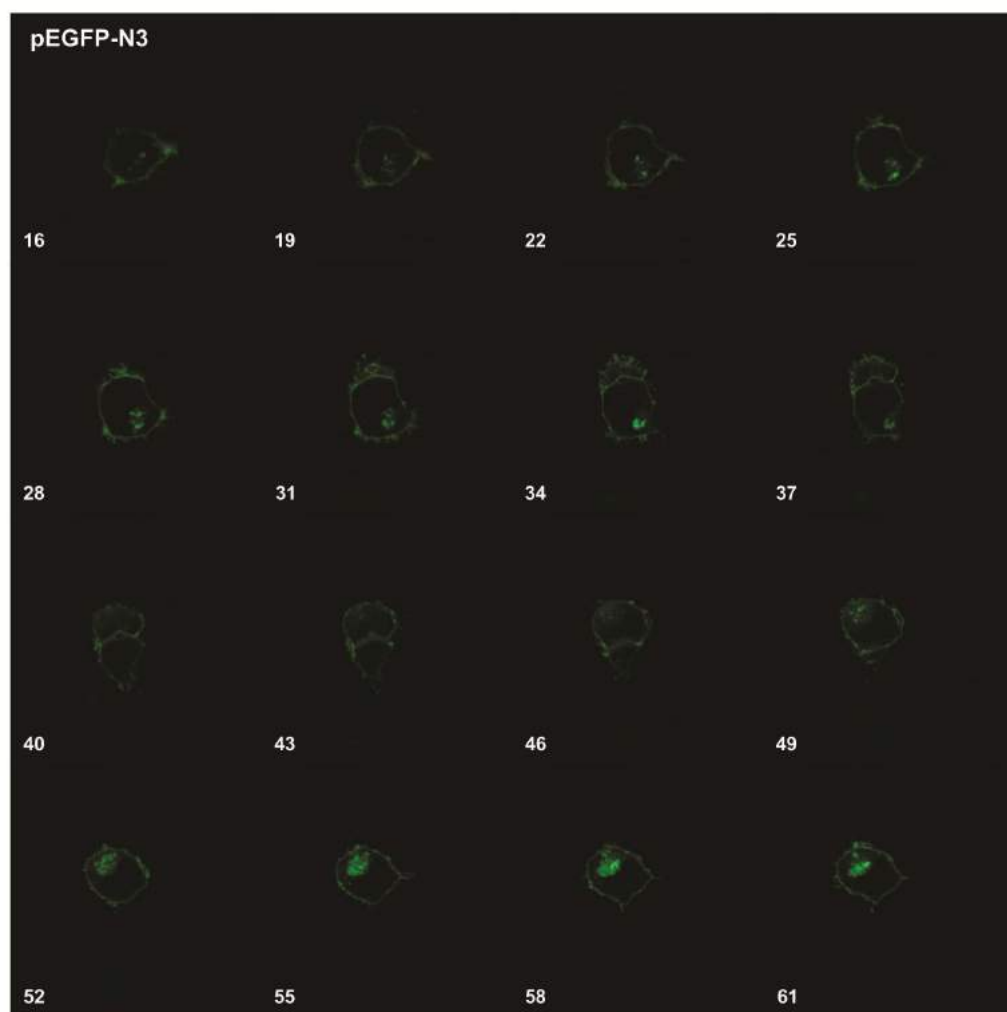
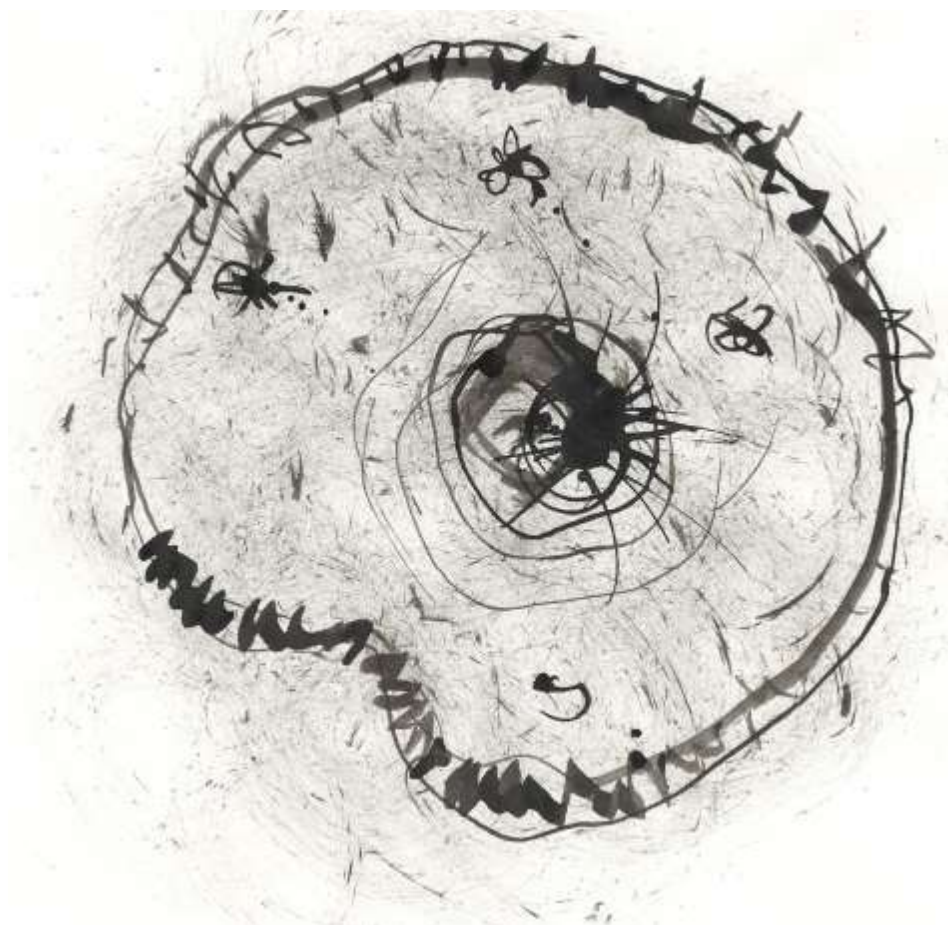


Figura xiv. Secciones ópticas individuales de células 293T. Transfectadas con pEGFP-N3, de las secciones 16-61. El intervalo entre las secciones ópticas corresponde a 3,9 nm.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abe T, Matsuura Y. Host innate immune responses induced by baculovirus in mammals. *Curr Gene Ther.* 10(3):226-31. **2010**.
- Abraham, J., Corbett, K.D., Farzan, M., Choe, H., Harrison, S.C. Structural basis for receptor recognition by New World hemorrhagic fever arenaviruses. *Nature structural & molecular biology* 17, 438-444. **2010**.
- Agnihothram, S.S., York, J., Trahey, M., Nunberg, J.H. Bitopic membrane topology of the stable signal peptide in the tripartite Junin virus GP-C envelope glycoprotein complex. *J Virol* 81, 4331-4337. **2007**.
- Agnihothram, S.S., Dancho, B., Grant, K.W., Grimes, M.L., Lyles, D.S., Nunberg, J.H. Assembly of arenavirus envelope glycoprotein GPC in detergent-soluble membrane microdomains. *J Virol* 83, 9890-9900. **2009**.
- Airenne, K.J., Laitinen, O.H., Mahonen, A.J., Yla-Herttuala, S., 2009. Transduction of vertebrate cells with recombinant baculovirus. *Cold Spring Harbor protocols* pdb prot5182. **2009**.
- Álvarez, D.E.; Lodeiro, M.F.; Ludueña, S.J.; Pietrasanta, L.I. & Gamarnik, A.V. Long-Range RNA-RNA Interactions Circularize the Dengue Virus Genome. *J Virol.*; 79(11): 6631–6643. **2005**.
- Albariño CG, Bergeron E, Erickson BR, Khristova ML, Rollin PE, Nichol ST. Efficient reverse genetics generation of infectious junin viruses differing in glycoprotein processing. *J Virol.* 83(11):5606-14. **2009**.
- Albini A, Barillari G, Benelli R, Gallo RC, Ensoli B. Angiogenic properties of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(11):4838-42. **1995**.
- Ambrosio, A.M.; Saavedra, M.C.; Riera, L.M.; Fassio, R.M. La producción nacional de vacuna a virus Junin vivo atenuado (Candid #1) anti-fiebre hemorrágica argentina. *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 40 (1): 5-17. **2006**.
- Arata, A.A. & Gratz. The structure of rodents faunas associated with arenaviral infections. *Bulletin WHO.* 52, 621-627. **1975**.
- Archer, A.M. & Rico-Hesse, R. High genetic divergence and recombination in arenaviruses from the Americas. *Virology*; 304:274–281. **2002**.
- Armstrong, C. & Lillie, R.D. Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. *Public Health Report.* 49, 1019-1027, **1934**.
- Andersson MG, Haasnoot PC, Xu N, Berenjian S, Berkhout B, Akusjärvi G. Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J. Virol* 79(15):9556–9565. **2005**.
- Arribáizaga, R. A. Una nueva enfermedad epidémica a germen desconocido, hipertermia nefrotóxica, leucopénica y enantemática. *El día Médico* 27: 1204-1210. **1955**.
- Artuso, M.C., Ellenberg, P.C., Scolaro, L.A., Damonte, E.B., Garcia, C.C. Inhibition of Junin virus replication by small interfering ARNs. *Antiviral research* 84, 31-37. **2009**.
- Aucoin, M.G., Mena, J.A., Kamen, A.A. Bioprocessing of baculovirus vectors: a review. *Current gene therapy* 10, 174-186. **2010**.
- Auperin, D.; Dimock, K., Cash, P., Rawls, W.E. & Bishop, D.H.L. Analysis of the genome of prototype Pichinde arenavirus and a virulent derivative of Pichinde Munchique. Evidence for sequence conservation at the 3' termini of their viral RNA species. *Virology.* 116, 363-367. **1982a**.
- Auperin, D.; Compans, R.W. & Bishop, D.H.L. Nucleotide sequence conservation at the 3' termini of the virion RNA species of New World and Old World arenaviruses. *Virology.* 121, 200-203. **1982b**.

- Auperin, D.D., Romanowski, V., Galinski, M., Bishop, D.H. Sequencing studies of pichinde arenavirus S ARN indicate a novel coding strategy, an ambisense viral S ARN. *J Virol* 52, 897-904. **1984**.
- Bachmann, M.F., Jennings, G.T. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol* 10, 787-796. **2010**.
- Bachmann, M.F., Rohrer, U.H., Kundig, T.M., Burki, K., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 262, 1448-1451. **1993**.
- Baird NL, York J, Nunberg JH. Arenavirus infection induces discrete cytosolic structures for RNA replication. *J Virol*. 86(20):11301-10. **2012**.
- Bannert H, Muranyi W, Ogryzko VV, Nakatani Y, Flügel RM. Co-activators p300 and PCAF physically and functionally interact with the foamy viral trans-activator. *BMC Mol. Biol* 5:16. **2004**.
- Barrera Oro, J.G. & Eddy, G.A. Characteristics of candidate live attenuated Junín virus vaccine. Fourth International Conference on Comparative Virology, Banff, Alberta, Canadá. 17-22 de octubre de **1982**.
- Barrera Oro, J.G.; McKee Jr., K.T.; Spisso, J.; Mahlandt, B.G. & Maiztegui, J.I. A refined complement-enhanced neutralization test for detecting antibodies to Junín virus. *Journal of Virological Methods*. 29, 71-80. **1990**.
- Barton, L.L., Peters, C.J., Ksiazek, T.G. Lymphocytic choriomeningitis virus: an unrecognized teratogenic pathogen. *Emerg Infect Dis* 1, 152-153. **1995**.
- Bennasser Y, Jeang KT. HIV-1 Tat interaction with Dicer: requirement for RNA. *Retrovirology*. 20;3:95. **2006**.
- Bergtold, A., Desai, D.D., Gavhane, A., Clynes, R. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity* 23, 503-514. **2005**.
- Beyer, W.R., Popplau, D., Garten, W., von Laer, D., Lenz, O. Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *J Virol* 77, 2866-2872. **2003**.
- Bieniasz, P.D. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344, 55-63. **2006**.
- Bilen, M.F., Pilloff, M.G., Belaich, M.N., Da Ros, V.G., Rodrigues, J.C., Ribeiro, B.M., Romanowski, V., Lozano, M.E., Ghiringhelli, P.D. Functional and structural characterisation of AgMNPV ie1. *Virus Genes* 35, 549-562. **2007**.
- Bilen M.F. Caracterización del *locus ie1* de AgMNPV y empleo de las regiones regulatorias en la generación de nuevos bioinsecticidas, Laboratorio de Ingeniería genética y biología molecular y celular. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Quilmes. **2007**
- Bishop, D.H., Gay, M.E., Matsuoko, Y. Nonviral heterogeneous sequences are present at the 5' ends of one species of snowshoe hare bunyavirus S complementary ARN. *Nucleic Acids Res* 11, 6409-6418. **1983**.
- Bivalkar-Mehla S, Vakharia J, Mehla R, Abreha M, Kanwar JR, Tikoo A, Chauhan A. Viral RNA silencing suppressors (RSS): novel strategy of viruses to ablate the host RNA interference (RNAi) defense system. *Virus Res*. 155(1):1-9. **2011**.
- Boerlin P. Evolution of virulence factors in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci*. 30;56(9-10):735-41. Review. **1999**.
- Bolken, T.C., Laquerre, S., Zhang, Y., Bailey, T.R., Pevear, D.C., Kickner, S.S., Sperzel, L.E., Jones, K.F., Warren, T.K., Amanda Lund, S., Kirkwood-Watts, D.L., King, D.S., Shurtleff, A.C., Guttieri, M.C., Deng, Y., Bleam, M., Hruby, D.E. Identification and characterization of potent small molecule inhibitor of hemorrhagic fever New World arenaviruses. *Antiviral research* 69, 86-97. **2006**.

- Borden, K.L., Boddy, M.N., Lally, J., O'Reilly, N.J., Martin, S., Howe, K., Solomon, E., Freemont, P.S. The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML. *EMBO J* 14, 1532-1541. **1995**.
- Borden, K.L., Campbell Dwyer, E.J., Salvato, M.S. An arenavirus RING (zinc-binding) protein binds the oncoprotein promyelocyte leukemia protein (PML) and relocates PML nuclear bodies to the cytoplasm. *J Virol* 72, 758-766. **1998**.
- Borio, C.S. Estructura y actividad de la proteína Z del virus Junín, Laboratorio de Ingeniería genética y biología molecular y celular. Tesina de licenciatura. Universidad Nacional de Quilmes. **2008**
- Borio CS, Bilen MF, Argüelles MH, Goñi SE, Iserte JA, Glikmann G, Lozano ME. Antigen vehiculization particles based on the Z protein of Junin virus. *BMC Biotechnol.* 12:80. **2012**.
- Bowen, M.D.; Peters, C.J. & Nichol S.T. The Phylogeny of New World (Tacaribe Complex) Arenaviruses. *Virology* 219, 285–290. **1996**.
- Bowden, T.A.; Crispin, M.;Graham, S.C.; Harvey, D.J.;Grimes, J.M.; Jones, E.Y. & Stuart, D.I. Unusual Molecular Architecture of the Machupo Virus Attachment Glycoprotein. *Journal of Virology*, p. 8259-8265, Vol. 83, No. 16. **2009**.
- Branco, L.M., Grove, J.N., Geske, F.J., Boisen, M.L., Muncy, I.J., Magliato, S.A., Henderson, L.A., Schoepp, R.J., Cashman, K.A., Hensley, L.E., Garry, R.F. Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever. *Virol J* 7, 279. **2010**.
- Briese, T.; Paweska, J.T.; McMullan, L.K.; Hutchison, S.K.; Street, C.; Palacios, G.; Khristova, M.L.; Weyer, J.; Swanepoel, R.; Egholm, M.; Nichol, S.T. & Lipkin, W.I. Genetic Detection and Characterization of Lujo Virus, a New Hemorrhagic Fever– Associated Arenavirus from Southern Africa. *PLoS Pathogens*, Volume 4, Issue 5, 1-8. **2009**.
- Briknarova, K., Thomas, C.J., York, J., Nunberg, J.H. Structure of a zinc-binding domain in the Junin virus envelope glycoprotein. *J Biol Chem* 286, 1528-1536. **2011**.
- Bruns, M., Zeller, W., Rohdewohld, H., Lehmann-Grube, F. Lymphocytic choriomeningitis virus. IX. Properties of the nucleocapsid. *Virology* 151, 77-85. **1986**.
- Buchmeier, M.J.; Lewicki, H.A.; Tomori, O. & Oldstone, M.B.A. Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis and Pichinde viruses: generation, characterization and cross-reactivity with other arenaviruses. *Virology*. 113, 73-85. **1981**.
- Buchmeier, M.J., Oldstone, M.B. Protein structure of lymphocytic choriomeningitis virus: evidence for a cell-associated precursor of the virion glycopeptides. *Virology* 99, 111-120. **1979**.
- Cajimat MN, Milazzo ML, Bradley RD, Fulhorst CF. Ocozocoautla de espinosa virus and hemorrhagic fever, Mexico. *Emerg Infect Dis.*18(3):401-5. **2012**.
- Calvente N.I. Clonado y expresión de la proteína de fusión, Z del virus Junín - N del virus Sarampión, para la generación de VLPs recombinantes. Laboratorio de Inmunología y virología. Tesina de licenciatura. Universidad Nacional de Quilmes. **2013**.
- Campbell Dwyer, E.J., Lai, H., MacDonald, R.C., Salvato, M.S., Borden, K.L. The lymphocytic choriomeningitis virus RING protein Z associates with eukaryotic initiation factor 4E and selectively represses translation in a RING-dependent manner. *J Virol* 74, 3293-3300. **2000**.
- Candurra, N.A., Lago, M.J., Maskin, L., Damonte, E.B. Involvement of the cytoskeleton in Junin virus multiplication. *J Gen Virol* 80 (Pt 1), 147-156. **1999**.
- Cao, W., Henry, M.D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J.H., Ravkov, E.V., Nichol, S.T., Compans, R.W., Campbell, K.P., Oldstone, M.B. Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* 282, 2079-2081. **1998**.
- Capul, A.A., de la Torre, J.C. A cell-based luciferase assay amenable to high-throughput screening of inhibitors of arenavirus budding. *Virology* 382, 107-114. **2008**.

- Capul, A.A., de la Torre, J.C., Buchmeier, M.J. Conserved residues in Lassa fever virus Z protein modulate viral infectivity at the level of the ribonucleoprotein. *J Virol* 85, 3172-3178. **2011**.
- Capul, A.A., Perez, M., Burke, E., Kunz, S., Buchmeier, M.J., de la Torre, J.C. Arenavirus Z-glycoprotein association requires Z myristoylation but not functional RING or late domains. *J Virol* 81, 9451-9460. **2007**.
- Carrion R Jr, Patterson JL, Johnson C, Gonzales M, Moreira CR, Ticer A, Brasky K, Hubbard GB, Moshkoff D, Zapata J, Salvato MS, Lukashevich IS. A ML29 reassortant virus protects guinea pigs against a distantly related Nigerian strain of Lassa virus and can provide sterilizing immunity. *Vaccine* 25(20):4093-102. **2007**.
- Carthew RW. Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr Opin Cell Biol*. 13(2):244-8. **2001**.
- Casabona, J.C., Livingston Macleod, J.M., Loureiro, M.E., Gomez, G.A., Lopez, N. The RING domain and the L79 residue of Z protein are involved in both the rescue of nucleocapsids and the incorporation of glycoproteins into infectious chimeric arenavirus-like particles. *J Virol* 83, 7029-7039. **2009**.
- Cashman, K.A., Smith, M.A., Twenhafel, N.A., Larson, R.A., Jones, K.F., Allen, R.D., 3rd, Dai, D., Chinsangaram, J., Bolken, T.C., Hruby, D.E., Amberg, S.M., Hensley, L.E., Guttieri, M.C. Evaluation of Lassa antiviral compound ST-193 in a guinea pig model. *Antiviral research* 90, 70-79. **2011**.
- Chackerian, B., Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 6, 381-390. **2007**.
- Chang, C.F., Wang, M., Ou, W.C., Chen, P.L., Shen, C.H., Lin, P.Y., Fang, C.Y., Chang, D. Human JC virus-like particles as a gene delivery vector. *Expert Opin Biol Ther* 11, 1169-1175. **2011**.
- Charrel, R.N.; de Lamballerie, X.; Fulhorst, C.F. The Whitewater Arroyo virus: natural evidence for genetic recombination among Tacaribe serocomplex viruses (family Arenaviridae). *Virology*. 10;283(2):161-6, **2001**.
- Charrel, R.N.; Feldmann, H.; Fulhorst, C.F.; Khelifa, R.; de Chesse, R.; de Lamballerie, X. Phylogeny of New World arenaviruses based on the complete coding sequences of the small genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination. *Biochem Biophys Res Commun*. 6;296(5):1118-24, **2002**.
- Charrel, R.N. & de Lamballerie X. Arenaviruses other than Lassa virus. *Antiviral Res.*; 57 (1-2): 89-100. **2003**.
- Charrel, R.N.; de Lamballerie X.; Emonet S. Phylogeny of the genus Arenavirus. *Curr Opin Microbiol*. 11 (4):362-8. **2008**.
- Chen, B.J., Lamb, R.A. Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT? *Virology* 372, 221-232. **2008**.
- Cherñac Fabián Romano. Clonado y Expresión del gen Z de Virus Junín, Laboratorio de Ingeniería genética y biología molecular y celular. Tesina de licenciatura. Universidad Nacional de Quilmes. **2006**.
- Chinault, D.N.; Thompson, H.A. & Gangemi, J.D. Polypeptide synthesis catalyzed by components of Pichinde virus disrupted by detergent. *Journal of General Virology*. 55, 213-217. **1981**.
- Choi AH, Basu M, McNeal MM, Flint J, VanCott JL, Clements JD, Ward RL. Functional mapping of protective domains and epitopes in the rotavirus VP6 protein. *J Virol*. 74(24):11574-80. **2000**.
- Ciancanelli, M.J., Basler, C.F. Mutation of YMYL in the Nipah virus matrix protein abrogates budding and alters subcellular localization. *J Virol* 80, 12070-12078. **2006**.

- Cordey S, Sahli R, Moraz ML, Estrade C, Morandi L, Cherpillod P, Charrel RN, Kunz S, Kaiser L. Analytical validation of a lymphocytic choriomeningitis virus real-time RT-PCR assay. *J Virol Methods*. 177(1):118-22. **2011**.
- Cornu, T.I., Feldmann, H., de la Torre, J.C. Cells expressing the RING finger Z protein are resistant to arenavirus infection. *J Virol* 78, 2979-2983. **2004**.
- Cossio, P.M.; Laguens, R.P.; Arana, R.M.; Segal, A. & Maiztegui, J.I. Ultrastructural and immunohistochemical study of the human kidney in Argentine hemorrhagic fever. *Virchows Archives*. 368, 1. **1975**.
- Coulibaly-N'Golo D, Allali B, Kouassi SK, Fichet-Calvet E, Becker-Ziaja B, Rieger T, Olschläger S, Dosso H, Denys C, Ter Meulen J, Akoua-Koffi C, Günther S. Novel arenavirus sequences in *Hylomyscus* sp. and *Mus* (*Nannomys*) *setulosus* from Côte d'Ivoire: implications for evolution of arenaviruses in Africa. *PLoS One*. 6(6) **2011**.
- Coutard, B., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J., Leontovich, A.M., Poupon, A., De Lamballerie, X., Charrel, R., Gould, E.A., Gunther, S., Norder, H., Klempa, B., Bourhy, H., Rohayem, J., L'Hermite, E., Nordlund, P., Stuart, D.I., Owens, R.J., Grimes, J.M., Tucker, P.A., Bolognesi, M., Mattevi, A., Coll, M., Jones, T.A., Aqvist, J., Unge, T., Hilgenfeld, R., Bricogne, G., Neyts, J., La Colla, P., Puerstinger, G., Gonzalez, J.P., Leroy, E., Cambillau, C., Romette, J.L., Canard, B. The VIZIER project: preparedness against pathogenic ARN viruses. *Antiviral research* 78, 37-46. **2008**.
- Cox, M.M., Hollister, J.R. FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 37, 182-189. **2009**.
- Craighead, John E. Chapter 19 - Hemorrhagic Fever Viruses. In: *Pathology and Pathogenesis of Human Viral Disease*. Edited by: John E. Craighead, MD. Elsevier Inc. pp. 277-296. **2000**.
- Cummins, D.; Molinas, F.C.; Lerer, G.; Maiztegui, J.I.; Faint, R. & Machin, S.J. A plasma inhibitor of platelet aggregation in patients with Argentine hemorrhagic fever. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 42, 470-475. **1990**.
- Cubas, R., Zhang, S., Kwon, S., Sevic-Muraca, E.M., Li, M., Chen, C., Yao, Q. Virus-like particle (VLP) lymphatic trafficking and immune response generation after immunization by different routes. *J Immunother* 32, 118-128. **2009**.
- Dalton, A.J.; Rowe, W.P.; Smith, G.H.; Wilsnack, R.E. & Pugh, W.E. Morphological and cytochemical studies on lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Virology*. 2, 1465-1478. **1968**.
- Damonte, E.B., Coto, C.E. Treatment of arenavirus infections: from basic studies to the challenge of antiviral therapy. *Advances in virus research* 58, 125-155. **2002**.
- Damonte, E.B., Mersich, S.E., Coto, C.E. Response of cells persistently infected with arenaviruses to superinfection with homotypic and heterotypic viruses. *Virology* 129, 474-478. **1983**.
- Damsky, C.H., Sheffield, J.B., Tuszynski, G.P., Warren, L., Is there a role for actin in virus budding? *J Cell Biol* 75, 593-605. **1977**.
- Davies, B.A., Lee, J.R., Oestreich, A.J., Katzmann, D.J. Membrane protein targeting to the MVB/lysosome. *Chemical reviews* 109, 1575-1586. **2009**.
- de Bracco, M.M; Rimoldi, M.T.; Cossio, P.M.; Rabinovich, A.; Maiztegui, J.I.; Carballal, G. & Arana, R.M. Argentine hemorrhagic fever: Alterations of the complement system and anti-Junín virus humoral response. *New England Journal of Medicine*. 299, 216-221. **1978**.
- de Mitri, M.I., de Martinez Segovia, Z.M. Biological activities of Junin virus proteins. II. Complement-fixing polypeptides associated with the soluble antigen and purified virus particles. *Intervirology* 14, 84-90. **1980**.

- de Thé, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., Dejean, A. The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66, 675-684. **1991**.
- de Vries W., Haasnoot J, Fouchier R, de Haan P, Berkhout B. Differential RNA silencing suppression activity of NS1 proteins from different influenza A virus strains. *J Gen Virol*. 90(Pt 8):1916-22. **2009**.
- Demain, A.L., Vaishnav, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances* 27, 297-306. **2009**.
- Dennehy PH. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol Rev* 21:198-208. **2008**.
- Deshaies, R.J., Joazeiro, C.A., RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual review of biochemistry* 78, 399-434. **2009**.
- Dhama K. Chauhan RS, Mahendran M, Malik SV. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet Res Commun* 33(1):1-23. **2009**.
- Diavani, M., Rodas, J., Lukashevich, I.S., Horejsh, D., Pandolfi, P.P., Borden, K.L., Salvato, M.S. Role of the promyelocytic leukemia protein PML in the interferon sensitivity of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 75, 6204-6208. **2001**.
- Diavani, M., Topisirovic, I., Zapata, J.C., Sadowska, M., Yang, Y., Rodas, J., Lukashevich, I.S., Bogue, C.W., Pauza, C.D., Borden, K.L., Salvato, M.S. The proline-rich homeodomain (PRH/HEX) protein is down-regulated in liver during infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 79, 2461-2473. **2005**.
- Downs, W. G.; Anderson, C. R.; Spence, L.; Aitken, T. H. G. & Greenhall, A. H. Tacaribe virus, a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies. *Am J Trop Med Hyg* 12, 640-646. **1963**.
- Dylla, D.E., Michele, D.E., Campbell, K.P., McCray, P.B., Jr. Basolateral entry and release of New and Old World arenaviruses from human airway epithelia. *J Virol* 82, 6034-6038. **2008**.
- Eddy, G.A.; Wagner, F.S.; Scott, S.K. & Mahlaudt, B.J. Protection of monkeys against Machupo virus by the passive administration of Bolivian hemorrhagic fever immunoglobulin (human origin). *Bulletin WHO*. 52, 723-727. **1975**.
- Eichler, R., Strecker, T., Kolesnikova, L., ter Meulen, J., Weissenhorn, W., Becker, S., Klenk, H.D., Garten, W., Lenz, O. Characterization of the Lassa virus matrix protein Z: electron microscopic study of virus-like particles and interaction with the nucleoprotein (NP). *Virus Res* 100, 249-255. **2004**.
- Emonet SF, Seregin AV, Yun NE, Poussard AL, Walker AG, de la Torre JC, Paessler S. Rescue from cloned cADNs and in vivo characterization of recombinant pathogenic Romero and live-attenuated Candid #1 strains of Junin virus, the causative agent of Argentine hemorrhagic fever disease. *J Virol*. 85(4):1473-83. **2011**.
- Enría, D.A.; García-Franco, S.; Ambrosio, A.M.; Vallejos, D.; Levis, S. & Maiztegui, J.I. Current status of the treatment of Argentine Hemorrhagic Fever. *Medical Microbiology and Immunology*. 175, 173-176. **1986**.
- Enría, D.A.; Bowen, M.D.; Mills, J.N.; Shieh, W.J.; Bausch, D.; Peters, C.J. Arenavirus infections. In: Guarrant, R.L., Walker, D. H., Weller, P.F., Saunders, W.B. (Eds.), *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, and Practice*, vol. 2, pp. 1191– 1212 (Chapter 111). **2004**.
- Enría, D.A.; Briggiler, A.M.; Sánchez, Z. Treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res.*;78(1):132-9. **2008**.
- Eschli, B., Quirin, K., Wepf, A., Weber, J., Zinkernagel, R., Hengartner, H. Identification of an N-terminal trimeric coiled-coil core within arenavirus glycoprotein 2 permits assignment to class I viral fusion proteins. *J Virol* 80, 5897-5907. **2006**.
- Estes MK & Kapikian AZ. Rotaviruses. In P. M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 5th ed, vol. 2. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. **2007**.

- Everett, R.D., Chelbi-Alix, M.K. PML and PML nuclear bodies: implications in antiviral defence. *Biochimie* 89, 819-830. **2007**.
- Eystathiou T, Chan EK, Mahler M, Luft LM, Fritzler ML, Fritzler MJ. A panel of monoclonal antibodies to cytoplasmic GW bodies and the mRNA binding protein GW182. *Hybrid* *Hybridomics* 22(2):79-86. **2003**.
- Fan, L., Briesse, T., Lipkin, W.I. Z proteins of New World arenaviruses bind RIG-I and interfere with type I interferon induction. *J Virol* 84, 1785-1791. **2010**.
- Farazi, T.A., Waksman, G., Gordon, J.I. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem* 276, 39501-39504. **2001**.
- Fehling SK, Noda T, Maisner A, Lamp B, Conzelmann KK, Kawaoka Y, Klenk HD, Garten W, Strecker T. The microtubule motor protein KIF13A is involved in intracellular trafficking of the Lassa virus matrix protein Z. *Cell Microbiol.* 2013 Feb;15(2):315-34. Flint, S.J.; Enquist, L.W.; Krug, R.M.; Racaniello, V.R.; Skalka, A.M. *Principles of Virology*. ASM Press, **2000**.
- Franze Fernández, M.T.; Zetina, C.; Iapalucci, S.; Lucero, M.A.; Boissou, C.; López, R.; Rey, O.; Daheli, M.; Cohen, G. & Zalein, M. Molecular structure and early events in the replication of Tacaribe Arenavirus S RNA. *Virus Research.* 7, 309-324. **1987**.
- Freed, E.O. Viral late domains. *J Virol* 76, 4679-4687. **2002**.
- Freemont PS, Hanson IM, Trowsdale J. A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell.* 64(3):483-4. **1991**.
- Fregien N, Davidson N. Activating elements in the promoter region of the chicken beta-actin gene. *Gene.* 48(1):1-11. **1986**.
- Froeschke, M., Basler, M., Groettrup, M., Dobberstein, B. Long-lived signal peptide of lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein pGP-C. *J Biol Chem* 278, 41914-41920. **2003**.
- Gamaley, S.G., Bateneva, A.V., Sysoeva, G.M., Danilenko, E.D., Lebedev, L.R., Masysheva, V.I. Pharmacokinetics and antitumor effects of the drug containing TNF-alpha in nanoparticles. *Bull Exp Biol Med* 149, 320-323. **2010**.
- Garcia, C.C., Candurra, N.A., Damonte, E.B. Antiviral and virucidal activities against arenaviruses of zinc-finger active compounds. *Antiviral chemistry & chemotherapy* 11, 231-237. **2000**.
- Garcia, C.C., Djavani, M., Topisirovic, I., Borden, K.L., Salvato, M.S., Damonte, E.B. Arenavirus Z protein as an antiviral target: virus inactivation and protein oligomerization by zinc finger-reactive compounds. *J Gen Virol* 87, 1217-1228. **2006**.
- Garcia, C.C., Ellenberg, P.C., Artuso, M.C., Scolaro, L.A., Damonte, E.B. Characterization of Junin virus particles inactivated by a zinc finger-reactive compound. *Virus Res* 143, 106-113. **2009**.
- Garcia, C.C., Topisirovic, I., Djavani, M., Borden, K.L., Damonte, E.B., Salvato, M.S. An antiviral disulfide compound blocks interaction between arenavirus Z protein and cellular promyelocytic leukemia protein. *Biochem Biophys Res Commun* 393, 625-630. **2010**.
- Garcin D, Kolakofsky D. A novel mechanism for the initiation of Tacaribe arenavirus genome replication. *J Virol* 64: 6196-6203. **1990**.
- Garcin, D., Lezzi, M., Dobbs, M., Elliott, R.M., Schmaljohn, C., Kang, C.Y., Kolakofsky, D. The 5' ends of Hantaan virus (Bunyaviridae) ARNs suggest a prime-and-realign mechanism for the initiation of ARN synthesis. *J Virol* 69, 5754-5762. **1995**.
- Garrus, J.E., von Schwedler, U.K., Pornillos, O.W., Morham, S.G., Zavitz, K.H., Wang, H.E., Wettstein, D.A., Stray, K.M., Cote, M., Rich, R.L., Myszka, D.G., Sundquist, W.I. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107, 55-65. **2001**.

- Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R.D.; Bairoch, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31:3784-3788. **2003**.
- Geisbert TW, Jones S, Fritz EA, Shurtleff AC, Geisbert JB, Liebscher R, Grolla A, Ströher U, Fernando L, Daddario KM, Guttieri MC, Mothé BR, Larsen T, Hensley LE, Jahrling PB, Feldmann H. Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever. *PLoS Med.* 2(6):e183. **2005**.
- Ghiringhelli, P.D., Rivera-Pomar, R.V., Lozano, M.E., Grau, O., Romanowski, V. Molecular organization of Junin virus S ARN: complete nucleotide sequence, relationship with other members of the *Arenaviridae* and unusual secondary structures. *J Gen Virol* 72 (Pt 9), 2129-2141. **1991**.
- Giménez, H.B. & Compans, R.W. Defective interfering Tacaribe virus and persistently infected cells. *Virology.* 107, 229-239. **1980**.
- Giner A, Lakatos L, García-Chapa M, López-Moya JJ, Burguán J. Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathog.* 6(7). **2010**.
- Gladnikoff, M., Shimoni, E., Gov, N.S., Rouso, I. Retroviral assembly and budding occur through an actin-driven mechanism. *Biophys J* 97, 2419-2428. **2009**.
- Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell.* 23(1):175-82. **1981**.
- Goni, S.E., Iserte, J.A., Ambrosio, A.M., Romanowski, V., Ghiringhelli, P.D., Lozano, M.E., Genomic features of attenuated Junin virus vaccine strain candidate. *Virus Genes* 32, 37-41. **2006**.
- Goñi SE, Iserte JA, Stephan BI, Borio CS, Ghiringhelli PD, Lozano ME. Molecular analysis of the virulence attenuation process in Junín virus vaccine genealogy. *Virus Genes* 40(3):320-8. **2010**.
- Goñi SE, Borio CS, Romano FB, Rota RP, Pilloff MG, Iserte JA, Tortorici MA, Stephan BI, Bilen MF, Ghiringhelli PD, Lozano ME. Expression and purification of Z protein from Junín virus. *J Biomed Biotechnol.* 2010:970491. **2010**.
- Graham, F.L.; Smiley, J.; Russell, W.C.; Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 36(1):59-74. **1977**.
- Granados, R.R.; Li, G.X.; Derksen, A.C.G. & McKenna, K.A. A new insect cell line from - *Trichoplusia ni* (BTI -TN -5B1- 4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virys. *Journal of Invertebrate Pathology.* 64, 260-266. **1994**.
- Groseth A, Wolff S, Strecker T, Hoenen T, Becker S. Efficient budding of the tacaribe virus matrix protein z requires the nucleoprotein. *Virology* 84(7):3603-11. **2010**.
- Gschwender, H.H.; Brummund, M.; Lehmann-Grube, F. Lymphocytic choriomeningitis virus. I. Concentration and purification of the infectious virus. *Journal of Virology.* 15, 1317-1322. **1975**.
- Gustin, J.K., Moses, A.V., Fruh, K., Douglas, J.L. Viral takeover of the host ubiquitin system. *Frontiers in microbiology* 2, 161. **2011**.
- Haasnoot J, de Vries W, Geutjes EJ, Prins M, de Haan P, Berkhout B. The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog.* 3(6):e86. **2007**.
- Hagedorn CH, Spivak-Kroizman T, Friedland DE, Goss DJ, Xie Y. Expression of functional eIF-4Ehuman: purification, detailed characterization, and its use in isolating eIF-4E binding proteins. *Protein Expr Purif.* 9(1):53-60. **1997**.
- Haller, O., Kochs, G., Weber, F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344, 119-130. **2006**.
- Harding, C.V., Song, R. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* 153, 4925-4933. **1994**.

- Harnish, D.; Dimock, K.; Leung, W.C.; Rawls, W. Immunoprecipitable polypeptides in Pichinde virus infected BHK-21 cells. In: The replication of negative strand viruses. (Bishop, D.H.L. and Compans, R.W. Eds.). Elsevier Press, Nueva York. pp: 23-29. **1981**.
- Harnish, D.G.; Dimock, K. & Bishop, D.H.L. Gene mapping in Pichinde virus: assignment of viral polypeptides to genomic L and S RNAs. *Journal of Virology*. 46, 638-641. 1983. Harrison, S.C. Mechanism of membrane fusion by viral envelope proteins. *Advances in virus research* 64, 231-261. **2005**.
- Hass, M.; Golnitz, U.; Muller, S.; Becker-Ziaja, B.; Gunther, S. Replicon system for Lassa virus. *J. Virol*. 78: 13793-803. **2004**.
- Hastie, K.M., Bale, S., Kimberlin, C.R., Saphire, E.O. Hiding the evidence: two strategies for innate immune evasion by hemorrhagic fever viruses. *Current opinion in virology* 2, 151-156. **2012a**.
- Hastie, K.M., Kimberlin, C.R., Zandonatti, M.A., MacRae, I.J., Saphire, E.O. Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsARN-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2396-2401. **2011**.
- Hastie, K.M., King, L.B., Zandonatti, M.A., Saphire, E.O. Structural basis for the dsARN specificity of the Lassa virus NP exonuclease. *PLoS One* 7, e44211. **2012b**.
- Hayashi, K., Kojima, C. pCold-GST vector: a novel cold-shock vector containing GST tag for soluble protein production. *Protein expression and purification* 62, 120-127. **2008**.
- Hershey, J.W., Expression of initiation factor genes in mammalian cells. *Biochimie* 76, 847-852. **1994**.
- Hervas-Stubbs S., Rueda P, Lopez L, Leclerc C. Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN. *J Immunol*. 178(4):2361-9. **2007**
- Hoenen, T., Biedenkopf, N., Zielecki, F., Jung, S., Groseth, A., Feldmann, H., Becker, S. Oligomerization of Ebola virus VP40 is essential for particle morphogenesis and regulation of viral transcription. *J Virol* 84, 7053-7063. **2010**.
- Huang, C., Kolokoltsova, O.A., Yun, N.E., Seregin, A.V., Poussard, A.L., Walker, A.G., Brasier, A.R., Zhao, Y., Tian, B., de la Torre, J.C., Paessler, S. Junin virus infection activates the type I interferon pathway in a RIG-I-dependent manner. *PLoS neglected tropical diseases* 6, e1659. **2012**.
- Huang, N.N., Han, S.B., Hwang, I.Y., Kehrl, J.H. B cells productively engage soluble antigen-pulsed dendritic cells: visualization of live-cell dynamics of B cell-dendritic cell interactions. *J Immunol* 175, 7125-7134. **2005**.
- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., Cuche, B.A., de Castro, E., Lachaize, C., Langendijk-Genevaux, P.S., Sigrist, C.J. The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Res* 36, D245-249. **2008**.
- Iapalucci, S.; López, N. & Franze Fernández, M.T. The 3' end of the Tacaribe arenavirus subgenomic RNAs. *Virology*. 182, 269-278. **1991**.
- Igonet S., Vaney MC, Vohnrein C, Bricogne G, Stura EA, Hengartner H, Eschli B, Rey FA. X-ray structure of the arenavirus glycoprotein GP2 in its postfusion hairpin conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(50):19967-72. **2011**.
- Jacamo, R., Lopez, N., Wilda, M., Franze-FERNANDEZ, M.T., Tacaribe virus Z protein interacts with the L polymerase protein to inhibit viral ARN synthesis. *J Virol* 77, 10383-10393. **2003**.
- Ji J., Glaser A, Wernli M, Berke JM, Moradpour D, Erb P. Suppression of short interfering RNA-mediated gene silencing by the structural proteins of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 89(Pt 11):2761-6. **2008**.
- Johnson, K.M.; Wiebenga, N.H.; Mackenzie, R.B.; Kuns, M.L.; Tauraso, N.M.; Shelokov, A.; Webb, P.A.; Justines, G.; Beye, H.K. Virus isolations from human cases of hemorrhagic fever in Bolivia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118, 113-118. **1965**.

- Junt, T., Moseman, E.A., Iannaccone, M., Massberg, S., Lang, P.A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S.E., Shayakhmetov, D.M., Di Paolo, N.C., van Rooijen, N., Mempel, T.R., Whelan, S.P., von Andrian, U.H. Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* 450, 110-114. **2007**.
- Kaczmarczyk, S.J., Sitaraman, K., Young, H.A., Hughes, S.H., Chatterjee, D.K. Protein delivery using engineered virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16998-17003. **2011**.
- Kanneganti TD. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat Rev Immunol.* 10(10):688-98. **2010**.
- Karjee S, Minhas A, Sood V, Ponia SS, Banerjee AC, Chow VT, Mukherjee SK, Lal SK. The 7a accessory protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus acts as an RNA silencing suppressor. *J Virol.* 84(19):10395-401. **2010**.
- Karlowski WM, Zielezinski A, Carrère J, Pontier D, Lagrange T, Cooke R. Genome-wide computational identification of WG/GW Argonaute-binding proteins in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 38(13):4231-45. **2010**.
- Karmali M.A. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin.Microbiol. Rev.* 2:15-38. **1989**.
- Katzmann DJ, Stefan CJ, Babst M, Emr SD. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol.* 162(3):413-23. **2003**.
- Kentsis, A., Dwyer, E.C., Perez, J.M., Sharma, M., Chen, A., Pan, Z.Q., Borden, K.L. The RING domains of the promyelocytic leukemia protein PML and the arenaviral protein Z repress translation by directly inhibiting translation initiation factor eIF4E. *JouARNI of molecular biology* 312, 609-623. **2001**.
- Kentsis, A., Gordon, R.E., Borden, K.L. Control of biochemical reactions through supramolecular RING domain self-assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15404-15409. **2002a**.
- Kentsis, A., Gordon, R.E., Borden, K.L. Self-assembly properties of a model RING domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 667-672. **2002b**.
- King, A.M.Q., Lefkowitz, E., Adams, M.J., Carstens, E.B. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Science. **2011**.
- Kleid DG, Yansura D, Small B, Dowbenko D, Moore DM, Grubman MJ, McKercher PD, Morgan DO, Robertson BH, Bachrach HL. Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. *Science.* 214(4525):1125-9. **1981**.
- Klenk, H.D. Post-translational modifications in insect cells. *Cytotechnology* 20, 139-144. **1996**.
- Koken, M.H., Puvion-Dutilleul, F., Guillemin, M.C., Viron, A., Linares-Cruz, G., Stuurman, N., de Jong, L., Szosteki, C., Calvo, F., Chomienne, C. The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *EMBO J* 13, 1073-1083. **1994**.
- Korns Johnson D, Homann D. Accelerated and improved quantification of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) titers by flow cytometry. *PLoS One.* 7(5). **2012**.
- Kovacsovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B., Rock, K.L. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4942-4946. **1993**.
- Kranzusch, P.J., Schenk, A.D., Rahmeh, A.A., Radoshitzky, S.R., Bavari, S., Walz, T., Whelan, S.P. Assembly of a functional Machupo virus polymerase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20069-20074. **2010**.
- Kranzusch, P.J., Whelan, S.P. arenavirus Z protein controls viral ARN synthesis by locking a polymerase-promoter complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 19743-19748. **2011**.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 277, 680-185. **1970**

- Lan S, McLay Schelde L, Wang J, Kumar N, Ly H, Liang Y. Development of infectious clones for virulent and avirulent pichinde viruses: a model virus to study arenavirus-induced hemorrhagic fevers. *J Virol*. 83(13):6357-62. **2009**.
- Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem*. 58:913-49. **1989**.
- Lascano, E.F., Berria, M.I. Ultrastructure of Junin virus in mouse whole brain and mouse brain tissue cultures. *J Virol* 14, 965-974. **1974**.
- Le Roux, D., Le Bon, A., Dumas, A., Taleb, K., Sachse, M., Sikora, R., Julithe, M., Benmerah, A., Bismuth, G., Niedergang, F. Antigen stored in dendritic cells after macropinocytosis is released unprocessed from late endosomes to target B cells. *Blood* 119, 95-105. **2012**.
- Lee, K.J.; Novella, I.S.; Teng, M.N.; Oldstone, M.B & de la Torre, J.C. NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J. Virol*. 74: 3470-7. **2000**.
- Lee, A.M., Pasquato, A., Kunz, S. Novel approaches in anti-arenaviral drug development. *Virology* 411, 163-169. **2011**.
- Lee, S., Joshi, A., Nagashima, K., Freed, E.O., Hurley, J.H. Structural basis for viral late-domain binding to Alix. *Nature structural & molecular biology* 14, 194-199. **2007**.
- Lehmann Grube, F.; Tijerina, R.; Zeller, W.; Chaturvedi, U.C.; Löhler, J. Age-dependent susceptibility of murine T lymphocytes to lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Gen. Virol.*; 64(Pt 5):1157-66, May **1983**.
- Lelke, M., Brunotte, L., Busch, C., Gunther, S. An N-terminal region of Lassa virus L protein plays a critical role in transcription but not replication of the virus genome. *J Virol* 84, 1934-1944. **2010**.
- Lenz, O., ter Meulen, J., Klenk, H.D., Seidah, N.G., Garten, W. The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12701-12705. **2001**.
- Leung, W.C., Rawls, W.E. Virion-associated ribosomes are not required for the replication of Pichinde virus. *Virology* 81, 174-176. **1977**.
- Levingston Macleod, J.M., D'Antuono, A., Loureiro, M.E., Casabona, J.C., Gomez, G.A., Lopez, N. Identification of two functional domains within the arenavirus nucleoprotein. *J Virol* 85, 2012-2023. **2011**.
- Li, H., Dou, J., Ding, L., Spearman, P. Myristoylation is required for human immunodeficiency virus type 1 Gag-Gag multimerization in mammalian cells. *J Virol* 81, 12899-12910. **2007**.
- Li WX, Li H, Lu R, Li F, Dus M, Atkinson P, Brydon EW, Johnson KL, García-Sastre A, Ball LA, Palese P, Ding SW. Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(5):1350-5. **2004**.
- Linero, F.N., Scolaro, L.A. Participation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in Junin virus replication in vitro. *Virus Res* 145, 166-170. **2009**.
- Link, A., Zabel, F., Schnetzler, Y., Titz, A., Brombacher, F., Bachmann, M.F. Innate immunity mediates follicular transport of particulate but not soluble protein antigen. *J Immunol* 188, 3724-3733. **2012**.
- López, N.; Jácamo, R. & Franze-Fernández, M.T. Transcription and RNA replication of Tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is an inhibitor of these processes. *Journal of Virology*. 75, 12241-12251. **2001**.
- Loureiro, M.E., Wilda, M., Levingston Macleod, J.M., D'Antuono, A., Foscaldi, S., Marino Buslje, C., Lopez, N. Molecular determinants of arenavirus Z protein homo-oligomerization and L polymerase binding. *J Virol* 85, 12304-12314. **2011**.

- Lozano, M.E.; Ghiringhelli, P.D.; Romanowski, V. & Grau, O. A simple nucleic acids amplification assay for the rapid detection of Junin virus in whole blood samples. *Virus Research*. 27, 37-53. **1993**.
- Lozano, M.E.; Enría, D.; Maiztegui, J.I.; Grau, O. and Romanowski, V. Rapid diagnosis of Argentine hemorrhagic fever by reverse transcriptase PCR-based assay. *J Clin Microbiol*. 33(5): 1327–1332. **1995**.
- Ludwig, A.K., Giebel, B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *The inteARNtional jouARNI of biochemistry & cell biology* 44, 11-15. **2012**.
- Lukashevich, I.S., Rodas, J.D., Tikhonov, II, Zapata, J.C., Yang, Y., Djavani, M., Salvato, M.S., LCMV-mediated hepatitis in rhesus macaques: WE but not ARM strain activates hepatocytes and induces liver regeneration. *Archives of virology* 149, 2319-2336. **2004**.
- Lukashevich IS, Patterson J, Carrion R, Moshkoff D, Ticer A, Zapata J, Brasky K, Geiger R, Hubbard GB, Bryant J, Salvato MS. A live attenuated vaccine for Lassa fever made by reassortment of Lassa and Mopeia viruses. *J Virol*. 79(22):13934-42. **2005**.
- Luria SE.; Burrous JW.; Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J Bacteriol*. 74(4):461-76. **1957**.
- Machado AM, Figueiredo GG, Campos GM, Lozano ME, Machado AR, Figueiredo LT. Standardization of an ELISA test using a recombinant nucleoprotein from the Junin virus as the antigen and serological screening for arenavirus among the population of Nova Xavantina, State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop*. 43(3):229-33. **2010**.
- Mackenzie, R.B.; Beye, H.K.; Valucide, C.L.; Garron, H. Epidemic hemorrhagic fever in Bolivia 1: A preliminary report of the epidemiology and clinical findings in a new epidemic area in South America. *Am J Med*; 13: 620-5. **1964**.
- Maiztegui, J.I. Clinical and epidemiological patterns of Argentine haemorrhagic fever. *Bull World Health Organ*; 52(4-6):567-75. **1975**.
- Maiztegui, J.I.; Fernández, N.J. & de Damilano, A.J. Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine hemorrhagic fever and association between treatment and a late neurological syndrome. *Lancet*. 2, 1216-1217. **1979**.
- Maiztegui, J.I.; Feinsod, F.; Briggiler, A.M.; Peters, C.J.; Enría, D.A.; Lupton, H.W.; Ambrosio, A.M.; Tiano, E.; Feuillade, M.R.; Gamboa, G.; Conti, O.; Vallejos, D.; Mac Donald, C. & Barrera Oro, J.G. Inoculation of Argentine volunteers with a liveattenuated Junín virus vaccine. VII International Congress of Virology, Edmonton, Canada (Abstract book, p. 69, R.3.49). **1987**.
- Maniatis T., Frith E.F., Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. **1982**
- Margueritte J. La importancia de la inmunización preparto. *El Molino* 2:10-15. **2007**.
- Martinez-Sobrido, L., Emonet, S., Giannakas, P., Cubitt, B., Garcia-Sastre, A., de la Torre, J.C. Identification of amino acid residues critical for the anti-interferon activity of the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 83, 11330-11340. **2009**.
- Martinez-Sobrido, L., Giannakas, P., Cubitt, B., Garcia-Sastre, A., de la Torre, J.C. Differential inhibition of type I interferon induction by arenavirus nucleoproteins. *J Virol* 81, 12696-12703. **2007**.
- Martinez-Sobrido, L., Zuniga, E.I., Rosario, D., Garcia-Sastre, A., de la Torre, J.C. Inhibition of the type I interferon response by the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 80, 9192-9199. **2006**.
- Martinez, M.G., Cordo, S.M., Candurra, N.A. Characterization of Junin arenavirus cell entry. *J Gen Virol* 88, 1776-1784. **2007**.

- Masters, P.S., Banerjee, A.K., 1988. Complex formation with vesicular stomatitis virus phosphoprotein NS prevents binding of nucleocapsid protein N to nonspecific ARN. *J Virol* 62, 2658-2664. **1988.**
- Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, F. Myristoylation of viral and bacterial proteins. *Trends in microbiology* 12, 178-185. **2004.**
- Mazeike E, Gedvilaite A, Blohm U. Induction of insert-specific immune response in mice by hamster polyomavirus VP1 derived virus-like particles carrying LCMV GP33 CTL epitope. *Virus Res.* 163(1):2-10. **2012.**
- McCormick, J.B., King, I.J., Webb, P.A., Scribner, C.L., Craven, R.B., Johnson, K.M., Elliott, L.H., Belmont-Williams, R. Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N Engl J Med* 314, 20-26. **1986.**
- McDonald, B., Martin-Serrano, J. No strings attached: the ESCRT machinery in viral budding and cytokinesis. *J Cell Sci* 122, 2167-2177. **2009.**
- McKee, K.T.Jr, Mahlandt, B.G.; Maiztegui, J.I.; Eddy, G.A.; Peters CJ. Experimental Argentine hemorrhagic fever in rhesus macaques: viral strain-dependent clinical response. 152(1):218-21, Jul **1985.**
- McKee, K.T.Jr; Barrera Oro, J.G.; Kuehne, A.I.; Spisso, J. & Mahlandt, B.G. Immunogenicity and protective efficacy of a live, attenuated Argentine hemorrhagic fever (AHF) vaccine in primates. XI International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Calgary, Canada. Abstract book, p. 29. **1984.**
- Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK. Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell.* 89(6):951-61. **1997.**
- Meegan, J.; LeDue, J.; García Franco, S. & Maiztegui, J.I. An ELISA test for IgG and IgM antibodies to Junín virus. II Congreso Argentino de Virología. Córdoba. Libro de resúmenes, comunicación 161. **1986.**
- Melnick, A., Licht, J.D. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93, 3167-3215. **1999.**
- Mena, J.A., Kamen, A.A. Insect cell technology is a versatile and robust vaccine manufacturing platform. *Expert Rev Vaccines* 10, 1063-1081. **2011.**
- Mettler, N.E.; Casals, J. & Shope, R.E. Study of antigenic relationship between Junín virus, the etiological agent of Argentine hemorrhagic fever, and other arthropode borne viruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 12, 647-652. **1963.**
- Meyer, B.J., Southern, P.J. Concurrent sequence analysis of 5' and 3' ARN termini by intramolecular circularization reveals 5' nontemplated bases and 3' terminal heterogeneity for lymphocytic choriomeningitis virus mARNs. *J Virol* 67, 2621-2627. **1993.**
- Michon, T., Estevez, Y., Walter, J., German-Retana, S., Le Gall, O. The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a teARNry complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mARN cap analogue. *FEBS J* 273, 1312-1322. **2006.**
- Morin, B., Coutard, B., Lelke, M., Ferron, F., Kerber, R., Jamal, S., Frangeul, A., Baronti, C., Charrel, R., de Lamballerie, X., Vonnrhein, C., Lescar, J., Bricogne, G., Gunther, S., Canard, B. The N-terminal domain of the arenavirus L protein is an ARN endonuclease essential in mARN transcription. *PLoS Pathog* **2010.**
- Murphy, F.A.; Webb, P.A.; Johnson, K.M. & Whitfield, S.G. Morphological comparison of Machupo with lymphocytic choriomeningitis virus: basis for a new taxonomic group. *Journal of Virology.* 4, 535-541. **1969.**
- Murphy, F.A., Webb, P.A., Johnson, K.M., Whitfield, S.G., Chappell, W.A. Arenoviruses in Vero cells: ultrastructural studies. *J Virol* 6, 507-518. **1970.**
- Murphy, F.A. & Whitfield, S.G. Morphology and morphogenesis of arena-viruses. *Bulletin WHO.* 52, 409-419. **1975.**

- Nakauchi M, Fukushi S, Saijo M, Mizutani T, Ure AE, Romanowski V, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Junin virus nucleocapsid protein and application to the diagnosis of hemorrhagic fever caused by South American arenaviruses. *Clin Vaccine Immunol*. 16(8):1132-8. **2009**.
- Naito, S., Matsumoto, S. Identification of cellular actin within the rabies virus. *Virology* 91, 151-163. **1978**.
- Nayak, D.P., Balogun, R.A., Yamada, H., Zhou, Z.H., Barman, S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res* 143, 147-161. **2009**.
- Neil, S.J., Zang, T., Bieniasz, P.D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451, 425-430. **2008**.
- Neuman, B.W., Adair, B.D., Burns, J.W., Milligan, R.A., Buchmeier, M.J., Yeager, M. Complementarity in the supramolecular design of arenaviruses and retroviruses revealed by electron cryomicroscopy and image analysis. *J Virol* 79, 3822-3830. **2005**.
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*. 108(2):193-9. **1991**.
- Ofofile, A.; Padnos, M.; Molomot, N. & Duffy, J.L. Morphological and biological characteristics of the M-P strain of lymphocytic choriomeningitis virus. *Infect. Immun.* 7, 309-315. **1973**.
- Ohkawa, T., Volkman, L.E., Welch, M.D. Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *J Cell Biol* 190, 187-195. **2010**.
- Olschläger S, Lelke M, Emmerich P, Panning M, Drosten C, Hass M, Asogun D, Ehichioya D, Omilabu S, Günther S. Improved detection of Lassa virus by reverse transcription-PCR targeting the 5' region of S RNA. *J Clin Microbiol*. 48(6):2009-13. **2010**.
- Olschläger S, Günther S. Rapid and specific detection of Lassa virus by reverse transcription-PCR coupled with oligonucleotide array hybridization. *J Clin Microbiol*. 50(7):2496-9. **2012**.
- O'Reilly, D.R.; Miller, L.K. and Luckow, V.A. Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual. W.H. Freeman and Company, New York. **1992**.
- Ortiz-Riano, E., Cheng, B.Y., de la Torre, J.C., Martinez-Sobrido, L. The C-terminal region of lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein contains distinct and segregable functional domains involved in NP-Z interaction and counteraction of the type I interferon response. *J Virol* 85, 13038-13048. **2011**.
- Ortiz-Riano, E., Cheng, B.Y., de la Torre, J.C., Martinez-Sobrido, L. Self-association of lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein is mediated by its N-terminal region and is not required for its anti-interferon function. *J Virol* 86, 3307-3317. **2012**.
- Pasian, E. L., Fernandez Cobo, M., Padula, P. J., De Mitri, M. I. & Martinez Segovia, Z. M. Presence of actin in Junín virus. *Comunicaciones Biológicas* 2, 25–30. **1983**
- Palacios, G.; Druce, J.; Du, L.; Tran, T.; Birch, C.; Briesse, T.; Conlan, S.; Quan, P.L.; Hui, J.; Marshall, J.; Simons, J.F.; Egholm, M.; Paddock, C.D.; Shieh, W.J.; Goldsmith, C.S.; Zaki, S.R.; Catton, M. & Lipkin, W.I. A New Arenavirus in a Cluster of Fatal Transplant-Associated Diseases. *N Engl J Med*. 6;358(10):991-8. Epub 6 Feb **2008**.
- Palmer, E.L.; Obijeski, J.F.; Webb, P.A. & Johnson, K.M. The circular segmented nucleocapsid of an arenavirus-Tacaribe virus. *Journal of General Virology*. 36, 541-545. **1977**.
- Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*. 9(5):565-72. **2003**.
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*. 12(2):304-6. **2006**.
- Parent, L.J., Bennett, R.P., Craven, R.C., Nelle, T.D., Krishna, N.K., Bowzard, J.B., Wilson, C.B., Puffer, B.A., Montelaro, R.C., Wills, J.W. Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J Virol* 69, 5455-5460. **1995**.

- Parisi, G., Echave, J., Ghiringhelli, D., Romanowski, V. Computational characterisation of potential ARN-binding sites in arenavirus nucleocapsid proteins. *Virus Genes* 13, 247-254. **1996**.
- Parodi, A.S.; Greenway, D.J.; Rugiero, H.R.; Rivero, E.; Frigerio, M.J.; Mettler, N.E.; Garzon, F.; Boxaca, M.; Guerrero, L.B. de & Nota, N.R. Sobre la etiología del brote epidémico en Junín. *Día Médico*. 30, 2300-2302. **1958**.
- Parodi, A.S.; de la Barrera, J.M.; Rugiero, H.R.; Greenway, D.J.; Yerga, M.; Mettler, N.E.; Boxaca, M. & Frigerio, M.J. Los reservorios del virus de la fiebre hemorrágica epidémica de la provincia de Buenos Aires. *Prensa Médica Argentina*. 46, 554-556. **1959a**.
- Parodi, A.S.; Rugiero, H.R.; Greenway, D.J.; Mettler, N.E.; Martínez, A.; Boxaca, M. & de la Barrera, J.M. Aislamiento del virus Junín (FHE) de los ácaros de las zonas epidémicas (*Echinolaeps echidninus* Berlese). *Prensa Médica Argentina*. 46, 2242-2244. **1959b**.
- Pasqual, G., Rojek, J.M., Masin, M., Chatton, J.Y., Kunz, S. Old world arenaviruses enter the host cell via the multivesicular body and depend on the endosomal sorting complex required for transport. *PLoS Pathog* 7, e1002232. **2011**.
- Perez, M., Craven, R.C., de la Torre, J.C. The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12978-12983. **2003**.
- Pérez, M.; Greenwald, D.L.; de la Torre, J.C. Myristoylation of the RING finger Z protein is essential for arenavirus budding. *J Virol.*; 78(20):11443-8. **2004**.
- Peters, C.J.; Kuehne, R.W.; Mercado, R.R.; Le Bow, R.H.; Spertzel, R.O.; Webb, P.A. Hemorrhagic fever in Cochabamba, Bolivia, 1971. *Am J Epidemiol*; 99:425—33. **1974**.
- Peters, C.J.; Jahrling, P.B.; Liu, C.T.; Kenyon, R.H.; McKee, K.T.Jr & Barrera Oro, J.G. Experimental studies of arenaviral hemorrhagic fevers. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 134, 5-68. **1987**.
- Pfau, C.J. Biochemical and biophysical properties of the arenaviruses. *Progress in medical virology. Fortschritte der medizinischen Virusforschung. Progres en virologie medicale* 18, 64-80. **1974**.
- Pinschewer, D.; Perez, M. & de la Torre, J.C. Role of the Virus Nucleoprotein in the Regulation of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Transcription and RNA Replication. *Journal of Virology*, p. 3882–3887 Vol. 77, N° 6. **2003**.
- Pirosky, I.; Zuccarini, J.; Molinelli, E.A.; Di Pietro, A.; Martini, P.; Ferreyra, B.; Gutman Frugone, L.F. & Vazquez, T. Virosis hemorrágica del noroeste bonaerense. *Endemoepidémica, febril, enantemática y leucopénica*. I. La primera inoculación experimental al hombre. *Orientación Médica*. 8, 144-148. **1959**.
- Plotch, S.J., Bouloy, M., Ulmanen, I., Krug, R.M. A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped ARNs to generate the primers that initiate viral ARN transcription. *Cell* 23, 847-858. **1981**.
- Polyak, S.J., Zheng, S., Harnish, D.G., 5' termini of Pichinde arenavirus S ARNs and mARNs contain nontemplated nucleotides. *J Virol* 69, 3211-3215. **1995**.
- Pornillos, O., Alam, S.L., Davis, D.R., Sundquist, W.I. Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein. *Nature structural biology* 9, 812-817. **2002**.
- Pornillos, O., Higginson DS, Stray KM, Fisher RD, Garrus JE, Payne M, He GP, Wang HE, Morham SG, Sundquist WI. HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol*. 162(3):425-34. **2003**.
- Pythoud C., Rodrigo WW, Pasqual G, Rothenberger S, Martínez-Sobrido L, de la Torre JC, Kunz S. Arenavirus nucleoprotein targets interferon regulatory factor-activating kinase IKKε. *J Virol*. 86(15):7728-38. **2012**.

- Qi, H., Egen, J.G., Huang, A.Y., Germain, R.N. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* 312, 1672-1676. **2006**.
- Qi, X., Lan, S., Wang, W., Schelde, L.M., Dong, H., Wallat, G.D., Ly, H., Liang, Y., Dong, C. Cap binding and immune evasion revealed by Lassa nucleoprotein structure. *Nature* 468, 779-783. **2010**.
- Qian S., Zhong X, Yu L, Ding B, de Haan P, Boris-Lawrie K. HIV-1 Tat RNA silencing suppressor activity is conserved across kingdoms and counteracts translational repression of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(2):605-10. **2009**.
- Radoshitzky, S.R., Abraham, J., Spiropoulou, C.F., Kuhn, J.H., Nguyen, D., Li, W., Nagel, J., Schmidt, P.J., Nunberg, J.H., Andrews, N.C., Farzan, M., Choe, H. Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature* 446, 92-96. **2007**.
- Raju, R., Raju, L., Hacker, D., Garcin, D., Compans, R., Kolakofsky, D. Nontemplated bases at the 5' ends of Tacaribe virus mARNs. *Virology* 174, 53-59. **1990**.
- Ramqvist, T., Andreasson, K., Dalianis, T. Vaccination, immune and gene therapy based on virus-like particles against viral infections and cancer. *Expert Opin Biol Ther* 7, 997-1007. **2007**.
- Rawls, W.E. & Buchmeier, M.J. Arenaviruses: purification and physicochemical nature. *Bulletin WHO.* 52, 393-401. **1976**.
- Rawls, W.E., Chan, M.A.; Gee, S.R. Mechanisms of persistence in arenavirus infections: a brief review. *Can J Microbiol.* 27(6):568-74. Jun **1981**.
- Rhoads, R.E., Joshi, B., Minich, W.B., 1994. Participation of initiation factors in the recruitment of mARN to ribosomes. *Biochimie* 76, 831-838. **1994**.
- Rivera Pomar, R.V.; Manzella, E.M.; Ghiringhelli, P.D.; Grau, O. & Romanowski, V. Patterns of transient expression of the arenavirus nucleocapsid protein gene in transfected cells. *Microscopía Electrónica y Biología Celular.* 15, 41-56. **1991**.
- Rodrigo, W.W., Ortiz-Riano, E., Pythoud, C., Kunz, S., de la Torre, J.C., Martinez-Sobrido, L., Arenavirus nucleoproteins prevent activation of nuclear factor kappa B. *J Virol* 86, 8185-8197. **2012**.
- Rodriguez-Carreno MP, Nelson MS, Botten J, Smith-Nixon K, Buchmeier MJ, Whitton JL. Evaluating the immunogenicity and protective efficacy of a ADN vaccine encoding Lassa virus nucleoprotein. *Virology.* 335(1):87-98. **2005**.
- Roldao, A., Mellado, M.C., Castilho, L.R., Carrondo, M.J., Alves, P.M. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 9, 1149-1176. **2010**.
- Romanowski, V. & Bishop, D.H.L. The formation of Arenaviruses that are genetically diploid. *Virology.* 126, 87-95. **1983**.
- Romanowski, V.; Matsuura, Y. & Bishop, D.H.L. Complete sequence of the S RNA of lymphocytic choriomeningitis virus (WE strain) compared to that of Pichinde arenavirus. *Virus Research.* 3, 101-114. **1985**.
- Rosinski M, Reid S, Nielsen LK. Kinetics of baculovirus replication and release using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng.* 77(4):476-80. **2002**.
- Rowe, W.P.; Murphy, F.A.; Bergold, G.H.; Casals, J.; Hotchin, J.; Johnson, K.M.; Lehmann-Grube, F.; Mims, C.A.; Traub, E. & Webb, P.A. Arenaviruses: Proposed name for a newly defined virus group. *Journal of Virology.* 5, 651-652. **1970a**.
- Rowe, W.P.; Pugh, W.F.; Webb, P.A. & Peters, C.J. Serological relationships of the Tacaribe complex of viruses to lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Virology.* 5, 289-292. **1970b**.
- Rugiero, H.R.; Parodi, A.S.; Ruggiero, H.G.; Mettler, N.; Boxaca, M.; de Guerrero, A.L.; Cintora, A.; Magnoni, C.; Milani, H.; Maglio, F.; Gonzalez Cambaceres, C.; Astarloa, L.; Squassi, G.;

- Fernández, D. & Giacosa, A. Fiebre hemorrágica argentina. I. Período de incubación e invasión. *Revista de la Asociación Médica Argentina*. 78, 221. **1964a**.
- Rugiero, H.R.; Cintora, A.; Magnoni, C.; Ruggiero, H.G.; Gonzalez Cambaceres, C.; Maglio, F.; Astarloa, L.; Squassi, G. & Fernández, D. Fiebre hemorrágica argentina. III. Aparato cardiovascular. *Revista de la Asociación Médica Argentina*. 78, 360-371. **1964b**.
- Rugiero, H.R.; Cintora, A.; Ruggiero, H.G.; Mettler, N.; Boxaca, M.; de Guerrero, A.L.; Cintora, A.; Magnoni, C.; Milani, H.; Maglio, F.; Gonzalez Cambaceres, C.; Astarloa, L.; Squassi, G.; Fernández, D. Fiebre hemorrágica argentina. IV. Formas clínicas. *Revista de la Asociación Médica Argentina*. 78, 500. **1964c**.
- Ruo SL, Mitchell SW, Kiley MP, Roumillat LF, Fisher-Hoch SP, McCormick JB. Antigenic relatedness between arenaviruses defined at the epitope level by monoclonal antibodies. *J Gen Virol*. 72 (Pt 3):549-55. **1991**.
- Sakuma, T., Noda, T., Urata, S., Kawaoka, Y., Yasuda, J. Inhibition of Lassa and Marburg virus production by tetherin. *J Virol* 83, 2382-2385. **2009**.
- Salvato, M.S., Schweighofer, K.J., Burns, J., Shimomaye, E.M. Biochemical and immunological evidence that the 11 kDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus. *Virus Res* 22, 185-198. **1992**.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edition. **1989**.
- Sanchez, A.B., de la Torre, J.C. Genetic and biochemical evidence for an oligomeric structure of the functional L polymerase of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 79, 7262-7268. **2005**.
- Schlie, K., Maisa, A., Freiberg, F., Groseth, A., Strecker, T., Garten, W. Viral protein determinants of Lassa virus entry and release from polarized epithelial cells. *J Virol* 84, 3178-3188. **2010**.
- Schmitt, A.P., Leser, G.P., Morita, E., Sundquist, W.I., Lamb, R.A. Evidence for a new viral late-domain core sequence, FPIV, necessary for budding of a paramyxovirus. *J Virol* 79, 2988-2997. **2005**.
- Schneider, T.D., Stephens, R.M. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* 18, 6097-6100. **1990**.
- Schnettler E, Sterken MG, Leung JY, Metz SW, Geertsema C, Goldbach RW, Vlak JM, Kohl A, Khromykh AA, Pijlman GP. Noncoding flavivirus RNA displays RNA interference suppressor activity in insect and Mammalian cells. *J Virol*. 86(24):13486-500. **2012**.
- Sepulveda, C.S., Garcia, C.C., Damonte, E.B. Inhibition of arenavirus infection by thiuram and aromatic disulfides. *Antiviral research* 87, 329-337. **2010**.
- Shatkin, A.J., mARN cap binding proteins: essential factors for initiating translation. *Cell* 40, 223-224. **1985**.
- Shimajima M, Ströher U, Ebihara H, Feldmann H, Kawaoka Y. Identification of cell surface molecules involved in dystroglycan-independent Lassa virus cell entry. *J Virol*. 86(4):2067-78. **2012a**.
- Shimajima M, Kawaoka Y. Cell surface molecules involved in infection mediated by lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein. *J Vet Med Sci*. 74(10):1363-6. **2012b**.
- Shtanko, O., Watanabe, S., Jasenosky, L.D., Watanabe, T., Kawaoka, Y. ALIX/AIP1 is required for NP incorporation into Mopeia virus Z-induced virus-like particles. *J Virol* 85, 3631-3641. **2011**.
- Singh, M., Chakrapani, A., O'Hagan, D. Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems. *Expert Rev Vaccines* 6, 797-808. **2007**.
- Soldan SS, Plassmeyer ML, Matukonis MK, González-Scarano F. La Crosse virus nonstructural protein NSs counteracts the effects of short interfering RNA. *J Virol*. 79(1):234-44. **2005**.

- Sonenberg, N. Regulation of translation and cell growth by eIF-4E. *Biochimie* 76, 839-846. **1994.**
- Sonenberg, N., Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*. 136(4):731-45. **2009.**
- Speir, R.W.; Wood, O.; Liebhaver, H. & Buckley, S.M. Lassa fever, a new virus disease of man from west Africa. IV. Electron microscopy of Vero cell cultures infected with Lassa virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 19, 692-694. **1970.**
- Spiropoulou, C.F., Kunz, S., Rollin, P.E., Campbell, K.P., Oldstone, M.B. New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor. *J Virol* 76, 5140-5146. **2002.**
- Staneck, L.D.; Trowbridge, R.S.; Welsh, R.M.; Wright, E.A. & Pfau, C.J. Arenaviruses: cellular response to long-term in vivo infection with Parana and lymphocytic choriomeningitis viruses. *Infect. Immun.* 6, 444-450. **1972.**
- Stenglein MD, Sanders C, Kistler AL, Ruby JG, Franco JY, Reavill DR, Dunker F, Derisi JL. Identification, characterization, and in vitro culture of highly divergent arenaviruses from boa constrictors and annulated tree boas: candidate etiological agents for snake inclusion body disease. *MBio*. 14;3(4). **2012.**
- Stoker, M.G.P. & Mc Pherson, I.A. Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus in vitro. *Virology*. 14, 631-641. **1961.**
- Storni, T., Bachmann, M.F. Loading of MHC class I and II presentation pathways by exogenous antigens: a quantitative in vivo comparison. *J Immunol* 172, 6129-6135. **2004.**
- Strecker, T., Eichler, R., Meulen, J., Weissenhorn, W., Dieter Klenk, H., Garten, W., Lenz, O. Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]. *J Virol* 77, 10700-10705. **2003.**
- Strecker, T., Maisa, A., Daffis, S., Eichler, R., Lenz, O., Garten, W. The role of myristoylation in the membrane association of the Lassa virus matrix protein Z. *Virol J* 3, 93. **2006.**
- Sullivan CS, Ganem D. A virus-encoded inhibitor that blocks RNA interference in mammalian cells. *J Virol*. 79(12):7371-9. **2005.**
- Sundquist, W.I., Schubert, H.L., Kelly, B.N., Hill, G.C., Holton, J.M., Hill, C.P. Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein. *Molecular cell* 13, 783-789. **2004.**
- Szkal, A.K., Holmes, K.L., Tew, J.G. Transport of immune complexes from the subcapsular sinus to lymph node follicles on the surface of nonphagocytic cells, including cells with dendritic morphology. *J Immunol* 131, 1714-1727. **1983.**
- Tallman, M.S., Kwaan, H.C. Reassessing the hemostatic disorder associated with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 79, 543-553. **1992.**
- Tang XC, Lu HR, Ross TM. Baculovirus-produced influenza virus-like particles in mammalian cells protect mice from lethal influenza challenge. *Viral Immunol*. 24(4):311-9. **2011.**
- Thumbi, D.K., Arif, B.M., Krell, P.J. Susceptibility of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus to inhibitors of ADN replication. *JouARNI of virological methods* 146, 209-217. **2007.**
- Topcu, Z., Mack, D.L., Hromas, R.A., Borden, K.L. The promyelocytic leukemia protein PML interacts with the proline-rich homeodomain protein PRH: a RING may link hematopoiesis and growth control. *Oncogene* 18, 7091-7100. **1999.**
- Tortorici, M.A.; Albariño, C.G.; Posik, D.M.; Ghiringhelli, P.D.; Lozano, M.E.; Rivera Pomar, R.V.; Romanowski, V. Arenavirus nucleocapsid protein displays a transcriptional antitermination activity in vivo. *Virus Research* 73, 41–55. **2001a.**
- Tortorici, M.A., Ghiringhelli, P.D., Lozano, M.E., Albarino, C.G., Romanowski, V. Zinc-binding properties of Junin virus nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 82, 121-128. **2001b.**
- Urata, S., de la Torre, J.C. Arenavirus budding. *Adv Virol* 2011, 180326. **2011.**

- Urata, S., Ngo, N., de la Torre, J.C. The PI3K/Akt pathway contributes to arenavirus budding. *J Virol* 86, 4578-4585. **2012**.
- Urata, S., Noda, T., Kawaoka, Y., Yokosawa, H., Yasuda, J. Cellular factors required for Lassa virus budding. *J Virol* 80, 4191-4195. **2006**.
- Urata, S., Yasuda, J., de la Torre, J.C. The z protein of the new world arenavirus tacaribe virus has bona fide budding activity that does not depend on known late domain motifs. *J Virol* 83, 12651-12655. **2009**.
- Ure AE, Ghiringhelli PD, Possee RD, Morikawa S, Romanowski V. Argentine hemorrhagic fever diagnostic test based on recombinant Junin virus N protein. *J Med Virol* 80(12):2127-33. **2008**.
- Vaughn, J.L.; Goodwin, R.H.; Tompkins, G.J. & McCawley, P. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In vitro*. 4 (13), 213-217. **1977**.
- Veza, A.C., Gard, G.P., Compans, R.W., Bishop, D.H. Structural components of the arenavirus Pichinde. *J Virol* 23, 776-786. **1977**.
- Vieth, S., Torda, A.E., Asper, M., Schmitz, H., Gunther, S. Sequence analysis of L ARN of Lassa virus. *Virology* 318, 153-168. **2004**.
- Volkman LE, Goldsmith PA. In Vitro Survey of Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus Interaction with Nontarget Vertebrate Host Cells. *Appl Environ Microbiol*. 45(3):1085-93. **1983**.
- Volkman, L.E. Baculovirus bounty. *Science*. 29:Vol. 269. no. 5232, p. 1834. **1995**.
- Volpon, L., Osborne, M.J., Borden, K.L. NMR assignment of the arenaviral protein Z from Lassa fever virus. *Biomolecular NMR assignments* 2, 81-84. **2008**
- Volpon, L., Osborne, M.J., Capul, A.A., de la Torre, J.C., Borden, K.L. Structural characterization of the Z RING-eIF4E complex reveals a distinct mode of control for eIF4E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5441-5446. **2010**.
- von Der Haar, T., Ball, P.D., McCarthy, J.E. Stabilization of eukaryotic initiation factor 4E binding to the mRNA 5'-Cap by domains of eIF4G. *J Biol Chem* 275, 30551-30555. **2000**.
- Wang, J., Danzy, S., Kumar, N., Ly, H., Liang, Y. Biological Roles and Functional Mechanisms of arenavirus Z Protein in Viral Replication. *J Virol*. **2012**.
- Wang Y, Kato N, Jazag A, Dharel N, Otsuka M, Taniguchi H, Kawabe T, Omata M. Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response. *Gastroenterology*, 130(3):883-92. **2006**.
- Ward RL, McNeal MM, Steele AD. Why does the world need another rotavirus vaccine? *Ther Clin Risk Manag*. 4(1):49-63. **2008**.
- Webb, P.A.; Johnson, K.M. & MacKensie, R.B. The measurement of specific antibodies in Bolivian hemorrhagic fever by neutralization of virus plaques. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 130, 1013-1016. **1969**.
- Weissenbacher, M.C.; Laguens, R.P.; Coto, C.E. Argentine hemorrhagic fever. *Curr Top Microbiol Immunol*.; 134:79-116. **1987**.
- White, J.M., Delos, S.E., Brecher, M., Schornberg, K. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 43, 189-219. **2008**.
- Wilda, M., Lopez, N., Casabona, J.C., Franze-FeARNndez, M.T. Mapping of the tacaribe arenavirus Z-protein binding sites on the L protein identified both amino acids within the putative polymerase domain and a region at the N terminus of L that are critically involved in binding. *J Virol* 82, 11454-11460. **2008**.
- Wolff, S., Becker, S., Groseth, A. Cleavage of the Junin virus nucleoprotein serves a decoy-function to inhibit the induction of apoptosis during infection. *J Virol*. **2012**.

- Wolff S, Ebihara H, Groseth A. Arenavirus budding: a common pathway with mechanistic differences. *Viruses* 5(2):528-49. **2013**
- Wollert T, Hurley JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*. 464(7290):864-9. **2010**.
- Yee EL, Jiang B, Kendall RS, Humphrey C, Glass RI. Group C rotavirus in a pediatric kidney transplant patient with diarrhea. *J Clin Virol*. 36(4):306-8. Epub 2006 Jun 13. **2006**.
- Yenofsky RL, Fine M, Pellow JW. A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(9):3435-9. **1990**.
- York J, Nunberg, J.H. Role of the stable signal peptide of Junin arenavirus envelope glycoprotein in pH-dependent membrane fusion. *J Virol* 80, 7775-7780. **2006**.
- York J, Nunberg, J.H. A novel zinc-binding domain is essential for formation of the functional Junin virus envelope glycoprotein complex. *J Virol* 81, 13385-13391. **2007**.
- York J, Romanowski, V., Lu, M., Nunberg, J.H. The signal peptide of the Junin arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex. *J Virol* 78, 10783-10792. **2004**.
- Zapata JC, Poonia B, Bryant J, Davis H, Ateh E, George L, Crasta O, Zhang Y, Slezak T, Jaing C, Pauza CD, Goicochea M, Moshkoff D, Lukashevich IS, Salvato MS. An attenuated Lassa vaccine in SIV-infected rhesus macaques does not persist or cause arenavirus disease but does elicit Lassa virus-specific immunity. *Virol J*. 10:52. **2013**.
- Zeller W, Bruns, M., Lehmann-Grube, F. Viral nucleoprotein can be demonstrated on the surface of lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells. *Medical microbiology and immunology* 175, 89-92. **1986**.
- Zeller W, Bruns, M., Lehmann-Grube, F. Lymphocytic choriomeningitis virus. X. Demonstration of nucleoprotein on the surface of infected cells. *Virology* 162, 90-97. **1988**.
- Zhou S, Cerny, A.M., Zacharia, A., Fitzgerald, K.A., Kurt-Jones, E.A., Finberg, R.W. Induction and inhibition of type I interferon responses by distinct components of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 84, 9452-9462. **2010**.
- Zielezinski A, Karlowski WM. Agos--a universal web tool for GW Argonaute-binding domain prediction. *Bioinformatics*. 27(9):1318-9. **2011**.
- Zuo Y, Deutscher, M.P. Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res* 29, 1017-1026. **2001**.

AGRADECIMIENTOS

-AGRADECIMIENTOS-

Y aca estamos...!! Hace tanto tiempo que en mi mente escribi esta sección y siempre me pareció que no me alcanzaban las palabras para plasmar lo que siento. Pero lo voy a intentar..., aunque me lleve unos cuaaantos renglones más.

A veces me da la sensación de que todo esto empezó ayer, y me parece mentira haber llegado al final de este camino. Y eso fue gracias a muchas personas que me acompañaron y ayudaron en cada momento. Todos los días en el laboratorio compartimos muchas horas de nuestra vida, y es gracias a cada uno de ustedes que desde el año 2007 me encanta ir a trabajar!! Me gusta compartir un desayuno (cuando a veces me levanto temprano), un almuerzo (que a veces esta mas cerca de la merienda) o una ronda de mate, con azúcar!!!!

Todo esto empezó con **Sandra**, cuando yo era alumna de bioquímica II. Ella me llevó al laboratorio y me presentó a nuestra amiga la Z. Y siendo como es Sandra, un ser social por excelencia, me hizo conocer muchas personas y me adoptó como hermana menor. Compartimos la mesada y me enseñó todo lo necesario para que yo pudiera levantar vuelo. Gracias Sandra!!!

Y juntas, de la mano de Sandra y Marcela, llegamos al laboratorio con **Solcitoloo!!** Cuantas cosas compartimos... transitamos este camino juntas, y si hay algo que puedo decir es que siempre estas ahí!! Siempre lista para darme una mano, una oreja, un viaje a la trinidad, un hombro para llorar o un café con leche para reírnos!! Somos taaan distintas, y no compartimos el mismo gusto por absolutamente nada, y sin embargo nos divertimos taaaaaanto, ja ja! Gracias Solcitalaa!!

Cuando llegue al laboratorio a algunos ya los conocía..., **Mariano!!** Mi compañero del 159 B/G, cuantas charlas de colectivo y cuantos consejos me diste, no por nada el es mi consejero!! Me acuerdo cuando estabas por defender tu tesis, yo estaba por terminar mi tesina, y pensaba: "Me falta un monton para llegar a eso..." y mira, aca estamos! Gracias Mariano por todos tus consejos (académicos y personales) y por siempre estar dispuesto a ayudarme.

Vaninaaaa! A ella tambien la conocía, y como siempre me recibió con brazos abiertos, con alegría y buena onda. Cuando a veces estaba perdida en el laboratorio, y no me animaba a preguntar, enseguida la buscaba a Vani que con paciencia me explicaba las cosas mas simples, que para mi eran bastante complicadas. Gracias Vanucha!!

Y ahí las conocí también a **Marcela y Julia...**, pero cuando yo iba llegando ellas iban partiendo. Gracias Marce por tu ayuda en mis comienzos con las Sf9!! Y July... junto conmigo y Leti... vamos peleando el podio del comentario mas descolgado! Gracias July!!

A algunos otros no los conocía, como a **Leti!!!!** Que historia mas rara la nuestra... un día de repente nos fuimos a Mendoza sin casi conocernos (creo que las dos buscábamos un poco de aire) y mira lo que salió!! Una amistad a prueba de kilómetros! Siempre sos tan transparente Le, es lo que más me gusta de ser tu amiga, que se que siempre sos sincera, y que siempre estas dispuesta a ayudarme en lo que sea. Cuantas Stout... a veces de festejo y otras veces de resignación. Gracias por todo y sobre todo en estos últimos días de crisis tesística, gracias por acompañarme!!!!

Y cuando llegue, también conocí a un chico, de pelo largo... que le dicen el "chango". Lo vi por primera vez un día que iba a sembrar un PAGE y la muestra se me puso amarilla!!! (tenía que ser azul), y le pregunté a ese chico que por que había pasado eso (me parece que huebira sido ayer...). El dejó lo que estaba haciendo y me vino a explicar y a ayudar... y desde ahí hasta hoy SIEMPRE me ayudó!. Él es **Marcos!!** Que sin él no se si hubiera llegado hasta aca. Gracias!!! Gracias por haber estado conmigo para festejar cada éxito (por chiquito que fuera), gracias por haber estado ahí para levantarme el animo cada vez que me agarraban mis ataques de frustración, gracias por ayudarme a ver que que a veces las cosas son mejores de lo que YO veo. Gracias por enseñarme todos los días algo nuevo, discutiendo resultados o trayendo técnicas locas, ideas nuevas; gracias por ayudarme a animarme! Gracias por aceptar ser mi codirector, sabiendo que esta becaria era bastante difícil, gracias por taaaaantas cosas!!!!

Y con Marcos, también la conocí a **Ana!** ...En mis inicios estaba llena de entusiasmo (como todos) y me quedaba hasta tarde corriendo los PAGE. Y en esos días, a la noche me encontraba con una chica super simpática, que siempre estaba super apurada. Y así en esos días a la noche, charlábamos un monton y nos fuimos haciendo amigas. Entre los tres compartimos muchas cosas, y si hay algo que no puede faltar con Ana, son las risas!! Ahyy Ana... sos tan divertida! Y tan buena amiga... ella es de esas persona que te ayudan incondicionalmente, a la hora que sea, sea lo que sea... ella siempre te va a ayudar! Gracias Anuski por haberme escuchado y aconsejado siempre, gracias por todo!!!

Cuando llegue al Laboratorio, también conocí al resto del grupo Arena, a **Javi y Betina**. Cuando la conocí a Bet, estaba terminando su seminario, y desde ahí que juntas transitamos este camino doctoral. Gracias Bet!! Con ella, Javi y Sandra

compartimos viajes y congresos, obvio Sandra era la hermana mayor que guiaba el asunto, ja ja!

Y Javi, nuestro angel de la guarda informático. Toda la magia de diseño de esta tesis me la enseñó Javi, y cada vez que tuve un bloqueo mental-computacional Javi me ayudó. Javi es otra de esas personas transparentes y generosas, que siempre te ayudan. Cuantos café con leche compartimos (javi tiene un segundo doctorado en preparación de café instantáneo), cuantos partidos de Squash, cuanta música y cuantas pelis!! Y como nos costó este último tramo de la tesis... gracias por acompañarme, gracias por todo Javi!!!

Al tiempo de haber llegado al laboratorio, llegó **Mati**!!, ya nos conocíamos de la cursada, de nuestras tardes en el centro de estudiantes con Melisa. Entre los dos me han hecho llorar de risa, y me instruyeron en el doble sentido de las oraciones. Mati, compañero de mesada (que casi que la usaba toda yo...) y miembro exclusivo del “club de cata de vinos en la casa de Cris”, compartimos muchas charlas y discusiones... de trabajo, de filosofía, de hipótesis poblacionales, de pelis, de series... tantas cosas. Obvio... siempre acompañado de la mejor cocina gourmet, y de un excelente vinito. Gracias Mati por todo, y por haberme prestado tu oreja tantas veces!!

Y tambien llego **Ceci**, mi hermana gemela!!!, que volvía de su viaje a España y venía a padecer con el resto de nosotros este asunto del doctorado. Ella siempre anda de aca para alla, vive la mitad del dia en cultivo y la otra mitad sumergida en papeles y almanaques organizativos. Con ella y con Solcito compartimos las cosas bien de mujer: ir a comprar ropa, ir a la peluqueria, cocinar tortas,... esas cosas que vienen con el XX. Gracias por siempre preguntarme “como andas?”, por compartir este camino conmigo y por ayudarme siempre con las cosas de cultivo (siempre le pido que me preste células.... Que pesada, no??). Gracias por tood Chechuuuu!

Y por esa época tambien llegaba **Diego**!! Que bárbaro... que nerviosa me ponías al principio, por que no entendía tus chistes... ja ja! Y después... nos hicimos re amigos!!! Dieguete es el padre ejemplar y es el que se da maña con cualquier cosa... vos le das cualquier equipo... y el lo sabe usar! Cuantas charlas, cuantos desahogos... y cuantos de esos abrazos que te hacen sentir mejor!!! Dr. Mengual, muchas gracias por toda su ayuda, por ser mi compañero pebeliano y ser mi compañero en este camino que transitamos a la par. Y prometo cumplir con el traspaso del “puntero tesístico”!! Gracias Dieguete, por todo!!!

Y tambien conocí a los jefes **Daniel** y **Mario**. Mario, mi director, es el que junto con Sandra me dieron la posibilidad de entrar a este mundo, el LIGBCM. Y por eso Mario,

te estoy agradecida. También te tengo que agradecer que siempre me dejaste ser libre, con la promesa de cumplir con mis responsabilidades, pero libre al fin. Esa libertad a veces fue difícil de manejar, pero hoy me doy cuenta que me permitió aprender, me ayudó a moldear mi criterio, me estimuló a tomar el control de mi camino, de ir a buscar las cosas (en lugar de esperar que caigan del cielo), y de aprender a recorrer este camino sin bastón. Gracias por haberme dejado elegir, y por haberme acompañado en cada una de mis decisiones. Gracias!!!

Y Daniel... cuando lo conocí era mi profesor de Ingeniería genética aplicada... y parecía taaaaan serio. Después lo fui conociendo, compartiendo charlas, discutiendo resultados... y no era taaaaaaan serio. A vos Daniel te tengo que agradecer la confianza por haberme permitido entrar al mundo de PB-L y por haberme mostrado el gusto por la docencia, y la bioinformática!! Me acuerdo cuando empecé con las clases en enfermería que no sabía por donde empezar, y vos con paciencia me ayudaste a encontrar la punta del hilo. Gracias por tus consejos, y por la paciencia... vos sabes que soy un poco cabeza dura y a veces es difícil hacerme cambiar de opinión. Sin embargo más de una vez lograste convencerme, ja ja! Gracias por todo Daniel, gracias por acompañarme en todo este camino.

Y ahora que yo ya me estoy yendo, otros vienen llegando... **Cintia, Arantxa, Lionel, Soledad, Agustín, Priscila y Matías L.** Ellos son la nueva generación, los que traen energía renovada al LIGBCM. A ellos les deseo los mayores de los éxitos, y aprovecho para decirles que aunque a veces uno se frustra, se canse y este apunto de largar todo, siempre va a venir un amigo a recargar las pilas y ayudarlos a seguir. Les agradezco por haber compartido este tiempo conmigo!!

Gracias al grupo de al lado!, el Laboratorio de Inmunología y Virología, que creyeron en la idea loca de las VLPs, gracias a **Graciela y Marcelo** que me adoptaron como una becaria más, y a **Facu** y a **Laura** por toda su ayuda.

Gracias a los que son el *backstage* del laboratorio, **Bruno, Mary, Guada, Silvia y Alejandra.**

Y gracias a toda la gente del pasillo, de todos los laboratorios viejos y nuevos, a todos los que me han prestado equipos, reactivos, tiempo y demoras en el flujo (unas cuantas veces).

Y más afuera del laboratorio, pero muy adentro mío... **mi familia!!!!!!!** A ellos les dedico este trabajo! De solo empezar a escribir se me humedecen los ojos (por eso los deje para el final... por que es lo más difícil de expresar). Ustedes son mi familia, son el lugar a donde voy a que me mimen, a estar en compañía, a compartir mis alegrías,

mis problemas, mis llantos, todo!! Ellos son **mi Mamá y mi Papá**. Ellos que me hacen sentir que están orgullosos de mí, que me transmiten su fuerza. Mamá que es mi amiga más antigua, mi compinche, ella me enseñó gran parte de lo que soy. Y la otra mitad me la enseñó Papá, que cuando me mira me hace sentir orgullosa de lo que soy, porque yo sé que él me respeta y que está satisfecho con la mujer que soy. Ellos me han ayudado y me ayudan en todo lo que hago, y siempre están listos para socorrerme. Cada vez que me caí, ellos me vinieron a levantar. Gracias Ma!! Gracias Pa!! Y el sindicato... mis hermanas **Caro y Coty**. Ellas son el complemento de mí ser. Caro, como buena hermana mayor, fue marcando el camino y me fue mostrando lo que es ser grande. Y hoy, ya más grandes las dos, compartimos y disfrutamos de ser amigas. Caro siempre lista para la acción... la llamo al teléfono rojo y está lista para la batalla (ya sea contra los del consulado de USA o contra la mugre de mi casa!!). Y la gordita... ella es mi hermanita, a pesar de que ya no es tan chiquita... Ella es la artista de la casa, la autora de los dibujos de esta tesis. Ella trae frescura a la familia, llena de música y color el lugar donde ella este. A ellas las adoro! Y la **Abuela**, ella me acompaña en mis días de estudiante y compartió conmigo esos momentos difíciles, pero juntas salimos adelante. Gracias Abuela!!

Y a mi nueva familia... a mi amor **Marcos**. A vos también te dedico esto que hicimos juntos, y además de agradecerme como miembro del laboratorio, como co-director y como amigo, quiero agradecerme como miembro de mi familia! Gracias por hacerme feliz todos los días y por elegirme para recorrer la vida juntos. **Gracias a toda mi familia!!!!**

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A las instituciones que financiaron este trabajo a través de becas y subsidios, o colaboraron en la realización de este trabajo:

Universidad Nacional de Quilmes, **UNQ**.

Universidad Autónoma de Madrid, **UAM**

Instituto Pasteur, París y Montevideo

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, **ANPCyT**.

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, **CONICET**.



